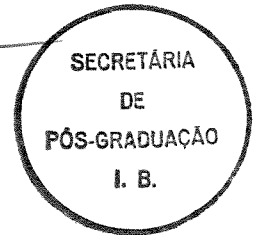


da tese defendida pelo(a) candidato a)  
Maria Teresa de Car-  
valho Azevedo.  
e aprovada pela Comissão Julgadora. 06  
01  
94

*PLH Hramf*



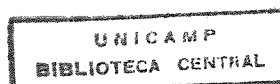
**MARIA TERESA DE CARVALHO AZEVEDO**

## **INFLUÊNCIA DE ANTICORPOS "NATURAIS" NA ATIVIDADE DO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas na área de  
Imunologia.

**ORIENTADOR:** Prof Dr Paulo Maria Ferreira Araújo

Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
Campinas - São Paulo  
- 1993 -



**A minha mãe, responsável  
por minha formação  
religiosa, intelectual e moral.**

---

**Ao meu marido Francisco,  
pela dedicação, carinho,  
apoio e incentivo de minha  
formação profissional.**

**Ao meu filho Gabriel  
e ao que está por vir  
por preencherem minha vida  
com muita alegria.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho e me guiou com seu espírito, em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Paulo Maria Ferreira Araújo, pela orientação, amizade, apoio constantes, e, pela convivência, que me ensinou a admirá-lo por suas atitudes como profissional e ser humano.

---

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo aconselhamento e amizade.

Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo.

Ao Isaias pela ajuda laboratorial e controle de material necessários à realização do trabalho.

A Dirce e Rovilson pela paciência.

A meu colega Phileno pela amizade e ajuda na realização do trabalho.

A todos enfim que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
SUMÁRIO	2
INTRODUÇÃO	3
<hr/>	
PROCEDIMENTO GERAL	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
I Animais	19
II Antígenos	19
III Anti-soros	19
IV Isolamento e caracterização dos anticorpos "naturais"	20
1 - Purificação dos anticorpos	20
1.a) Cromatografia em coluna de Sephadex G-200	20
1.b) Precipitação com ácido bórico	20
V Imunodifusão	21
VI Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	21
VII ELISA- Ensaio Imunoenzimático	22
VIII Imunização dos animais	23

IX	Determinação do número de células produtoras de anticorpos através da técnica de PFC-reverso	23
X	Obtenção dos soros dos animais	26
XI	Pesquisa de anticorpos específicos para hemácias de carneiro	26
XII	Pesquisa de auto-anticorpos	27
XIII	Análise da significância dos resultados	27
RESULTADOS		28
<hr/>		
1	Purificação e análise dos anticorpos "naturais"	29
2	Determinação do PFC-reverso nos baços de animais tratados com anticorpos "naturais" IgM 1.3.80	37
3	Título de anticorpos séricos específicos para eritrócitos de carneiro de animais tratados ou não com anticorpos "naturais" IgM 1.3.80	40
4	Pesquisa de auto-anticorpos	42
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS		47
CONCLUSÕES		56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSS- Solução Salina Balanceada

PFC- Células Formadoras de Placas

DEAE- Dextran- Dietilaminoetil-Dextran

---

E C- Eritrócito de Carneiro

ELISA- Imunoensaio Enzimático

Ig- Immunoglobulina

PBS- Solução Salina Tamponada

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio

SPF- Livre de Patógeno Específico

TNP-BSA- Trinitrofenil-Soroalbuminabovina

## SUMÁRIO

Neste trabalho foi investigada a influência de anticorpos "naturais" obtidos de camundongos BALB/c neonatos na resposta de camundongos BALB/c adultos para eritrócitos de carneiro (E.C.), com ênfase no estudo da ativação policlonal resultante e da produção de auto-anticorpos para os antígenos miosina, colágeno, laminina e TNP-BSA.

Camundongos BALB/c adultos foram previamente inoculados por via endovenosa com duas doses do anticorpo monoclonal "natural" IgM 1.3.80 (HOLMBERG *et alli*, 1986) de 25  $\mu$ g num intervalo de 2 dias. Após 2 dias, estes animais foram estimulados com E.C. Passados 5 dias, os baços foram retirados para determinação do número de células secretoras de imunoglobulinas por PFC-reverso, e o soro obtido para determinação do título de anticorpos específicos para E.C. e para os auto-antígenos.

Os resultados demonstraram que o tratamento prévio dos camundongos com os anticorpos "naturais" e posterior imunização com E.C., reduziu o número de células produtoras de imunoglobulinas totais e aumentou o número de células produtoras de IgM. Entretanto, estas alterações no número de células secretoras de imunoglobulinas não alterou o título de anticorpos específicos para E.C.

Quanto ao título de auto-anticorpos, houve um aumento para o antígeno colágeno em animais tratados com anticorpos "naturais" e estimulados com E.C.

Estes resultados sugerem uma modulação na atividade imunológica por anticorpos "naturais" de neonatos.

A ativação policlonal induzida por E.C. ocasionou alterações no título de auto-anticorpos, com aumento para os antígenos miosina e TNP-BSA.

---

## **INTRODUÇÃO**



O desenvolvimento da imunologia foi motivado pela preocupação com a descoberta de tratamentos e prevenção de doenças infecciosas causadas por fungos, vírus, bactérias e parasitas. O maior desafio tem sido o controle de moléstias, na tentativa de abolir agentes que podem causar qualquer dano ao hospedeiro.

Historicamente, o estudo da imunologia tem abordado a descrição das reações imunes contra estes agentes, dando ênfase à existência de formas específicas de resistência às infecções (CANGUIHERM, 1977; SILVERSTEIN, 1979).

O agente infeccioso depois de vencer as barreiras físicas de que o organismo dispõe, enfrentará os mecanismos de defesa do hospedeiro, culminando com o processo inespecífico, denominado inflamação.

O fenômeno inflamatório pode ser compreendido como reações coordenadas do organismo contra lesões causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos, assumindo uma importância essencial nos mecanismos de defesa contra estes agentes, e manutenção da homeostasia. Durante este processo, diferentes sistemas enzimáticos são acionados e uma série de células são ativadas, com produção e/ou liberação de mediadores químicos tais como histamina, serotonina, fatores quimiotáticos, bradicinina, leucotrienes, prostaglandinas, heparina, enzimas hidrolíticas etc.

As células fagocíticas migram para o local onde produzem e liberam mediadores inflamatórios como Interleucina 1, Fator de Necrose Tumoral alfa, leucotrienes e outros fatores lipídicos que aumentam a permeabilidade vascular e formação de exudato rico em proteínas e edema local.

Muitas vezes durante o fenômeno inflamatório, o mecanismo de defesa específico é também acionado. Para que este ocorra, células do sistema imune são capazes de reconhecer especificamente o epítipo antigênico processado por uma célula apresentadora de antígeno.

Para reconhecer especificamente um determinante antigênico, o sistema imune é constituído por um grande número de células: os linfócitos, que possuem em sua membrana estruturas moleculares (receptores), capazes de se ligar a estes determinantes, e com os quais se combinam, e as células apresentadoras, em geral macrófagos ou similares derivados de monócitos.

As células da linhagem linfóide originam-se na medula óssea, onde ocorre também a maturação da célula B (HARDY *et alli*, 1991). Entretanto, a linhagem de células T migra para o timo, onde sob a influência de hormônios tímicos, se diferencia em célula madura, apresentando de acordo com o estágio de maturação, uma série de receptores e mudanças histoquímicas (MOUSTAFA *et alli*, 1992).

A função efetora da célula T foi sugerida pela primeira vez por MILLER em 1961, observando que timectomia numa fase precoce do desenvolvimento diminui severamente a magnitude das respostas celulares.

Estes linfócitos, em geral, não são capazes de se ligar diretamente à substâncias antigênicas. O material deve primeiro ser processado por células acessórias e depois apresentado ao linfócito T, sendo que o receptor capaz de reconhecer o material estranho é o TCR (receptor de célula T). Na apresentação do epítipo antigênico, o TCR reconhece, na célula apresentadora, o antígeno processado junto com o produto de um complexo genético chamado Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), expresso por moléculas de antígeno de classe II ou de classe I, em dependência do processamento de material exógeno ou endógeno (NEEFJES & MOMBURG, 1993), sendo que alguns detalhes do mecanismo de processamento e apresentação tem sido elucidados (SCHWARTZ, 1984; BJOKRMAN, 1987; BUSS *et alii*, 1987).

Dentre os clones de células T maduras, estas se diferenciam funcionalmente em células T citotóxicas e células T helper. As primeiras são estimuladas por anti-

genos endógenos, muitos dos quais derivados de patógenos ou parasitas intracelulares associados com moléculas do MHC classe I, e possuem o fenótipo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Já, as células T helper estão associadas a antígenos exógenos, os quais reconhecem através de seu TCR na célula apresentadora de antígeno junto com a molécula de CHP classe II.

Entre os clones de células T helper, dois tipos distintos tem sido descritos, as células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)(MOSMANN & COFFMAN, 1989). Estas se diferenciam pelo padrão de linfocinas sintetizadas, onde Interleucina 2 e Interferon são produzidos por células Th1 enquanto que Interleucinas 4, 5, 6 e 10 são produzidas principalmente por células Th2 (PAUL, 1992).

A diferença no padrão de liberação de linfocinas diferencia funcionalmente estas células na habilidade de estimular a produção de certos isotipos de Imunoglobulinas (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Os linfócitos B são responsáveis pela resposta imune humoral e, quando estas células são ativadas, se diferenciam em plasmócitos e secretam imunoglobulinas, exercendo desta maneira sua função efetora.

Quanto a ativação, os linfócitos B podem ser ativados através do auxílio de linfócitos T, que envolve o contato entre a célula T auxiliar e a célula B. Este contato ativa a célula T a produzir fatores solúveis, responsáveis pela expansão e maturação da célula B em plasmócito e secreção de imunoglobulinas. Em situações experimentais, o ligante pode ser um mitógeno que se liga a seu receptor ou um anticorpo IgM-específico.

As células do sistema imunológico estão constantemente em comunicação, tanto diretamente através de contato celular, quanto através de produção e liberação de linfocinas, tornando ainda mais complexa as interações celulares e o sistema imunológico como um todo. Uma das principais características do sistema

imunológico é a diversidade de seu repertório de células T e B. Cada organismo é capaz de produzir uma grande variedade de anticorpos por meio de rearranjos gênicos e mutações somáticas (TONEGAWA, 1983).

Cada indivíduo pode formar potencialmente  $10^8$  a  $10^9$  moléculas de imunoglobulinas com diferentes especificidades (PAIGE, 1989), e uma variedade similar de receptores de linfócitos T (PEREIRA *et alii*, 1989). Portanto, o sistema imune é capaz de reconhecer um grande número de estruturas antigênicas.

Segundo BURNETT, 1957, as respostas específicas que um organismo é capaz de executar, resultam da ativação de clones linfocitários selecionados por um dado antígeno. Deste modo, um indivíduo é capaz de produzir todos os anticorpos antes de ser exposto ao antígeno.

A expansão desta idéia consagrou a teoria clonal de funcionamento do sistema, onde um linfócito é programado para expressar receptores de uma dada especificidade, e prolifera após o encontro de um antígeno complementar. O resultado é ativação e expansão de clones de células de mesma complementariedade selecionados de uma grande população.

Sob a ótica da seleção clonal, os fenômenos imunológicos são vistos como produto da ação isolada de linfócitos, não mostrando qualquer dependência de interações entre os clones, mas dependentes inteiramente da presença do antígeno, onde esta distribuição clonal de receptores específicos para o antígeno, tanto em célula B quanto em célula T, asseguram a especificidade da resposta imunológica. Esta teoria proporcionou um grande avanço à imunologia, ajudando no esclarecimento dos mecanismos de reconhecimento de estruturas estranhas e regulação da resposta imune específica.

Uma das questões centrais em imunologia é a propriedade do sistema imune reconhecer uma variedade tão grande de determinantes antigênicos sem que isto

resulte numa auto-agressão.

A idéia de que o sistema imune aprende a discernir entre o que lhe é próprio e o que é estranho foi sugerida pela primeira vez por OWEN *et alii* em 1946.

Na hipótese de BURNETT e FERNNER, 1949, a exposição de antígenos ao sistema imune numa fase precoce do desenvolvimento, preveniria mais tarde a resposta a estes antígenos através da deleção destes linfócitos. Desta maneira, todas as estruturas moleculares próprias, seriam expostas a estes linfócitos nesta fase inicial do desenvolvimento.

Quanto à célula B, experimentos utilizando animais transgênicos revelaram vários mecanismos de tolerância a antígenos próprios como anergia clonal (GOODNOW *et alii*, 1988), deleção clonal (NEMAZEE & BURKI, 1989) e inativação funcional (ERIKSON *et alii*, 1991) como mecanismos de tolerância .

Para as células T, foi demonstrado que o encontro intratímico com antígenos próprios, pode resultar numa eliminação de timócitos que seriam reativos com este antígeno em diferentes estágios da maturação (KAPPLER *et alii*, 1987; KISIELOW *et alii*, 1988; SHA *et alii*, 1988; PIRCHER *et alii*, 1989).

Alguns investigadores acreditam que a deleção de clones auto-reativos de células T no timo não deve ser completamente efetivo, e que a manutenção da tolerância deve envolver mecanismos periféricos como anergia clonal (RAMMENSEE *et alii*, 1989) e ou supressão (MOLLER, 1991). Assim, a indução da tolerância no compartimento de células T extra ou intratimicamente, resultaria na ausência ou anergia de células T que seriam requeridas para a ativação de linfócito B, desde que todos os antígenos próprios fossem T dependentes.

Diversos pesquisadores demonstraram que auto-anticorpos existem em quantidades mensuráveis no soro de indivíduos normais, entre eles PRABHAKAR *et alii*, 1984. Foi demonstrada também alta frequência de anticorpos auto-reativos

em mielomas humanos (GUILBERT *et alii*, 1982). Anticorpos monoclonais isolados de indivíduos normais reagem com uma grande variedade de estruturas moleculares próprias, tais como antígenos nucleares, proteínas séricas, hormônios e marcadores de superfície celular (DIGHIERO, *et alii*, 1982, 1983, 1985). Estas observações confirmam a falta de correlação entre a presença, concentração e afinidade de auto-anticorpos e sintomatologia de uma doença auto-imune. A detecção de uma alta frequência de auto-anticorpos não acarreta necessariamente doença auto-imune, como foi relatado por YADIN *et alii*, 1989 em indivíduos acompanhados sorologicamente e clinicamente durante 5 anos, sugerindo que estes anticorpos devem existir fisiologicamente em indivíduos normais.

---

A possibilidade de que anticorpos podem ser produzidos contra a região Fab de outros anticorpos foi sugerida por EHRLICH e MORGENROTH (HILMMELWEIT, 1956) onde propuseram que a auto-imunidade a eritrócitos, poderia ser prevenida por auto-antilisina, que se combina a anticorpos que lisam os eritrócitos. Nesta época pouco se sabia a respeito da natureza química dos anticorpos.

O conceito de idiotipia teve sua primeira base experimental em 1955 com SLATER *et alii* que demonstrou que proteínas de mieloma humano possuíam determinantes antigênicos únicos que não estavam presentes em outras proteínas de mieloma ou em imunoglobulinas normais, visto que o anti-soro ainda regia com o imunógeno inicial depois de uma extensa absorção com imunoglobulinas normais e um painel de mielomas não relacionados. Em 1963, OUDIN e MICHEL provaram que estes determinantes antigênicos estavam presentes também em imunoglobulinas normais e eram capazes de induzir a formação de anticorpos heterólogos, evidenciando desta maneira a existência de determinantes antigênicos que chamaram idiotipos, distribuídos clonalmente nos receptores de linfócitos B, que podiam ser

reconhecidos por outros anticorpos, então denominados anti-idiotipos. Em 1974, RODKEY purificou anticorpos de coelhos imunizados e induziu a formação de anticorpos anti-idiotipo no mesmo animal.

Descobertas desta natureza deram base a JERNE (1974), para a formulação de novas idéias em direção á teoria da rede idiotípica. Jerne propôs a existência de uma rede de interações entre anticorpos baseada no reconhecimento de idiotipos por outro anticorpo (anti-idiotipo) e este por outro anticorpo (anti-anti-idiotipo). Nesta nova concepção, o sistema imune é funcional mesmo na ausência do antígeno, com interações que teriam um papel fundamental na regulação e manutenção do equilíbrio do sistema imune. A exacerbação da atividade anti-idiotípica de alguma especificidade clonal resultaria na perturbação de outros clones, possivelmente de todo o repertório de anticorpos. Num contexto geral, todas as interações idiotípicas seriam controladas por um conjunto de reações de inibição ou ativação, capazes de manter um equilíbrio dinâmico da rede.

Mais tarde, houve a confirmação que linfócitos T também expressavam idiotipos (COUTINHO & FORNI, 1985) e, quando idiotipos presente nos receptores de linfócito T reagem com paratopos nos receptores de linfócito B ou vice-versa, seriam criadas condições para ativação destes linfócitos (TITE **et alii**, 1986; JANEWAY, 1986), ampliando-se a rede de conexões.

Tais evidências sugerem que o sistema imune deve ter uma organização interna que tem como ponto de apoio seus próprios elementos (antígenos próprios, linfócitos B, linfócitos T (VAZ **et alii**, 1984), e onde a resposta imune a antígenos próprios está interconectada dentro de uma rede de interações envolvendo anticorpos, linfócitos T e linfócitos B (COUTINHO **et alii**, 1984; ZANNETTI, 1986; MARTINEZ **et alii**, 1988).

Evidências de interações idiotípicas na regulação da resposta auto-imune fo-

ram confirmadas através do uso terapêutico de imunoglobulinas que inibiam a atividade de auto-anticorpos (ROSSI **et alii**, 1989), imunizações com receptor de linfócito T induzindo proteção contra encefalomielite (VANDENBARK **et alii**, 1989) e através da produção de anticorpos anti-idiotipo na prevenção de outras doenças auto-imunes (HAHN & EBLING, 1984; ROUBATY **et alii**, 1990).

Estudos da fisiologia do sistema imune demonstram que a população de linfócitos T e B em camundongos normais, apresentam alta reciclagem, com níveis de produção e morte diária de 30 a 50% do pool total (FREITAS **et alii**, 1986). A sobrevivência destes linfócitos depende da afinidade a componentes do próprio organismo, de modo que a célula sem afinidade a componentes próprios tem reciclagem rápida, significando que linfócitos desconectados tem uma vida mais curta que aqueles com afinidade para a rede imunológica (COUTINHO, 1989). Assim, os linfócitos devem existir em duas condições: o estado de repouso, onde a atividade metabólica das células é baixa e os receptores de membrana para crescimento e diferenciação são poucos; e o estado ativado, onde ocorre aumento de tamanho da célula, o ciclo mitótico é ativado e ela expressa em sua membrana, muitos receptores para fatores de crescimento e diferenciação (COUTINHO **et alii**, 1987). Grande proporção desses linfócitos morrem poucas horas depois de serem gerados, sem abandonar o estado de repouso. As células sobreviventes provavelmente permaneceriam vivas estabelecendo contato com outros linfócitos e células que tenham sido previamente ativadas pelo meio interno.

Mesmo em camundongos "germ-free", mantidos com dieta de baixo peso molecular, existe um considerável nível de ativação interna entre os compartimentos de linfócitos, possuindo um alto nível de atividade determinada pelo próprio ambiente. Esta população constitui 10 a 20% da totalidade das células, e está concentrada no baço desses animais (PEREIRA **et alii**, 1986), constatando-se uma



atividade autônoma do sistema imune. Estas células ativadas sem a presença do antígeno são denominadas células "naturalmente" ativadas.

Estudo dessa população em camundongos normais, a partir da obtenção de hibridomas provenientes da fusão de células B desse repertório com células SP2/0, mostraram que anticorpos formados por essas células podem interagir funcionalmente por complementariedade idiotípica com células T do mesmo repertório presentes no mesmo indivíduo (LYMBERY *et alii*, 1985).

Estes anticorpos possuem um alto grau de conexão idiotípica (COUTINHO *et alii*, 1987) e tem complementariedade à um grande número de ligantes, entre eles auto-antígenos (PORTNOI *et alii*, 1986), além de apresentarem um alto grau de multirreatividade, sugerindo sua participação no estabelecimento da rede idiotípica.

A característica de auto-reatividade não tem conotação patológica, mas deve fazer parte de uma das interações importantes para a regulação da atividade linfocitária e da auto-imunidade. Foi também demonstrado que imunoglobulinas "naturais", além de reagirem fisiologicamente com vários antígenos de natureza autóloga, também possuem reatividade com várias moléculas envolvidas na resposta imune (BERNEMAN *et alii*, 1992).

O fato de auto-anticorpos "naturais" multiespecíficos serem encontrados tanto em condições normais quanto em condições patológicas, abre a questão da fronteira existente entre os estados fisiológico e patológico de auto-imunidade. O último poderia representar uma exacerbação do primeiro (MATSIOTA *et alii*, 1990).

Em um sistema onde ocorre uma auto-organização, as fases iniciais do processo são de grande importância no estabelecimento de atividades futuras, como é o caso do sistema imune, por isso, tornou-se de fundamental importância o estudo do

sistema imunológico numa fase inicial do desenvolvimento.

Para maior entendimento desta etapa inicial, uma amostra representativa do repertório linfocitário "natural" de camundongos neonatos, foi obtida através da derivação de hibridomas provenientes da fusão de células de baço de animais normais de 6 dias de idade com células SP2/0 (KOHLER **et alii**, 1976). Pôde se observar, a partir desta amostra, que a maioria dos hibridomas produziam imunoglobulinas da classe IgM. Algumas características puderam ser observadas através do estudo desta população:

Um alto grau de conexidade entre os anticorpos deste repertório, onde aproximadamente metade dos anticorpos monoclonais reagem com uma grande proporção com outros do mesmo grupo (HOLMBERG **et alii**, 1984);

Uma alta frequência de reações positivas com anticorpos anti-idiotipos (HOLMBERG **et alii**, 1986; ARAÚJO **et alii**, 1987), além de conexão idiotípica com célula T (ARAÚJO **et alii**, 1987), demonstrando também alto grau de conexidade idiotípica envolvendo célula B e célula T;

Reatividade com um largo espectro de antígenos, inclusive de natureza autóloga, demonstrando também uma alta multiespecificidade e auto-reatividade (DIGHIERO **et alii**, 1985; SOUROUJON **et alii**, 1988).

Estas características citadas sugerem a participação deste repertório numa rede de interações, e que o sistema imune se inicia tendo como referencial seus próprios elementos, sendo que estas interações são importantes no desenvolvimento do sistema imune normal.

A consequência funcional desta conexidade de anticorpos de neonato têm sido demonstrada por vários trabalhos:

A injeção de pequenas doses destes anticorpos em camundongos adultos leva a alterações de seus idiotipos complementares (LUNDKVIST **et alii**, 1989);

Alterações nas concentrações de anticorpos "naturais" em neonato pode levar a modulação da resposta auto-imune na vida adulta (SUNDBLAD *et alii*, 1989);

Perturbação da rede idiotípica composta por este repertório, tanto diretamente pela inoculação de IgMs deste mesmo grupo, quanto pelo pré tratamento de mães com anticorpos anti-idiotipo da classe IgG conectados idiotipicamente a anticorpos de camundongo neonato, leva a profundas alterações no repertório de células B, sugerindo a participação destes anticorpos "naturais" no estabelecimento de todo o repertório imunológico (VAKIL & KEARNEY, 1986; VAKIL *et alii*, 1986). Esta participação no estabelecimento do repertório imunológico também pôde ser demonstrada através do tratamento de camundongos neonato com anti- $\mu$ , resultando na ausência de desenvolvimento de célula T (GORDON *et alii*, 1989). A influência das células B no estabelecimento do repertório de células T já havia sido demonstrada (MARTINEZ *et alii*, 1985).

Este grupo de células "naturalmente" ativadas no animal adulto corresponde a aproximadamente 10% do total de linfócitos do baço e, possivelmente esta população contém uma fração menor deste grupo de linfócitos com as características de alta conectividade que o camundongo neonato (HOLMBERG *et alii*, 1986). Entretanto, uma grande proporção destes anticorpos multirreativos são preservados no camundongo adulto isento de germe, como foi demonstrado pela produção de hibridomas derivados de células B induzidas por LPS (BOS *et alii*, 1989).

No camundongo adulto, existem evidências de que esta população "naturalmente" ativada de linfócitos participa de interações importantes na manutenção do equilíbrio imunológico (COUTINHO *et alii*, 1987).

A participação deste grupo de células na regulação da auto-imunidade já foi demonstrada (SUNDBLAD *et alii*, 1989), existindo também a possibilidade de estarem relacionadas com a regulação da resposta imune á qualquer antígeno, seja ele

de natureza autóloga ou não.

Com relação à utilização de famílias de gene VH, foi estabelecido que esta população multirreativa de camundongos neonatos utiliza preferencialmente a família 7183 (ZANETTI *et alli*, 1987; BOS *et alli*, 1989), e, no camundongo adulto isento de germe, esta família também é preferencialmente utilizada por anticorpos multirreativos (BOS *et alli*, 1989). Em humanos nenhuma correlação foi ainda estabelecida entre a utilização das famílias VH e a poliespecificidade dos clones, sugerindo que a poliespecificidade não está ligada à um repertório restrito (GUIDOU *et alli*, 1991).

---

Um grupo de investigadores demonstrou que uma pequena proporção de imunoglobulinas produzidas, resultante da administração do antígeno, é antígeno específica, e, que muitos clones de linfócitos que não possuem relação direta com o antígeno também são ativados (ROSEMBERG & CHILLER, 1979). Esta ativação policlonal de células B é característica em infecções com vários antígenos isolados (LPS e eritrócitos de carneiro) (ROSEMBERG & CHILLER) ou agentes patogênicos, como vírus, bactérias e parasitas (STELLRECHT & VELLA, 1992; MINOPRIO *et alii*, 1986).

A ativação policlonal de células B tem sido um dos mecanismos propostos que levaria a um aumento de produção de imunoglobulinas auto-reativas, e, estaria conseqüentemente associada a indução de uma doença auto-imune (DZIARSKI, 1988; STELLRECHT & VELLA, 1992).

Sabendo-se das características de multirreatividade e conexidade das imunoglobulinas naturais de camundongos neonatos (HOLMBERG *et alli*, 1984; HOLMBERG *et alii*, 1986; ARAÚJO *et alli*, 1987), e, considerando-se que a estimulação de camundongos com eritrócitos de carneiro promove uma ativação policlonal, a proposta do presente trabalho foi a seguinte: verificar a capacidade de in-

tervenção destas imunoglobulinas "naturais", quando previamente inoculadas em camundongos adultos:

1 - Na resposta imunológica de camundongos adultos frente á eritrócitos de carneiro:

a) através da determinação no baço desses animais no número de células produtoras de anticorpos sem especificidade definida.

b) através da medida do título de anticorpos séricos para eritrócitos de carneiro (hemaglutinação).

2 - Na resposta imunológica de camundongos adultos á alguns auto-antígenos: através da medida do título de anticorpos séricos para os antígenos colágeno, mielina, miosina e TNP-BSA.

a) através da medida do título de anticorpos séricos para os antígenos acima (ELISA).

## PROCEDIMENTO GERAL

Para utilização no modelo animal, os anticorpos monoclonais "naturais" IgM 1.3.80 e IgM 1.5.24 foram previamente purificados de fluido ascítico. Os métodos utilizados foram os seguintes: cromatografia em coluna de Sephadex G-200 (IgM 1.3.80) e/ou precipitação direta da ascite com uma solução de ácido bórico a 0,5% (IgM 1.5.24).

A análise das frações purificadas contendo IgM foi feita por imunodifusão e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

Após purificarmos o anticorpo IgM 1.3.80 por precipitação com ácido bórico a 0,5% (o método mais eficiente), a preparação contendo este anticorpo foi inoculada por via endovenosa em camundongos BALB/c An adultos num intervalo de 2 dias com duas doses de 25 µg. Depois de 2 dias, estes mesmos camundongos foram estimulados por via intraperitoneal com eritrócitos de carneiro. Passados 5 dias, estes animais foram sangrados para obtenção do soro, e os baços retirados para determinação do número de células secretoras de anticorpos através da técnica de PFC-reverso.

Os soros dos animais foram utilizados para determinação do título de anticorpos para eritrócitos de carneiro e para os auto-antígenos colágeno, miosina, mielina e TNP-BSA.

---

**MATERIAL E MÉTODOS**

## **I - ANIMAIS**

Camundongos BALB/c An fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, SPF (isento de patógeno específico), foram obtidos do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Estes animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia da Unicamp.

## **II - ANTÍGENOS**

Para a pesquisa de auto-anticorpos, foram utilizados os seguintes antígenos: laminina (CHARONIS *et alli*, 1985), TNP-BSA (LITTLE & EISEN, 1966), miosina (OFFER *et alii*, 1973) e colágeno tipo I (MILLER & RHODES, 1982), obtidos segundo os métodos citados no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

## **III - ANTI-SOROS**

Os anti-soros anti-IgM e anti-Ig total de camundongo utilizados neste trabalho, foram obtidos através da imunização de coelhos com IgM purificada, ou fração globulínica de soro normal de camundongo, respectivamente, segundo esquema de imunização proposto por BERNABÉ *et alli*, 1981.

Para a obtenção de anti-soro anti- $\mu$ , o anti-soro anti-IgM foi absorvido com fração globulínica de soro normal de camundongo isenta de IgM em condições padronizadas. Uma fração de 20 ml do soro anti-IgM foi misturada com 500  $\mu$ g de fração globulínica e deixado à 37°C durante 1 hora e em seguida colocado em geladeira até o dia seguinte. A seguir, esta mistura foi centrifugada à 7000 rpm durante 20 minutos, e o sobrenadante testado com a fração globulínica, resultando num soro monoespecífico. Os anti-soros anti-Ig total e anti- $\mu$  resultantes foram mantidos à -20°C até o momento do uso.



## IV - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS "NATURAIS"

### 1- PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

Os anticorpos monoclonais IgM 1.3.80 e 1.5.24 foram obtidos a partir de hibridomas derivados da fusão de células de baço de camundongo BALB/c An de 6 dias de idade com células SP2/0, cedidos pelo Professor Antônio Coutinho do Instituto Pasteur, Paris. Para obtenção da ascite,  $10^6$  células de hibridomas foram inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c An adultos e, após 5 dias, o líquido ascítico foi retirado para a obtenção de anticorpos monoclonais, e sua posterior purificação.

Para a purificação destes anticorpos 2 métodos foram utilizados:

#### 1.a - Cromatografia em coluna de Sephadex G-200

Depois da precipitação da ascite através da diálise contra tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 5,8, o material foi centrifugado à 3000 rpm, e o precipitado obtido diluído em PBS. Este material foi aplicado em coluna de Sephadex G-200 equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8,0. A eluição foi feita com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8,0, contendo 1,7 M de NaCl de acordo com BOUVET **et alli**, 1984. A dimensão da coluna utilizada foi de 37 x 2,5 cm de diâmetro, mantendo o fluxo de 10 gotas/minuto e o volume coletado por tubo de 2,0 ml. O monitoramento da densidade óptica do conteúdo dos tubos foi feita através da leitura em espectrofotômetro à 280 nm.

#### 1.b - Precipitação com ácido bórico

Um outro método utilizado para purificação foi através da precipitação destes anticorpos com ácido bórico à 0,5% (PADANYI **et alli**, 1990).

A precipitação foi feita à 4°C através da adição de uma solução de ácido bórico à 0,5% à ascite contendo os anticorpos monoclonais. Para cada 5 ml de ascite foi adicionado 10 ml de ácido bórico. A solução foi deixada 1 hora à 4°C e a seguir centrifugada à 3000 rpm durante 15 minutos. O precipitado obtido foi então dissolvido em PBS e dialisado contra a mesma solução.

Os anticorpos purificados pelos dois métodos foram então analisados por imunodifusão, eletroforese em gel de poliacrilamida à 10% contendo SDS e por ensaio imunoenzimático (ELISA).

---

## V - IMUNODIFUSÃO

As reações de imunodifusão foram realizadas segundo o método de OUCHTERLONY, 1949, modificado por GARVEY *et alii*, 1977. Essas reações foram feitas em lâminas de vidro 3 x 7,5 cm com agar a 1% em salina fisiológica.

Imune soros anti- $\mu$  e anti-soro total de camundongo foram utilizados para testar os anticorpos purificados (IgM 1.3.80 e IgM 1.5.24). Após aplicação das amostras no gel, as lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 24 horas à temperatura ambiente, lavadas em NaCl 0,15 M, secas e coradas por Comassie Blue à 0,5% em metanol:ácido acético:água destilada (45:10:45) durante 30 minutos e descoradas através de 2 incubações sucessivas de 15 minutos com uma solução de metanol:ácido acético:água destilada (45:10:45).

## VI - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS

A análise eletroforética foi feita segundo TAKACS, 1979. As amostras foram ajustadas para conter aproximadamente 20  $\mu$ g de proteína em cada porção do pente. As análises foram realizadas em gel de separação à 10%.

Como marcadores de peso molecular foram utilizados albumina bovina, 69 Kd, cadeia pesada de IgG, 50 Kd, ovalbumina, 45 Kd, anidrase carbônica, 29 Kd, e inibidor de tripsina (soy bean tryp), 20 Kd. A coloração do gel foi feita com solução de Comassie Blue à 0,5% durante 1 hora. O gel foi em seguida descorado através de várias incubações sucessivas de 15 minutos em solução descorante (a solução corante e descorante são as mesmas utilizadas na imunodifusão. O gel foi seco segundo método descrito por JUANG *et alii*, 1984.

## VII - ELISA - Ensaio Imunoenzimático

A reatividade padrão dos anticorpos "naturais" purificados (IgM), bem como a pesquisa de anticorpos auto-reativos nos soros de camundongos, foram ambas determinadas pela técnica de ELISA conforme as condições descritas por ARAÚJO *et alii*, 1987.

Microplacas de 96 wells foram sensibilizadas com 100 µl de concentrações padronizadas dos seguintes reagentes: colágeno (20 µg/ml), miosina (20 µg/ml), mielina (20 µg/ml) e TNP-BSA (10 µg/ml), laminina (20 µg/ml). As placas foram deixadas á 4°C por uma noite, e depois lavadas e saturadas com gelatina á 1%. A seguir foram adicionados os anticorpos purificados ou o soro dos animais a serem testados. Após 2 horas, as placas foram lavadas, acrescentado-se então 100 µl de anti-soros anti-Ig total e anti-µ de camundongo marcados com peroxidase. Passado 1 hora, as placas foram lavadas e a reação enzimática revelada pela adição do substrato, incubando-se em local escuro por 20 minutos. As reações foram interrompidas com HCl 3 M. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro á 492 nm.

## VIII - IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Para os experimentos grupos de 5 animais foram imunizados segundo a tabela descrita:

**Tabela de imunização dos animais:**

GRUPOS	DIAS/ VIAS DE INOCULAÇÃO DE ANIMAIS		
	0/ ENDOVENOSA	2/ ENDOVENOSA	4/ INTRAPERITONEAL
G 1	0,2 ml de salina 0,15 M	0,2 ml de salina 0,15 M	0,5 ml de salina 0,15 M
G 2	25 µg de IgM 1.3.80	25 µg de IgM 1.3.80	0,5 ml de salina 0.15 M
G 3	0,2 ml de salina 0,15 M	0,2 ml de salina 0,15 M	0,5 ml de EC à 2,5%
G 4	25 µg de IgM 1.3.80	25 µg de IgM 1.3.80	0,5 ml de EC à 2,5%

O PFC-reverso foi realizado 5 dias após a última inoculação.

## IX - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PFC-REVERSO

A determinação do número de células formadoras de placas, ou seja do número de células secretoras de imunoglobulinas foi feita segundo BERNABÉ et alii, 1981. Esse método permite a enumeração de células secretoras de imunoglo-

bulinas independente da especificidade antigênica dos anticorpos secretados (PFC-reverso).

### **A - CONJUGAÇÃO DAS HEMÁCIAS À PROTEÍNA-A DE *Staphylococcus aureus*.**

Hemácias de carneiro mantidas em Alsever, entre uma e três semanas, foram lavadas 3 vezes em solução salina. Em presença de 17 ml de cloreto de cromo (0,05 M) diluído 1/200, 850 µl de papa de hemácias de carneiro foi misturada com igual volume de proteína A (Sigma) na concentração de 0,5 mg/ml. Esta preparação foi incubada em banho Maria à 30°C durante 1 hora. Após este período as hemácias foram novamente lavadas 3 vezes em solução salina e uma vez em BSS. Para o PFC estas hemácias foram diluídas 1/3 em BSS.

### **B - PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAR**

Foi utilizado Bacto-Agar à 0,5% em meio BSS.

Após a dissolução completa em BSS (bacto-agar á 0,5%) do agar à quente, foi adicionada uma solução de DEAE-Dextran, preparada numa concentração de 50 mg/ml em meio BSS (pH 7,2 com NaOH 0,1 N), numa concentração de 1,5 ml de DEAE-Dextran/100 ml de agar.

O agar foi mantido em banho Maria à 46°C até o uso.

### **C - ANTI-SOROS DE COELHO ANTI-IMUNOGLOBULINAS DE CAMUNDONGO (ANTI Ig TOTAL E ANTI-µ)**

Os anti-soros anti-Ig total e anti-µ utilizados na técnica de PFC foram produzidos conforme item III.

Os anti-soros foram diluídos em meio BSS nas concentrações previamente

padronizadas para a técnica de PFC.

#### **D - COMPLEMENTO**

Soro normal de cobaia foi obtido a partir da sangria de 20 animais. A mistura dos soros foi então liofilizada e acondicionada à 20°C para ser utilizada como fonte de complemento. A titulação do complemento foi realizada em condições convencionais para determinação do CH 50 (KABAT & MAYER, 1971). Diluição adequada foi padronizada para o ensaio do PFC.

---

#### **E - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS E PREPARO DAS PLACAS**

O PFC foi realizado com células de baço de camundongos, pertencentes aos grupos descritos na tabela de imunização. Estas células foram obtidas a partir de maceração com pinça, seguida da homogeneização com pipeta Pasteur. Após 5 minutos em repouso, a suspensão celular foi coletada e as células lavadas 2 vezes em BSS contendo glicose 1%. As células foram suspensas em 10 ml. A seguir, foram feitas diluições destas células variando de 1/100 a 1/500. Todo o procedimento foi feito em banho de gelo.

Em pequenos tubos, mantidos no gelo, colocou-se 100 µl da suspensão de células diluídas e adicionou-se na seqüência:

- 1) 20 µl da suspensão de hemácias conjugadas à proteína A diluída 1/3;
- 2) 20 µl do anti-soro (anti Ig-total ou anti-IgM);
- 3) 20 µl de complemento na diluição padronizada;
- 4) 250 µl do agar.

O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vortex e espalhado uniformemente em uma placa de Petri(10 x 100 mm).

As placas de Petri foram incubadas durante 5 horas em estufa à 37°C, em

atmosfera úmida e a seguir feita a contagem manual das placas de hemólise.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Os controles foram realizados para o complemento, anti-soros e células isoladamente.

## **X- OBTENÇÃO DOS SOROS DOS ANIMAIS**

Antecedendo a retirada dos baços, os animais foram sangrados através do plexo braqueal e o sangue retirado com pipeta Pasteur. Os soros foram separados por centrifugação à 1500 rpm durante 15 minutos e armazenados à -20°C até o momento do uso.

## **XI- PESQUISA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA HEMÁCIAS DE CARNEIRO**

O título de anticorpos específicos para hemácia de carneiro foi determinado através da técnica de hemaglutinação direta (BIOZZI *et alii*, 1979).

Os soros foram diluídos em série (razão 2) com solução de PBS contendo 1% de gelatina, em placas de microtitulação, e as reações foram desencadeadas pela adição de igual volume de suspensão hemácia de carneiro à 0,5%.

O resultado foi avaliado após 2 horas à temperatura ambiente e, para confirmação, as placas foram deixadas até o dia seguinte à 4°C.

Para determinação do título de anticorpos resistentes ao mercaptoetanol, correspondente àqueles que não sofrem sulfidrólise pelo produto, os soros foram pré-tratados com igual volume de mercaptoetanol 0,1 M, durante 30 minutos antes da execução da reação acima descrita.

Como controle negativo foi utilizado PBS contendo 1% de gelatina no lugar do soro a ser testado, e, como controle positivo, um soro de camundongo

imunizado com hemácia de carneiro com um título aglutinante de 1/2096.

## **XII- PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS**

A presença de auto-anticorpos no soro dos animais imunizados foi realizada através da técnica de ELISA descrita no item VII, entretanto o passo de saturação das placas não foi utilizado para estes testes (MOHAMMAD & ESEN, 1989).

## **XIII- ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA DOS RESULTADOS**

Para o cálculo da significância dos resultados obtidos entre os grupos teste e controle no PFC-reverso, foi empregado o teste estatístico *t* de Students através do programa OXSTAT II.

Nos ensaios de ELISA, as absorbâncias expressam o resultado da soma das densidades ópticas de cada diluição do soro testada. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste *t* de Students.



---

**RESULTADOS**

## **1 - PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS ANTICORPOS "NATURAIS".**

Para a purificação dos anticorpos "naturais" (IgM 1.3.80 e IgM 1.5.24), os hibridomas secretores destas imunoglobulinas, até então congelados, foram colocados em cultura para expansão e depois inoculados em camundongos Balb/c para obtenção do fluido ascítico correspondente.

As ascites contendo estes anticorpos foram submetidas a uma série de fracionamento e análise imunoquímica visando sua purificação e caracterização para sua utilização no modelo animal.

---

### **1.1- Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 a baixa força iônica**

Para a purificação dos anticorpos monoclonais, um dos métodos utilizados foi a cromatografia em coluna de Sephadex G-200 á baixa força iônica.

Amostras de 6,5 ml de ascite precipitados através de diálise à baixa força iônica (0,005 M pH 5,8) contendo o anticorpo monoclonal IgM 1.3.80 numa concentração média de 2,1 mg/ml, eram aplicadas em coluna equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 8,0. Como resultado de uma dessas cromatografias, conforme mostra a figura 1, duas frações eram obtidas como mostrado no perfil cromatográfico resultante.

Nas condições descritas, o sistema impede que as moléculas de IgM monoclonais sejam eluídas na primeira fração apesar de seu alto peso molecular de 970 Kd. Devido as baixas concentrações salinas, ocorre um aumento na viscosidade da imunoglobulina, fazendo com que sua passagem pela coluna fique retardada, sendo depois eluída com um tampão contendo uma alta concentração salina, o que faz com que as moléculas de IgM sejam eluídas na última fração ( F2, figura 1). O rendimento resultante da cromatografia foi de 2 mg de IgM 1.3.80.

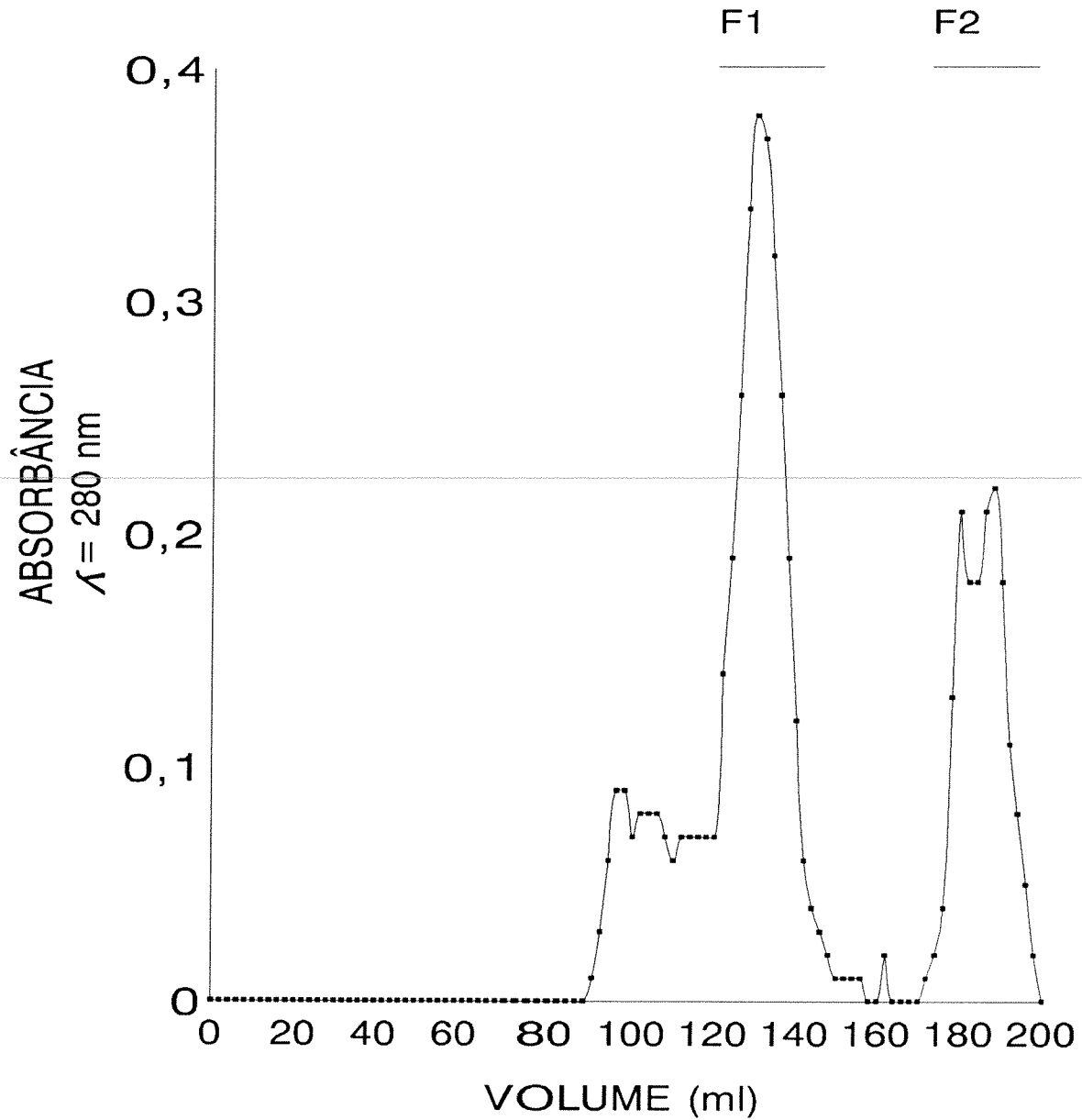


FIGURA - 1 Cromatografia de ascite contendo a IgM monoclonal 1.3.80 em coluna de Sephadex G-200, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,005 M.

### 1.2- Precipitação de IgM monoclonal com ácido bórico á 0,5%.

Á fim de testar outro método de purificação de IgM, a ascite contendo IgM 1.5.24 e foi submetida á precipitação com ácido bórico á 0,5% (1 ml de ascite: 20 ml de ácido bórico).

O rendimento da IgM foi de 2,56 mg.

### 1.3- Análise do fluido ascítico antes da purificação

Para determinar a composição da ascite contendo o anticorpo monoclonal IgM 1.3.80, foi feita a respectiva análise eletroforética conforme ilustrado na figura 2 amostra nº 1, onde entre outras bandas se destacam a cadeia pesada da imunoglobulina correspondente á banda de peso molecular de 70 Kd e a cadeia leve de 24 Kd.

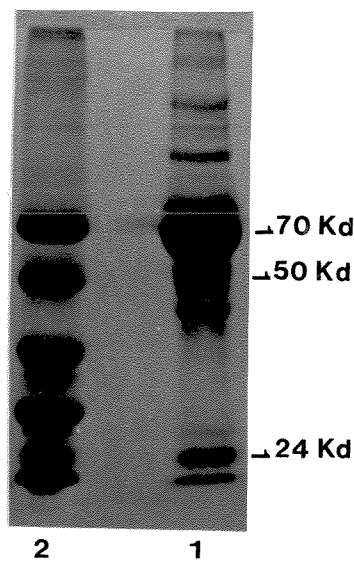


FIGURA 2- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida da ascite contendo a IgM monoclonal 1.3.80 antes do processo de purificação (nº 1). Ao lado temos como referencial os marcadores de peso molecular albumina bovina, 69 Kd; cadeia pesada de IgG, 50 Kd; ovalbumina, 45 Kd; anidrase carbônica, 29 Kd e inibidor da tripsina, 20 Kd (nº 2).

1.4- Análise da purificação dos anticorpos monoclonais IgM 1.3.80 e IgM 1.5.24.

A fração 2 contendo a IgM 1.3.80 purificada por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 a fração IgM 1.5.24 purificada com ácido bórico foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS com o objetivo de verificarmos o grau de pureza destas frações.

A figura 3 mostra que além das bandas correspondentes à cadeia pesada das imunoglobulinas IgMs, com peso molecular de aproximadamente 70 Kd e cadeia leve de aproximadamente de 24 Kd para IgM 1.3.80 e 26 Kd para IgM 1.5.24, várias bandas aparecem na análise da fração 2 obtida pela cromatografia (nº 1, 2, 6 e 7). A purificação da IgM 1.5.24 com ácido bórico levou à obtenção de uma amostra praticamente livre de contaminantes, pois, além das bandas correspondentes à cadeia pesada (70 Kd) e cadeia leve (26 Kd), praticamente não encontramos contaminantes (nº 3, 5 e 8).

Estes resultados orientaram a opção de obtenção das imunoglobulinas utilizadas no modelo animal (IgM 1.3.80) por precipitação com ácido bórico, sendo que uma amostra de ascite de 2 ml rendeu 2,35 mg de IgM 1.3.80.

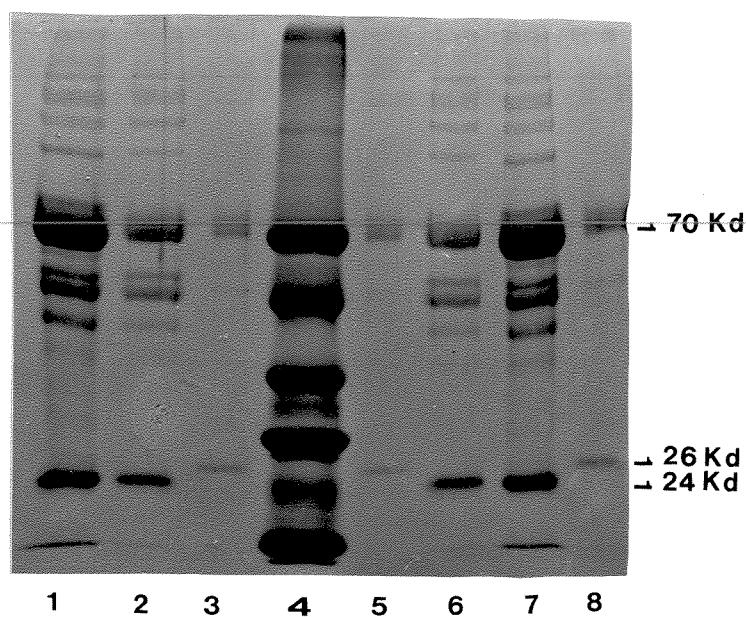


FIGURA - 3 Análise eletroforética em gel de poliacrilamida contendo SDS realizada com F 2 (nº 1, 2, 6 e 7) e ascite precipitada com ácido bórico (nº 3, 5 e 8). A amostra nº 4 corresponde aos marcadores de peso molecular albumina bovina, 69 Kd; cadeia pesada de IgG, 50 Kd; ovalbumina, 45 Kd; anidrase carbônica, 29 Kd e inibidor de tripsina, 20 Kd.

### 1.5- Análise por imunodifusão do anticorpos IgM 1.3.80 purificados.

A reatividade dos anticorpos monoclonais IgM 1.3.80 purificados por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 e precipitação com ácido bórico, foram submetidos á imunodifusão, para verificarmos as suas reatividades com soro específico para IgM (soro de coelho anti- $\mu$  de camundongo) e soro anti Ig total (soro de coelho anti-Ig total de camundongo).

A figura 4 A mostra a reação da fração F2 com anti-Ig-total com título de 1/8. A linha de precipitação proveniente desta reação se deve á presença de IgM, confirmada com a reação com anti- $\mu$  (B), onde se observa um título de até 1/32. Em C, a presença da IgM na fração obtida por precipitação com ácido bórico resultou num título de 1/16 com soro anti- $\mu$ .

---

Este resultado confirma a presença da IgM em ambas as frações testadas.

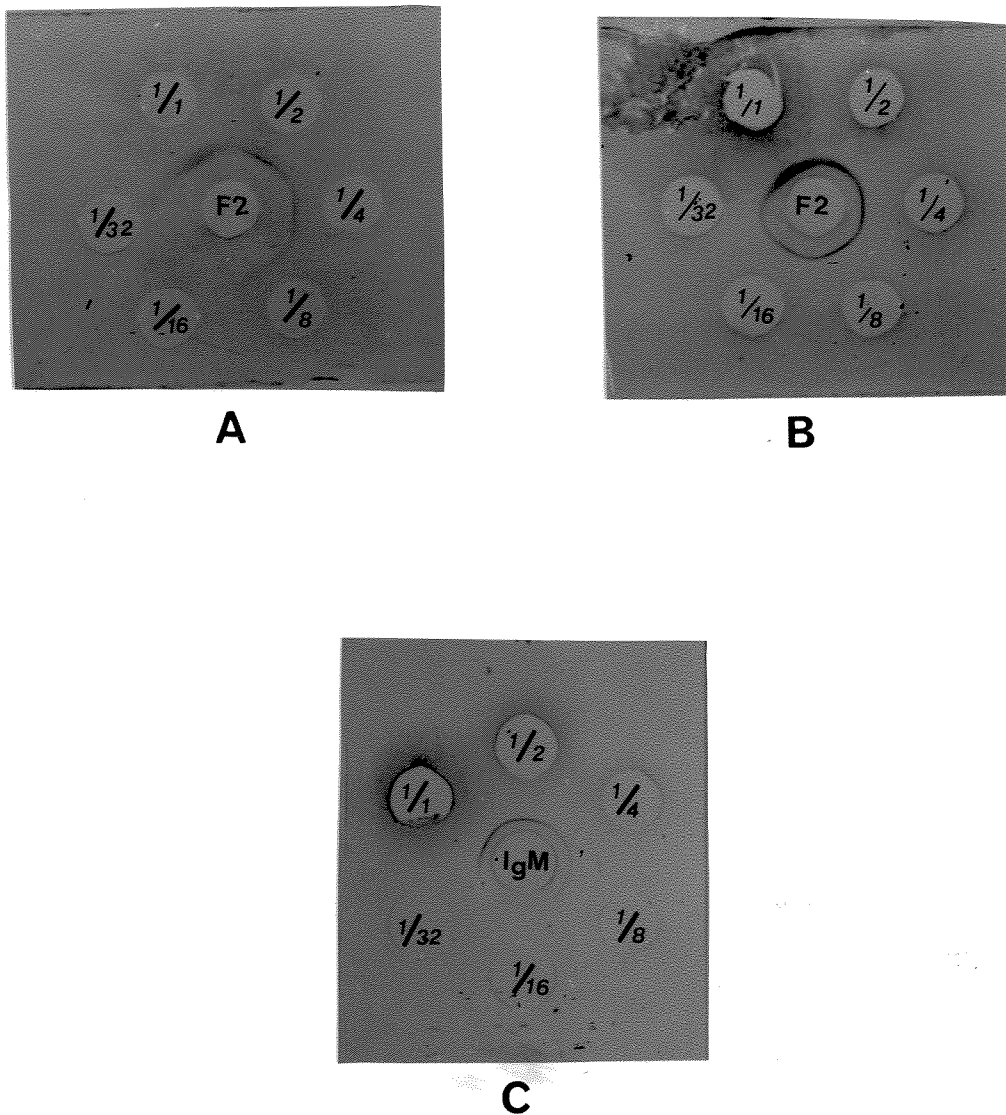


FIGURA - 4 Análise por imunodifusão da fração 2 obtida por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 (F 2) e da fração obtida por precipitação com ácido bórico. A = reação de F2 com anti-Ig total; B = reação de F2 com anti- $\mu$  e C = reação da fração obtida por precipitação com ácido bórico (IgM) com anti- $\mu$ .



### 1.6- Análise da reatividade dos anticorpos naturais.

Foi avaliada a reatividade dos anticorpos IgM 1.5.24 e IgM 1.3.80 com os antígenos colágeno, miosina, mielina e TNP-BSA através da técnica de ELISA.

A reatividade destes anticorpos para uma série de antígenos já havia sido mostrada anteriormente (HOLMBERG, 1987). A tabela 1 mostra que estes anticorpos mantiveram suas reatividades depois de purificados conforme indicação da literatura.

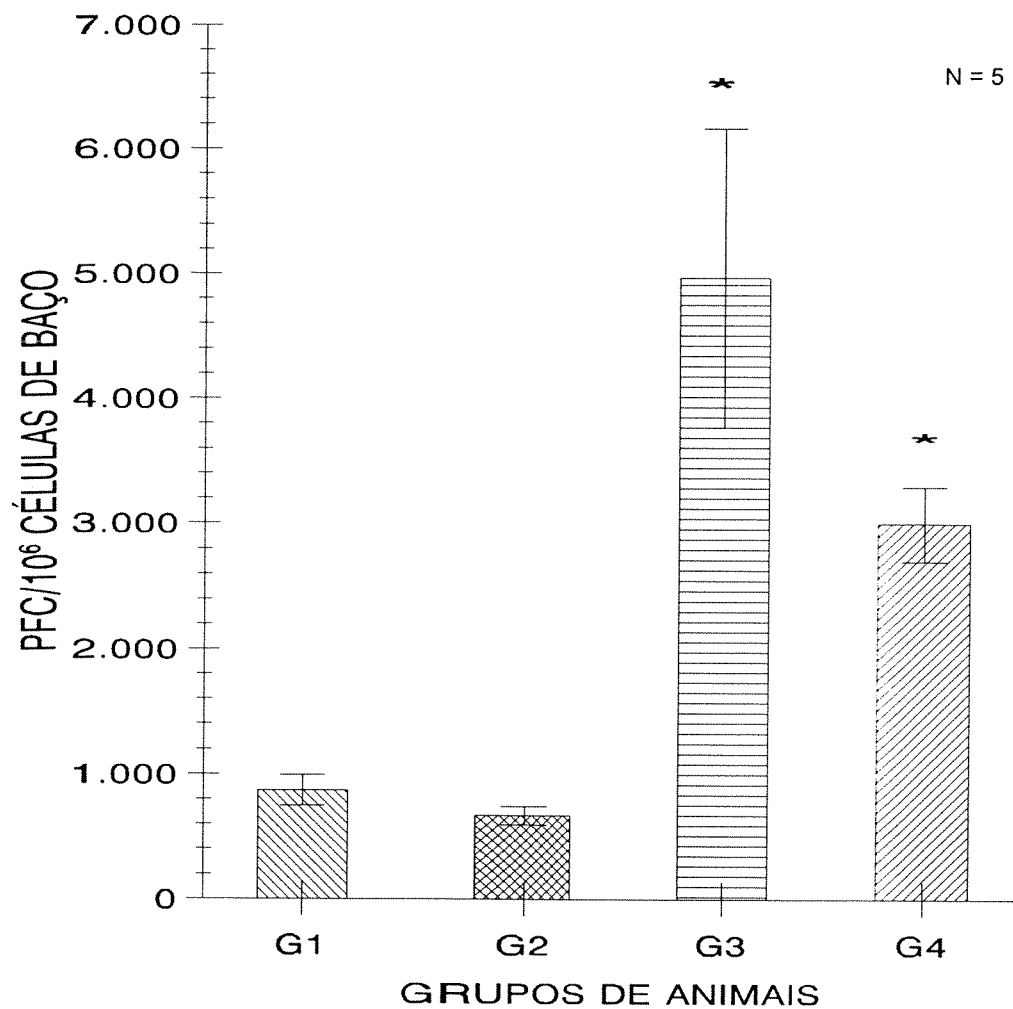
Tabela 1- Análise das IgMs purificadas por precipitação com ácido bórico à 0,5%, através da técnica de ELISA.

ANTICORPOS	ANTÍGENOS			
	colágeno	miosina	mielina	TNP-BSA
IgM 1.3.80	-	+	+	+
IgM 1.5.24	-	-	+	+

## 2- DETERMINAÇÃO DO PFC-REVERSO NOS BAÇOS DE ANIMAIS TRATADOS COM ANTICORPOS "NATURAIS" IgM 1.3.80

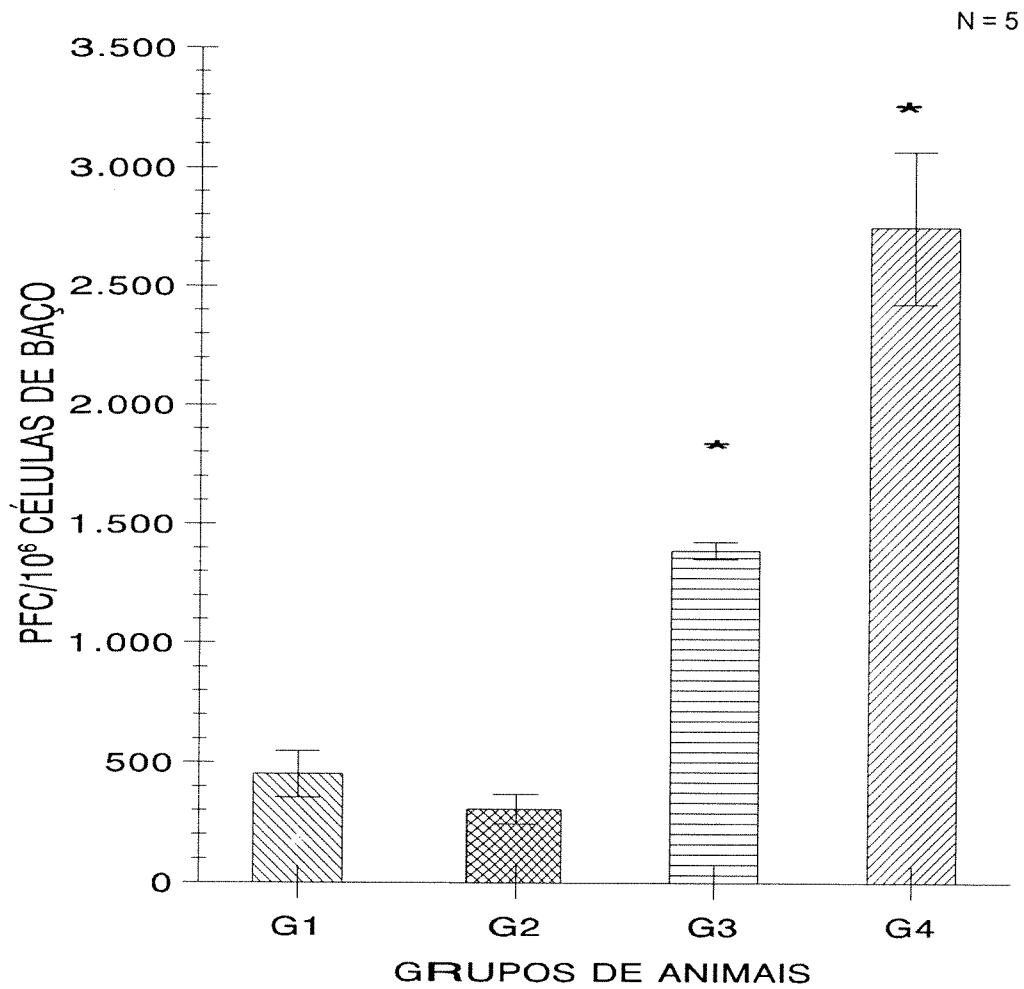
Com o objetivo de verificarmos que influência os anticorpos "naturais" IgM teriam sobre a atividade do sistema imunológico de camundongos normais ou estimulados com eritrócitos de carneiro, a técnica do PFC-reverso foi empregada para se determinar o número total de células secretoras, independente da especificidade dos anticorpos produzidos.

Como demonstrado nas figuras 5 e 6, o baço dos animais que receberam eritrócitos de carneiro e foram tratados com anticorpos "naturais" IgM, apresentaram um aumento do número de células secretoras de anticorpos totais e uma diminuição do número de células secretoras de IgM, quando comparados com baço de animais que receberam somente eritrócitos de carneiro (figuras 5 e 6). Entretanto, quando estes animais foram tratados somente com anticorpos "naturais", não houve diferenças quanto ao número de células secretoras de imunoglobulinas totais, nem quanto à secretoras do isótopo IgM em relação aos controles (figuras 5 e 6).



G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

FIGURA - 5 Número de células de baço de camundongos BALB/c secretoras de Ig-totais através da técnica de PFC - Reverso. \* P = 0,05.



**G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.**

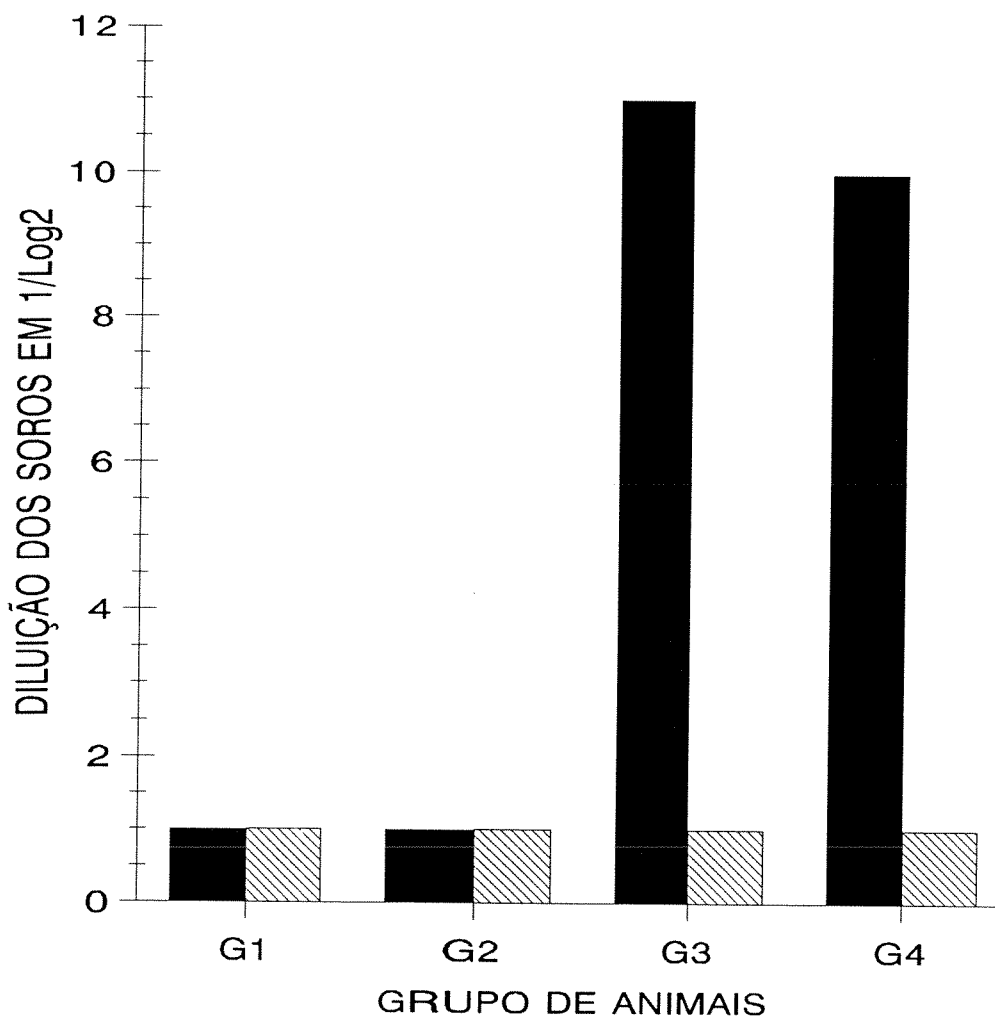
FIGURA - 6 Número de células do baço de camundongos BALB/c secretoras de imunoglobulinas do isótipo IgM através da técnica de PFC - Reverso. \* P = 0.025

### **3 - TÍTULO DE ANTICORPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS PARA ERITRÓCITOS DE CARNEIRO DE ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM ANTICORPOS "NATURAIS" IgM 1.3.80**

A produção de anticorpos específicos para eritrócitos de carneiro foi determinada em animais tratados ou não com anticorpos "naturais" e estimulados com eritrócitos de carneiro, através da técnica de hemaglutinação direta, com o objetivo de analisarmos se as alterações também se evidenciariam á nível de anticorpos específicos para hemácia de carneiro .

A figura 7 mostra que não houve diferença significativa quanto ao título de anticorpos para eritrócitos de carneiro em animais tratados ou não com IgM 1.3.80.

Foi também demonstrado que os anticorpos para eritrócitos de carneiro são praticamente do isótopo IgM, uma vez que o tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol reduziu o título para 1/2 em todos os soros dos animais testados (figura 7).



■ NÃO TRAT. C/ MERCAPTO. ▨ TRAT. COM MERCAPTO.

G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

FIGURA - 7 Título específico para eritrócitos de carneiro (E.C.) pela técnica de hemaglutinação.

#### 4- PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS

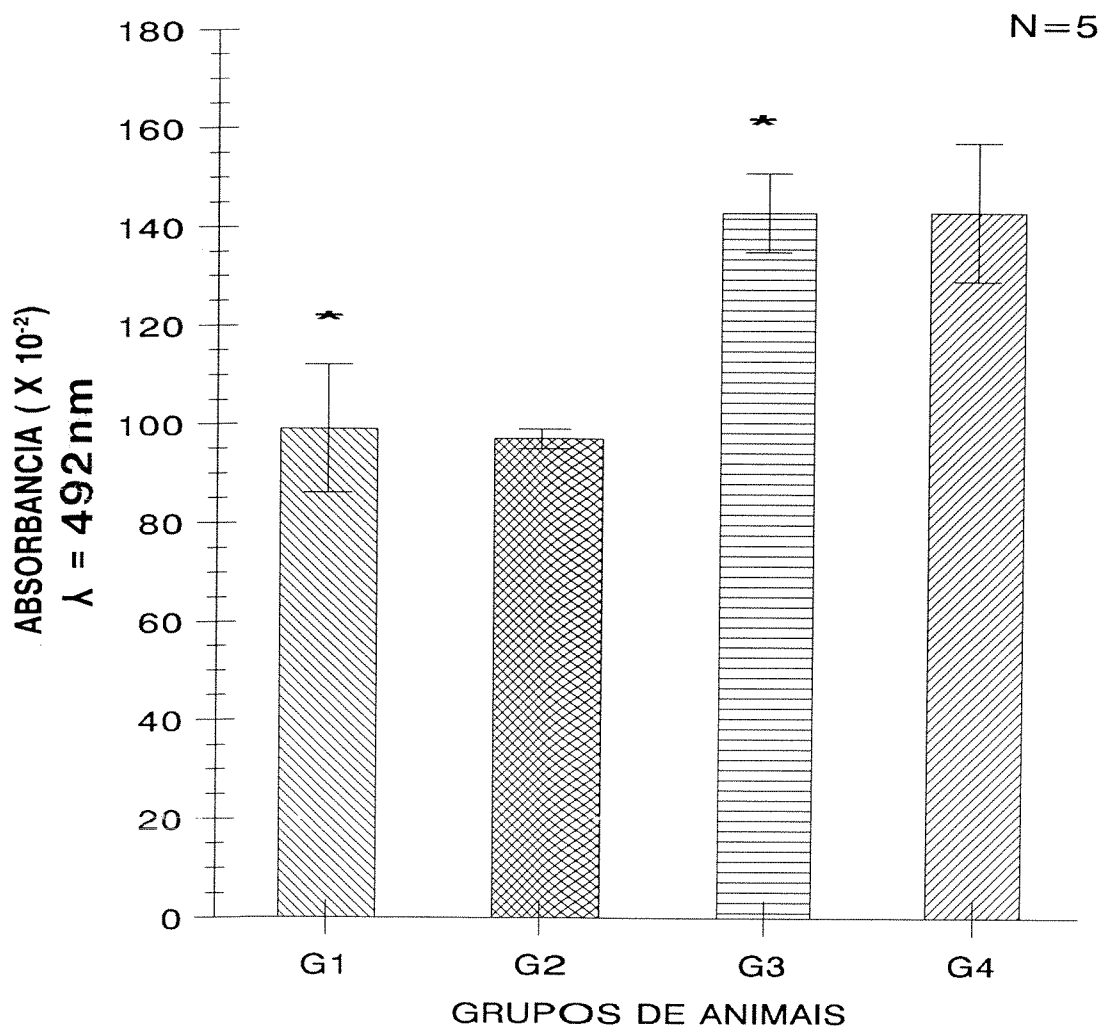
A pesquisa de anticorpos reativos com miosina, colágeno, TNP-BSA e laminina foi realizada utilizando a técnica de ELISA (MOHAMMAD & ESEN, 1989).

Os resultados estão representados nas figuras 8, 9, 10 e 11 a diferentes auto-antígenos utilizados neste estudo.

Os animais estimulados com eritrócitos de carneiro e tratados com anticorpos "naturais" aumentaram significativamente a produção de anticorpos para colágeno com relação ao grupo controle (figura 9).

Para laminina, os animais tratados somente com IgM "natural" expressaram aumento no respectivo título de anticorpos, embora pouco significativo (figura 11).

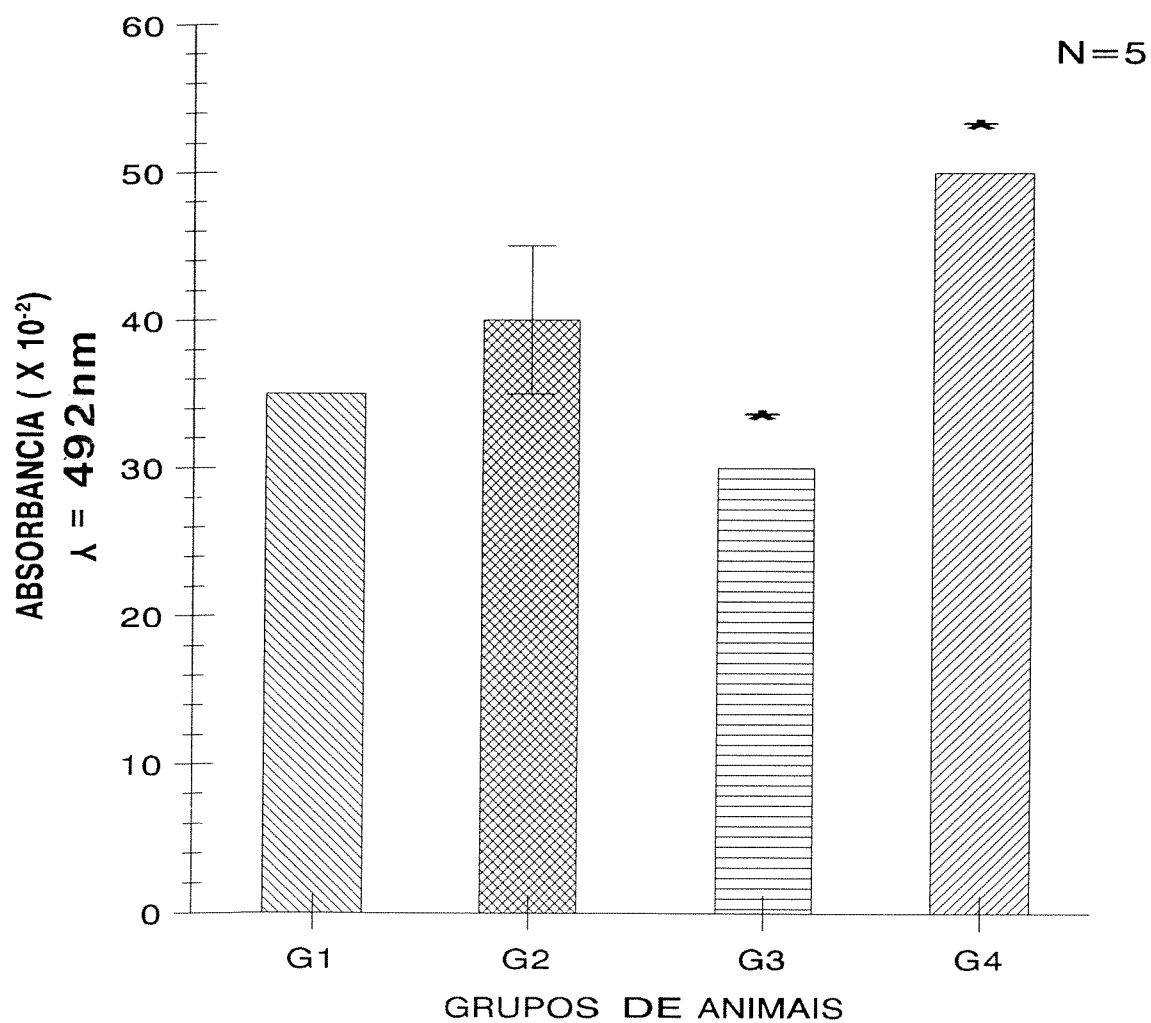
Com relação ao título de anticorpos para TNP-BSA e miosina, as figuras 8 e 10 mostram que animais estimulados com eritrócitos de carneiro aumentaram a produção de anticorpos para estes antígenos quando comparados com os animais que receberam salina.



G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

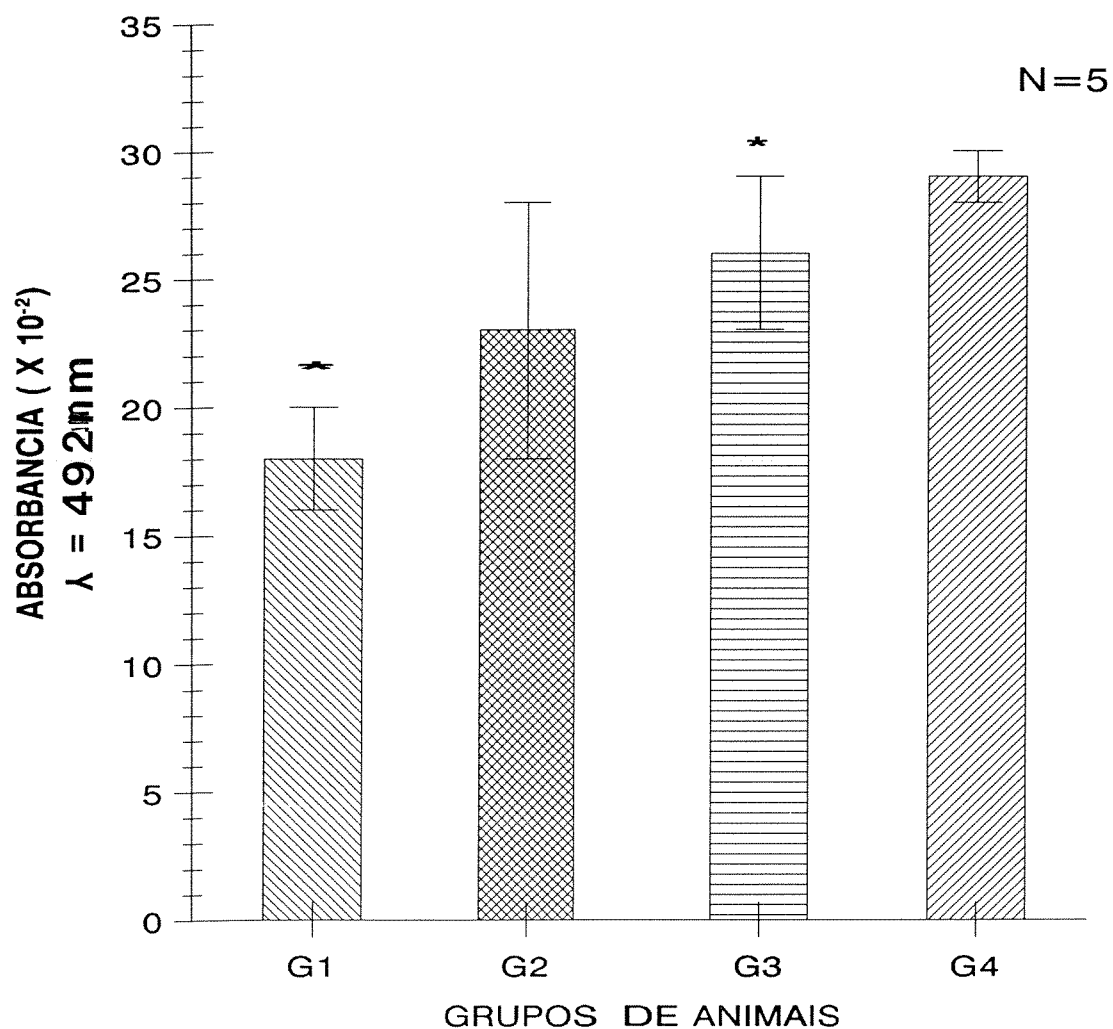
FIGURA - 8 Título de anticorpos para TNP-BSA através da técnica de ELISA. Os valores das Absorbâncias são as somas das densidades ópticas entre as diluições 1/100 a 1/800. \* P < 0,025.





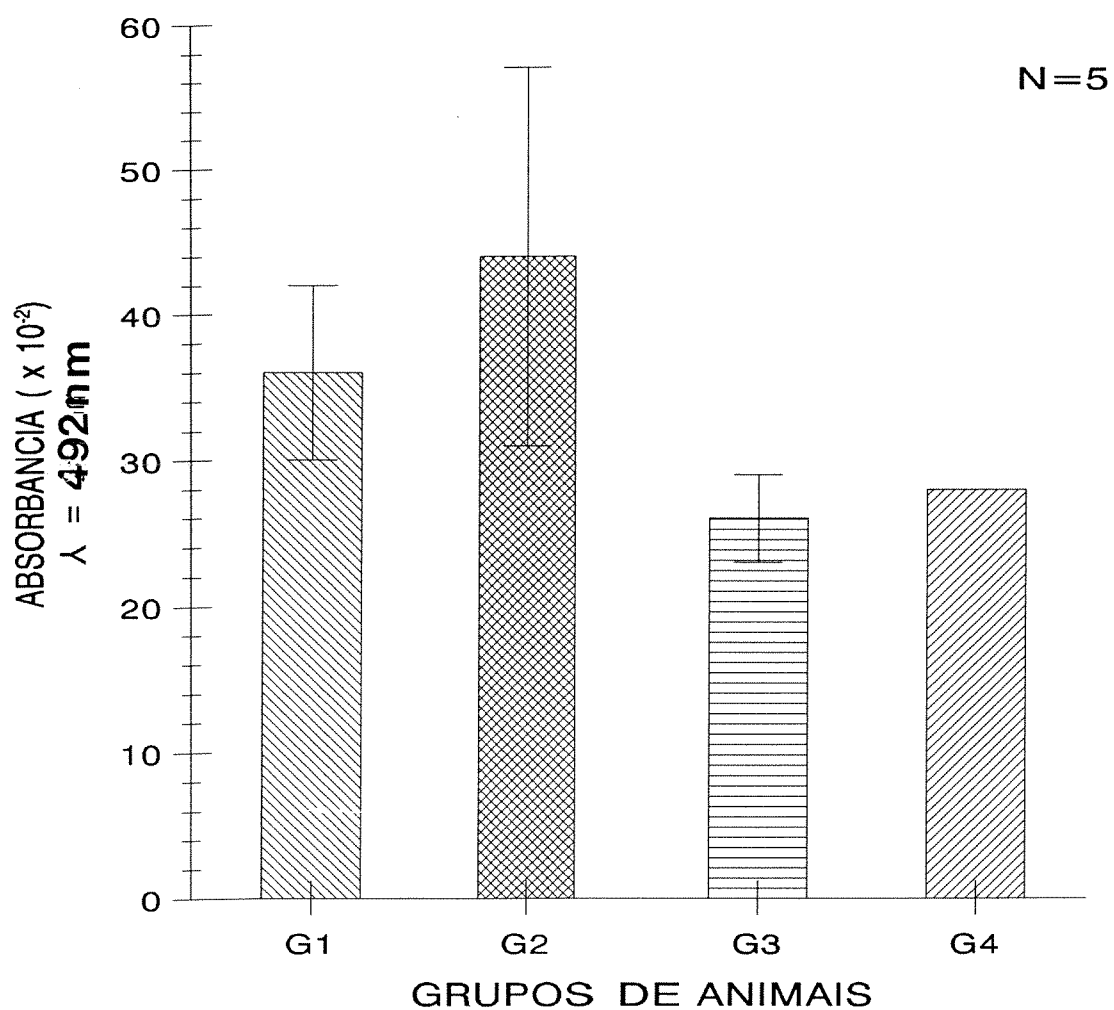
G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

FIGURA - 9 Título de anticorpos para COLÁGENO através da técnica de ELISA. Os valores das Absorbâncias são as somas das densidades ópticas entre as diluições dos soros de 1/100 à 1/400. \* P < 0,025.



G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

FIGURA - 10 Título de anticorpos para MIOSINA através da técnica de ELISA. Os valores das Absorbâncias são as somas das densidades ópticas entre as diluições dos soros de 1/100 à 1/800. \* P < 0,025.



G1 - NaCl 0,15 M    G2 - IgM 1.3.80    G3 - E.C.    G4 IgM 1.3.80 + E.C.

FIGURA - 11 Título de anticorpos para LAMININA, através da técnica de ELISA. Os valores da Absorbâncias são as somas das densidades ópticas entre as diluições dos soros de 1/100 à 1/400.

## **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

Um grande número de informações a nível celular e molecular, com destaque ao conhecimento de receptores de linfócitos e o processo de diversidade dos anticorpos (TONEGAWA, 1983), vem demonstrar quanto é complexo o sistema imunológico.

Evidências que a maioria dos linfócitos B emergem da medula óssea e são células de vida curta (FREITAS *et alii*, 1986) e, que a sobrevivência destas células depende do estabelecimento de ligações com outras células do microambiente já existente (MELCHER & ANDERSON, 1986), demonstram uma atividade autônoma do sistema.

Estudos do sistema imune de camundongos adultos isentos de germe, mostraram um alto índice de atividade determinada pelo ambiente interno, onde aproximadamente 20% das células se encontram ativadas (células naturalmente ativadas) (PEREIRA *et alii*, 1986).

Hibridomas foram obtidos através da fusão destas células "naturalmente" ativadas com células SP2/0. Dados da literatura demonstraram que, anticorpos produzidos por este repertório de linfócitos "naturalmente" ativados, possuem um alto grau de conexidade idiotípica (COUTINHO *et alii*, 1987), podendo interagir com células T e anticorpos por complementariedade idiotípica (LYMBERI *et alii*, 1985). A participação destes anticorpos no estabelecimento de conexões, sugere sua participação numa rede de interações, que segundo Jerne, 1974, tem um papel fundamental na regulação e manutenção do equilíbrio do sistema imune.

Uma amostra representativa desta população "naturalmente" ativada de camundongos neonatos isentos de germe também foi obtida através da produção de hibridomas proveniente da fusão de células de baço destes animais e células SP2/0 (HOLMBERG *et alii*, 1984).

Testes de reatividade dos anticorpos produzidos por estes hibridomas mostraram que metade dos anticorpos monoclonais produzidos reagiam em grande proporção com outros do mesmo grupo (HOLMBERG *et alii*, 1984), além de terem demonstrado um alto grau de conexão idiotípica, reagindo com anticorpos anti-idiotipos e linfócito T (HOLMBERG *et alii*, 1986; ARAÚJO *et alii*, 1987). Estes estudos sugerem que o sistema imune se inicia com interações entre seus próprios elementos, gerando uma dinâmica interna, cuja importância funcional têm sido demonstrada por vários experimentos (VAKIL & KEARNEY, 1986; VAKIL *et alii*, 1986; SUNDBLAD *et alii*, 1989). Foi também demonstrado recentemente que anticorpos "naturais" IgG de camundongos normais são também reativos com antígenos próprios, incluindo moléculas que tem papel fundamental na resposta imunológica, como proteínas do MHC classe I e II e antígenos de membrana de célula T (BERNEMAN *et alii*, 1992).

Este grupo de células "naturalmente" ativadas com as características de alta conexão no animal adulto corresponde à aproximadamente 10% do total de linfócitos do baço, possivelmente, uma fração bem menor que o camundongo neonato (HOLMBERG *et alii*, 1986). Entretanto, uma grande proporção destes anticorpos multireativos são preservados no camundongo adulto isento de germe (BOS *et alii*, 1989).

A existência destas conexões entre este grupo de células "naturalmente" ativadas, e, a consequência funcional destas interações foi também demonstrada "in vivo" através da regulação de seus idiotipos complementares quando inoculados em concentrações fisiológicas (LUNDVIST *et alii*, 1989).

Com base nas características desta população de células "naturalmente" ativadas (conexão e multirreatividade), que sugere a participação destas na rede de interações idiotípicas (JERNE, 1974), o presente estudo foi direcionado para verifi-

camos se a transferência de anticorpos provenientes deste repertório de células naturalmente ativadas de camundongos neonatos para o animal adulto, acarretaria em alterações no seu comportamento imunológico.

Para verificarmos tais alterações, à nível de estimulação com antígenos de natureza heteróloga, eritrócitos de carneiro foram inoculados em animais depois de tratados com as imunoglobulinas naturais.

Pudemos demonstrar, através da técnica de PFC reverso, que, quando os animais não sofreram nenhum estímulo antigênico, a dose de imunoglobulinas naturais utilizada não foi capaz de alterar o número de células produtoras de anticorpos dos animais. Entretanto, quando houve um estímulo (eritrócitos de carneiro), alterações puderam ser evidenciadas, havendo uma diminuição quanto ao número de células produtoras de anticorpos totais e um aumento de células produtoras de imunoglobulinas da classe IgM (figuras 5 e 6), sugerindo que o papel modulador dos anticorpos inoculados foi detectado somente quando o sistema sofreu um desequilíbrio causado pela inoculação de eritrócitos de carneiro.

Também foi avaliado se o tratamento com os anticorpos naturais influenciaria a produção de anticorpos específicos para eritrócitos de carneiro, embora estas duas medidas não fossem perfeitamente comparáveis, pois o PFC-reverso enumera células produtoras de anticorpos e a hemaglutinação direta mede o título de anticorpos específicos para eritrócitos de carneiro. Os títulos de anticorpos aglutinantes dos soros para eritrócitos de carneiro praticamente não foram modificados com o tratamento, sugerindo que a transferência de anticorpos "naturais" alterou a produção de anticorpos que não dizem respeito ao antígeno inoculado, sem entretanto alterar a produção de anticorpos específicos (figura 7).

Experiências anteriores revelaram que anticorpos monoclonais da classe IgM aumentam a produção de anticorpos da mesma especificidade (FORNI *et alii*, 1980).

É possível inferir com nossos resultados que o tratamento dos animais com anticorpos "naturais" de camundongos neonatos foi capaz de modular a produção de anticorpos induzida por eritrócitos de carneiro, independente da especificidade. Assim sendo, teríamos uma resposta modulada por componentes do próprio sistema imunológico, sugerindo que o sistema imune é autônomo e, que a interação entre seus próprios elementos é o que define a resposta imune induzida por qualquer antígeno.

Esta modulação seria uma consequência do estabelecimento de conexões que a imunoglobulina inoculada passou a estabelecer com o sistema imune, e, que destas relações resultou a atividade linfocitária, medida através da expressão do número de células secretoras de imunoglobulinas independente da especificidade.

A figura a seguir, proposta por VAZ & VARELA, 1978, ilustra esta concepção de que a resposta para um determinado antígeno é o resultado de interações existentes entre componentes do próprio sistema.

Na ativação policlonal de linfócitos B, induzida em processos infecciosos com parasitas, uma grande parte do total de imunoglobulinas sintetizadas durante a infecção, reage com antígenos não relacionados ao hospedeiro (JARRET & FERGUSON, 1974; CURTAIN & KIDSON, 1964; ORTIZ-ORTIZ *et alii*, 1980).

Os nossos dados reproduzem uma estimulação por eritrócitos de carneiro onde há evidência de uma ativação policlonal induzida pelo antígeno. De fato, o tratamento dos animais com anticorpos "naturais" alterou a produção de anticorpos independente da especificidade (figura 5 e 6), sem entretanto



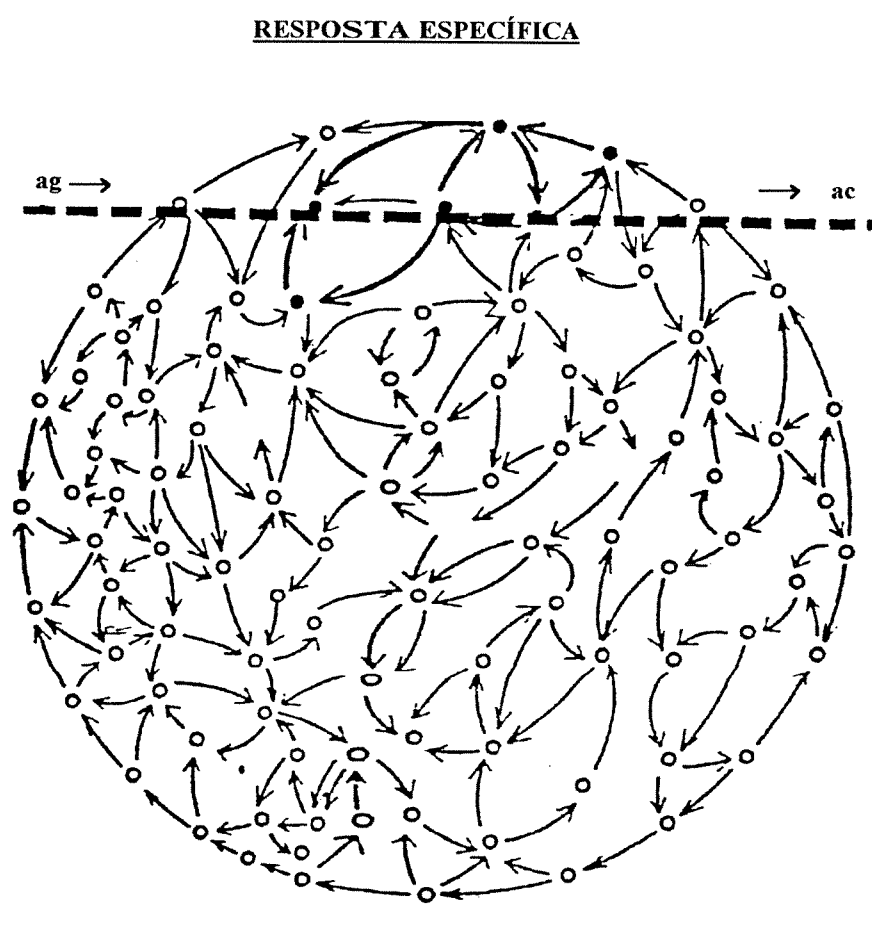


Figura 12- Representação pictórica da resposta imune como sendo resultado de interações idiotípicas entre seus elementos (VAZ & VARELA, 1978).

alterar significativamente o título de anticorpos específicos para eritrócitos de carneiro (figura 7). Foi demonstrado que o estímulo antigênico induziu também a produção de anticorpos que não dizem respeito ao antígeno, o que caracteriza a ativação policlonal.

A ativação policlonal é um fenômeno associado não só à infecções parasitárias, mas também a outros agentes infecciosos (STELLRECHT & VELLA, 1992)

e tem sido um dos mecanismos propostos que levaria à indução de um estado patológico de auto-imunidade (DZIARSK, 1988).

A presença de auto-anticorpos no soro de pacientes que desenvolvem a forma cardíaca da Doença de Chagas tem sido associada com o desenvolvimento de doença auto-imune (SZARFMAN *et alii*, 1982). A ativação policlonal induzida por este parasita (MINOPRIO *et alii*, 1986) associada à demonstrações da presença de células T auto anti-idiotípicas em pacientes com a forma chagásica da doença (GAZZINELLI *et alii*, 1988), nos leva a pensar que num desequilíbrio do sistema imune causado pelo parasita. Haveriam alterações à nível de interações idiotípicas que poderiam ocasionar o desenvolvimento de doença auto imune.

A manutenção da homeostase através de interações idiotípicas conforme a visão da teoria de Jerne, 1974, tem sido corroborada com algumas evidências, notadamente na utilização de anticorpos no controle de doenças auto-ímmunes (NORDLING *et alii*, 1991; FRICKE *et alii*, 1991; ROUBATY *et alii*, 1990). Neste contexto, o estado patológico de doença auto imune deve estar associado a um desequilíbrio desta rede de interações.

Verificamos também, no presente trabalho, que a ativação policlonal induzida por eritrócitos de carneiro promoveu alterações a nível de auto anticorpos. Dentre os antígenos testados (TNP-BSA, colágeno, laminina e miosina), foi demonstrado um aumento no título de anticorpos anti-TNP (figura 8) e anti-miosina (figura 10) em animais estimulados com o antígeno, sugerindo que a ativação policlonal induzida por eritrócitos de carneiro foi capaz de induzir à um desequilíbrio no compartimento interno dos animais.

O tratamento de indivíduos portadores de doença auto-imune através da utilização de imunoglobulinas do soro de indivíduos normais da classe IgG, resultando numa redução do título de auto-anticorpos, e o fato que estas preparações de

imunoglobulinas contém anti-idiotipos contra uma variedade de auto-anticorpos associados com doença auto-imune, sugere que o efeito da utilização destas imunoglobulinas de indivíduos normais provavelmente interferem com a função regulatória da rede idiotípica na resposta auto-imune (ROSSI *et alii*, 1989). Além de interações com auto-anticorpos do soro de indivíduos portadores de doença auto imune, interações idiotípicas entre estas imunoglobulinas preparadas do soro de indivíduos normais e anticorpos "naturais" IgM de indivíduos normais foram demonstradas, sugerindo que imunoglobulinas do isótopo IgG pertencentes ao repertório normal de células B provavelmente participam da rede idiotípica juntamente com anticorpos "naturais" multirreativos IgM (ROSSI *et alii*, 1990).

É importante lembrar que estas interações idiotípicas ocorrem também à nível de células T, através de seus TCR, que também expressam idiotipos (COUTINHO & FORNI, 1985).

A influência de anticorpos na atividade imunológica foi também demonstrada através da inibição da ligação de auto-anticorpos à seus antígenos através da ligação de IgM do soro deste mesmo indivíduo à fração  $F(ab')_2$  destes anticorpos, sendo estes resultados compatíveis com a existência de uma rede de conexões através de interações idiotípicas (ADIB *et alii*, 1990).

A consequência da transferência de imunoglobulinas "naturais" de camundongos neonatos na atividade imunológica, foi também verificada à nível de auto-anticorpos contra antígenos próprios e os resultados demonstraram um aumento significativo na produção de anticorpos anti-colágeno em animais estimulados com eritrócitos de carneiro e tratados com anticorpos "naturais" com relação aos animais que receberam somente eritrócitos de carneiro. Para o antígeno laminina, a figura 11 sugere um pequeno aumento na produção de anticorpos para este antígeno em animais tratados com IgM 1.3.80 em relação ao grupo controle que recebeu salina.

Estes resultados sugerem uma relação entre anticorpos "naturais" e auto-  
imunidade, o que corroborada com outros trabalhos, onde alterações nas concentra-  
ções de anticorpos "naturais" acarretam alterações na concentração também de auto-  
anticorpos (VAKIL & KEARNEY, 1986; VAKIL *et alli*, 1986).

É notório no trabalho realizado a limitação do painel de antígenos utilizados,  
tanto com relação a auto-antígenos, quanto a utilização de antígenos heterólogos.  
Entretanto já nos permite o levantamento de questões com relação á influência de  
anticorpos "naturais" na atividade imunológica, nosso questionamento poderá ser  
continuado utilizando-se um maior número de auto-antígenos, como também estu-  
dando-se a transferência de células "naturalmente" ativadas de camundongos neona-  
tos para o camundongo adulto, o que representaria de forma mais ampla este reper-  
tório natural.

## **CONCLUSÕES**

No presente trabalho podemos concluir que:

1 - A transferência de anticorpos monoclonais provenientes de células "naturalmente" ativadas de camundongos neonatos foi capaz de alterar o número de células secretoras de imunoglobulinas (IgM e Ig totais) do baço de animais que sofreram um estímulo com eritrócitos de carneiro. Estes resultados sugerem que os anticorpos "naturais" devem interagir de alguma forma com o sistema, e que estas interações determinaram as alterações em diferentes clones linfocitárias.

2 - O fato de que anticorpos de animais neonatos alterarem atividades linfocitárias no animal adulto, infere uma autonomia do sistema imune.

3 - Devido os anticorpos "naturais" terem alterado o número de células secretoras de anticorpos independente da especificidade, sem entretanto alterar a produção de anticorpos específicos para eritrócitos de carneiro, sugere que estes anticorpos naturais utilizados influenciaram clones de células que não dizem respeito ao antígeno.

4 - A influência de anticorpos "naturais" na resposta auto-imune pôde ser demonstrada com relação ao antígeno colágeno, onde houve um aumento no título de anticorpos para este antígeno em animais tratados com IgM 1.3.80 e estimulados com eritrócitos de carneiro.

5 - A ativação policlonal induzida por eritrócitos de carneiro aumentou o título de anticorpos para os antígenos TNP-BSA e miosina, o que corrobora com outros trabalhos onde a ativação policlonal aumenta a produção de auto-anticorpos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADIB, M.; RAGIMBEAU, J.; AVRAMEAS, & TERNYNCK, T. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J. Immunol.* 145: 3807-3813, 1990.
- ARAÚJO, P. M. F.; HOLMBERG, D.; MARTINEZ, A. C. & COUTINHO, A. Idiotypic multireactivity of natural antibodies; Natural antiidiotypes also inhibit helper T cells with cross reactive clonotypes. *Scand. J. Immunol.*, 25: 497-505, 1987.
- BERNABÉ, R. R.; TUNESKOG, M.; FORNI, L.; MARTINEZ-A., C.; HOLMBERG, D.; IVARS, F. & COUTINHO, A. The protein A plaque assay for the detection of immunoglobulin-secreting cells. *Immunological Methods, Vol III.* Academic Press Inc., Cap. 9, p187-189, 1981.
- BERNEMAN, A.; TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. Natural mouse IgG reacts with self antigens including molecules involved in the immune response. *Eur. J. Immunol.*, 22: 624-633, 1992
- BIOZZI, G.; MONTON, D.; SANT'ANNA, O. A.; PASSOS, H. C.; GENNARI, M.; REIS, M. H.; FERREIRA, V. C. A.; HEUMAN, A. M.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O. M.; STIFEL, C. & SIQUEIRA, M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 85: 31-98, 1979.



- BJOKRMAM, M. H. The foreign antigen binding site and the T cell recognition regions of the class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518, 1987.
- BOS, N. A.; MEEUWSEN C.G.; VAN WIJNGAARDEN, P. & BENNER, R. B cell repertoire in adult antigen-free and conventional neonatal BALB/c mice. II- Analysis of antigen-binding capacities in relation to V<sub>H</sub> gene usage. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1817-1822, 1989.
- BOUVET, J. -P.; PIRES, R. & PILLOT, J. A modified gel filtration technique producing an unusual exclusion volume of IgM: a simple way of preparing monoclonal IgM. *J. Immunol. Methods*, 66: 299-305, 1984.
- BURNETT, M. F. A modification of Jernes theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci*, 20: 67, 1957.
- BURNETT, M. F. & FERNNER, F. The production of antibodies. *Melborn: Macmillan*: 102-105, 1949.
- BUSS, S.; SETE, M. & GREY, M. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science*, 235: 1353-1357, 1987.
- CANGUIHERM, G. O efeito da bacteriologia no fim das teorias médicas do século XIX. Em edições 70. *Ideologia e racionalidade nas ciências da vida*, 2: 51-70. São Paulo, Martins Fontes. Ed., 1977.

- CHARONIS, A. S.; TSILIBARY, E. C.; YURCHENCO, P. D. & FURTHMAYR, H. Binding of laminin to type IV collagen. A Morphological Study. *J. Cell. Biol.*, 100: 1848-1853, 1985.
- COUTINHO, A. Beyond clonal selection and network. *Immunol. Rev.*, 110: 64-87, 1989.
- COUTINHO, A. & FORNI, L. Beware of idiotypes: a commentary. *J. Mol. Cell. Immunol.*, 1: 345-346, 1985.
- COUTINHO, A.; FORNI, L.; HOLMBERG, D.; IVARS, F. & VAZ, N. M. From an antigen-centered clonal perspective of immune response to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self referential immune system. *Immunol. Rev.*, 79: 151-168, 1984.
- COUTINHO, A.; MARQUEZ, C.; ARAÚJO, P. M. F.; PEREIRA, P.; TORIBIO, M. L.; MARCOS M. A. R. & MARTINEZ C. A. A. functional idiotypic network of T helper cells and antibodies limited to the compartment of naturally activated lymphocytes in normal mice. *Eur. J. Immunol.*, 17: 821-825, 1987
- CURTAIN, C. G. & KIDSON, C. Malaria antibody content of gamma<sub>2</sub> 7S globulin in tropical populations. *Nature*, 203: 1366-1367, 1964.

- DIGHIERO, G.; GUILBERT, S. & AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigen in human sera; II- High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J. Immunol.*, 128: 2788-2792, 1982.
- DIGHIERO, G.; LYMBERY, P. & MAZIE, J. C. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J. Immunol.*, 131: 2267-2272, 1983.
- DIGHIERO, G.; LYMBERY, P. & HOLMBERG, D. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immunol.*, 134: 765-771, 1985.
- DZIARSKI, R. Autoimmunity polyclonal activation or antigen induction?. *Immunol. Today*, 9: 340-342, 1988.
- ERIKSON, J.; RADIC, M. Z.; CAMPER, D. A.; HARDY, R. R.; CARMACK, C. & WEIGERT, M. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in nonautoimmune mice. *Nature*, 349: 331-334, 1991.
- FORNI, L.; COUTINHO, A. KOHLER, G. & JERNE, N. K. IgM antibodies induce the production of antibodies of the same specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1125-1128, 1980.

- FREITAS, A. A.; ROCHA, B. & COUTINHO, A. Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev.*, 91: 5-37, 1986.
- FRICKE, H; MENDLOVIC, S.; BLANK, M; SHOENFELD, Y.; BASSAT-BE, M. & MOZES, E. Idiotype specific T cell lines inducing experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Immunology*, 73: 421-427, 1991.
- GAZZINELLI, R.; MORATO, M. J. F., NUNES, R. M. B.; CANÇADO, J. R.; GAZZINELLI, G. Immunoregulação idiopática em doença de Chagas In: II Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. p.456. Rio de Janeiro, 1987.
- GAZZINELLI, R. T.; MORATO, M. J. F.; NUNES, R. M. B.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G. Idiotype stimulation of T lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected patients. *J. Immunol.*, 140: 3167-3172, 1988.
- GLOTZ, D. & ZANETTI, M. Detection of a regulatory idiotype on a spontaneous neonatal self reactive hybridoma antibody. *J. Immunol.* 137: 223-227, 1986.
- GOODNOW, C. C.; CROSBIE, J.; ADLESTEIN, S.; LAVOIE, T. B.; SMITH-GILL, S. J.; BRINK, R. A.; PRITCHARD-BRISCOE, H.; WOTHERSPOON, J. S.; LOBLAY, R. H.; RAPHAEL, K.; TRENT, R. J. & BASTEN, A. Altered immunoglobulin expression and functional

silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334: 676-682, 1988.

GORDON, J.; MITROVSK, B. & ABIKAR, K. B cell dependent T cell function by perinatal exposure of mice to anti IgM antibodies. *Cell. Immunol.*, 121: 125-133, 1989.

GUIDOU, V.; GUILBERT, B.; MOINER, D.; TONNELLE, C.; BOUBLI, L.; AVRAMEAS, S.; FOUGEREAU, M.; FUMOUX, F. Ig repertoire of human polyspecific antibodies and B cell ontogeny. *J. Immunol.*, 146: 1368-1379, 1991.

GUILBERT, B.; DIGHIRO, G. & AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigen in human sera; I-Detection, isolation, characterization. *J. Immunol.*, 128: 2779-2787, 1982.

HAHN, B. H. & EBLING, F. M. Suppression of murine lupus nephritis by administration of an antiidiotypic antibody to anti-DNA. *J. Immunol.*, 132: 187-190, 1984.

HARDY, R. R.; CARMACK, C. E.; SHINTON, S. A.; KEMP, J. D. & HAYAKAWA, K. Resolution and characterization of pro-B cell and pro-pre-B cell stage in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.*, 173: 1213-1225, 1991.

HILMMELWEIT, F. *Collected papers of Paul Ehrlich*, 2. Pergamon Press, London: 221, ed. 1956.

HOLMBERG, D. High connectivity natural antibodies preferentially use 7183 and QUPC 52 VH families. *Eur. J. Immunol*, 17: 399-407, 1987.

HOLMBERG, D.; FORSGREN, S.; IVARS, F. & COUTINHO, A. Reactions among IgM antibody derived from neonatal mice. *Eur. J. Immunol.*, 14: 435-441, 1984.

HOLMBERG, D.; WENNERSTROM, G.; ANDRADE, L. & COUTINHO, A. The high idiotypic connectivity of natural newborn antibodies is not found in adult mitogen reactive B cells repertoires. *Eur. J. Immunol.*, 16: 82-87, 1986.

JANEWAY, C. A. Jr. Varieties of idiotype specific helper T cells: a commentary. *J. Moll. Cell. Immunol.*, 2: 256-266, 1986.

JARRET, E. & FERGUSON, A. Effect of T cell depletion on the potentiated reagin response. *Nature*, 250: 450-454, 1974.

JERNE, N. K. Towards a theory of the immune system. *Ann. immunol. (Paris)*, 125c: 373-387, 1974.

- JUANG, R. H.; CHANG, Y. D.; SUNG, H. Y. & SU, J. C. Quen-drying methods for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Analytical Bioch.*, 141: 348-355, 1984.
- KABAT, E. A. & MAYER, M. M. Experimental Immunochemistry, 2. ed. Rev. Springfield: C. C. Thomas, 133-241: 1971.
- KAPPLER, J. W.; ROEM, N. & MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49: 273-280, 1987.
- KISIELOW, P.; BLUTHMANN, H. STAERZ, V. D.; STEINMETZ, M. & VONBOEHMER, H. Tolerance in T cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes. *Nature*, 333: 742-746, 1988.
- KOHLER, G.; HOWE, S. C. & MILSTEIN, C. Fusion between Ig-secreting and non-secreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, 6: 292-296, 1976
- LYMBERI, P.; DIGHIERO, G.; TERNYNK, T. & AVRAMEAS, S. A high incidence of cross-reactive idiotypes among murine natural antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 15: 702-707, 1985.
- LITTLE, J. R. & EISEN, H. N. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2-4-6 trinitrophenil group. *Biochemistry*, 5: 3385-3389, 1966.

LUNDKVIST, I. COUTINHO, A.; VARELA, F. & HOLMBERG, D.

Evidence for a functional idiotypic network among natural antibodies in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5074-5078, 1989.

MARTINEZ, A. C.; BERNABÉ, S. S.; HERA, A.; PEREIRA, P.;

CAZENAVE, P. & COUTINHO, A. Establishment of idiotypic helper T cell repertoires nearly in life. *Nature*, 317: 721-723, 1985.

MARTINEZ; A. C.; PEREIRA, P.; TORIBIO, M. L. ; MARCOS, M. A. R.;

BANDEIRA, A.; DE LA HERA, A.; MARQUEZ, C.; CAZENAVE, P. A. & COUTINHO, A. The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunol. Rev.*, 101-122: 191, 1988.

MATSIOTA, P.; DOSQUET, P.; LOUZIR, H.; DRUET, P. &

AVRAMEAS, S. IgA polyspecific auto antibodies in IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 361-366, 1990.

MELCHER, F. & ANDERSON, J. Factors controlling the B cell cycle. *Ann.*

*Rev. Immunol.*, 4: 13-17, 1986.

MILLER, E. J. & RHODES. Preparation and characterization of different

types of collagen. *Meth. Enzymol.*, 82: 33-64, 1982.

MILLER, J. P. F. A. Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2: 748-

749, 1961.



- MINOPRIO, P. M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D' IMPERIO LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Polyclonal Lymphocyte Responses to Murine *Trypanosoma cruzi* Infection. I-Quantitation of Both T and B Cell Responses. *Scand. J. Immunol*, 24: 661-668, 1986.
- MOHAMMAD, K. & ESEN, A. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and Western blots. *J. Immun. Meth*, 117: 141-145, 1989.
- MOLLER, G. Transgenic mice and immunological tolerance. *Immunol. Rev*, 122: 1-204, 1991
- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-173, 1989.
- MOUSTAFA, Y.; CHANCEL, J.; ROSSETTI, f.; MONTMASSON, M-P. & IDELMAN, S. Image analysis of lymphoid cell differentiation in rat thymus throughout development. *Thymus*, 19: 127-144, 1992.
- NEEFJES, J.J. & MOMBURG, F. Cell biology of antigen presentation. *Current Opinion Immunol*, 5: 27-34, 1993.
- NEMAZEE, D.A. & BURKI, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, 337: 562-566, 1989.

NORDLING, C.; HOLMDAHL, R. & KLARESKOG, L. Down regulation of collagen arthritis after *in vivo* treatment with a syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody to a cross-reactive idiotope on collagen II autoantibodies. *Immunology*, 72: 486-499, 1991.

OFFER, G.; MOOS, G. & STARR, R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils . Extraction, purification & characterization. *J. Mol. Biol.*, 74: 653-657, 1973.

ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D. E. RODRIGUES, M.; WEIGLE, W. O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi*: infection. *J. Immunol.*, 124: 121-126, 1980.

OUCHTERLONY, O. Antigen antibody reactions in gels, *Acta Pathologica Microb. Scand*, 26; 507, 1949. In: GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. "Ouchterlony method". In: *Methods Immunol.* 3rd ed. Massachusetts, W. A. benjamim. Inc. Part 5, cap. 36: 313-317, 1977.

LOUDIN, M. J. & MICHEL, M. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines y du serum de lapin, apparemment liee à la fonction et a la specificité anticorps. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 257: 805-808, 1963.

OWEN, R. D.; DAVIS, H. P. & MORGAN, R. F. Quintuplet calves and erythrocyte mosaicism. *J. Hered.*, 37: 291-297, 1946.

- PADANYI, A.; GYODY, E. & SARMAY, G. Functional and immunogenetic characterization of Fc $\gamma$ -blocking antibody. *Immunol. Letters*, 26: 131-138, 1990.
- PAIGE, D. The B cell repertoire. *Faseb J.*, 3: 1818-1824, 1989.
- PAUL, W. Cytokines. Poking holes in the network. *Nature*, 357: 16-17, 1992.
- PEREIRA, P.; FORNI, F.; LARSSON, E. -L; COOPER, M.; HEUSSER, C. & COUTINHO, A. Autonomous activation of B and T cells in antigen free mice. *Eur. J. Immunol.*, 16: 685-688, 1986.
- PEREIRA, P.; BANDEIRA, A.; COUTINHO, A; MARCOS M. A.; TORIBIO, M. & MARTINEZ-A., C. V-region connectivity in T cell repertoires. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 209-249, 1989.
- PIRCHER, H.; BIRKI, K.; LANG, R.; HENGARTNER, H. & ZINKERNAGEL, R. M. & LOH, D. Y. Tolerance induction in double specific T cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*, 342: 559-561, 1989.
- PORTNOI, D.; FREITAS, A. HOLMBERG. D. ; BANDEIRA, A. & COUTINHO, A. Immunocompetent autoreactive B lymphocytes are activated cycling cells in normal mice. *J. Exp. Med.*, 164: 25-35, 1986.

- PRABHAKAR, B. S.; SEAGUSA, J.; ONOCHERA, T. & NOTKINS, A. L. Lymphocytes capable of making monoclonal antibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire. *J. Immunol.*, 133: 2815-2817, 1984.
- RAMMENSEE, H. G.; KROSCHSKI, R. & FRANGOULIS, B. Clonal anergy in mature VB6+ T lymphocytes on immunizing M1s<sup>b</sup> mice with M1s<sup>a</sup> expressing cells. *Nature*, 339: 541-544, 1989.
- RODKEY, L. S. Studies of idiotypic antibodies production and characterization of auto antiidiotypic antisera. *J. Exp. Med.*, 139: 712-715, 1974.
- ROSEMBERG, I. J. & CHILLER, J. M. Ability of antigen-specific helper cells to effect a class-restricted increase in total Ig-secreting cells in spleens after immunization with the antigen. *J. Exp. Med.*, 150: 517-530, 1979.
- ROSSI, F.; DIETRICH, G. & KAZATCHKINE, M. D. Anti-idiotypes against autoantibodies in normal immunoglobulins: Evidence for network regulation of human autoimmune responses. *Immunol. Rev.*, 110: 136-149, 1989.
- ROSSI, F.; GUILBERT, B.; TONNELLE, C.; TERNYNCK, T.; FUMOUX, F.; AVRAMEAS, S. & KAZATCHKINE, M. D. Idiotypic interactions between normal human polyspecific IgG and natural IgM antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 20: 2089-2094, 1990.

- ROUBATY, C.; BEDIN, C. & CHARREIRE, J. Prevention of experimental autoimmune thyroiditis through the antiidiotypic network *J. Immunol.*, 144: 2167-2172, 1990.
- SCHWARTZ, R. H. The role of gene products of the MHC in T cell activation and cellular restriction. In W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*: Raven Press, New York, 339-348, 1984.
- SHA, W. C.; NELSON, C. A.; NEWBERRY, R. D.; KRANS, D. M.; RUSSEL, J. H. & LOH, D. Y. Positive and negative selection of antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature*, 336: 73-76, 1988.
- SILVERSTEIN, A. M. History of Immunology-Cellular versus humoral immunity: determinants and consequences of an epic 19<sup>th</sup> century battle. *Cell. immunol.*, 48: 208-221, 1979.
- SLATER, R. J.; KUNKEL, H. G. & WARD, S. M. Immunological relationships among the myeloma proteins. *J. Exp. Med.*, 101: 85-87, 1955.
- SOUROUJON, M; WHITE-SCHARF M. E.; ANDRE-SCHARTZ, J; GEFTER, M. L. & SHWARTZ, R. S. Preferential autoantibody reactivity of the preimmune B cell repertoire in normal mice. *J. Immunol.*, 140: 4173-4179, 1988.

- STELLRECHT, K. A. & VELLA, A. T. Evidence for polyclonal B cell activation as the mechanism for LCMV-induced autoimmune hemolytic anemia. *Immunol. Letters*, 31: 273-278, 1992.
- SUNDBLAD, A.; HAUSER, S.; HOLMBERG, D.; CAZENAVE, P. -A. & COUTINHO, A. Suppression of antibody responses to the acetylcholine receptor by natural antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1425-1430, 1989.
- SZARFMAN, A.; TERRANOVA, V. P.; RENNARD, S. I.; FORDART, J. M.; LIMA, M. F.; SHEINMAN, J. I. & MARTIN, G. R. Antibodies to laminin in Chagas disease. *J. Exp. Med*, 155: 1161-1164, 1982.
- TAKACS, B. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide slab gels. *Immunol. Methods*: 81-105, 1979.
- TITE, J. P.; KAYE, J. SAIZAWA, K. M.; MING, J.; KATZ, M. E.; SMITH, L. A. & JANEWAY, C. A. Jr. Direct interactions between B and T lymphocytes bearing complementary receptors. *J. Exp. Med.*, 163:189-200, 1986.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302: 575-585, 1983.
- VANDENBARK, S. S.; HASHIM, G. & OFFNER, H. Immunization with a syntetic T cell receptor V-region protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Letters to Nature*, 141: 541-544, 1989.

- VAKIL, M. & KEARNEY, J. F. Functional characterization of monoclonal and antiidiotypic antibodies isolated from the early B cell repertoire of Balb/c mice. *Eur. J. Immunol.*, 16: 1151-1157, 1986.
- VAKIL, M.; SAUTER, H. ; PAIGE, C. & KEARNEY, J. F. In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 16: 1159, 1986.
- VAZ, N. M.; & VARELA, F. J. Self and nonsense: an organism centered approach to immunology. *Med. Hypoth.*, 4: 131-57, 1978.
- VAZ, N. M.; MARTINEZ, A. C. & COUTINHO, A. The uniqueness and boundaries of the idiotypic self. *Idiotypic in Biology and Medicine*,
- KOHLER, H.; CAZENAVE, P.- A. & URBAIN, J., eds Academic Press, New York; 43-59, 1984.
- YADIN, O.; SAROV, B.; NAGGAN, L.; SLOR, H. & SHOENFELD, Y. Natural antibodies in the serum of healthy women- a five year follow-up. *Clin. Exp. Immunol.*, 75: 402-406, 1989.
- ZANNETTI, M. Idiotypic regulation of autoantibody production. *C. R. C. Crit. Rev. Immunol.*, 6: 151-156, 1986.

ZANETTI, M.; GLOTZ, D. & SOLLAZZO, M. Idiotype regulation of self responses, autoantibody V regions and neonatal B cell repertoire. *Immunol. Letters*, 16: 277-282, 1987.