

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INIBIÇÃO
DA IMUNO HEMÓLISE POR ANTICORPOS
ANTI-IMUNOGLOBULINAS.

N. F. de Camargo Neto.

NEI FERREIRA DE CARVALHO NETO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INIBIÇÃO DA IMUNE HEMÓLISE POR ANTICORPOS
ANTI-IMUNOGLOBULINAS.

Tese de Mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia.

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Campinas - São Paulo
(1977)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa e filhas
e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Humberto de Araujo Rangel pelos ensinamentos recebidos, e pela orientação dada ao presente trabalho.

Aos professores Benedito de Oliveira Filho, Alba Ganches Patelli, Julia Franceschi, Marlene Braide Serafim, Irineu José Sarsante de Camargo, pelas críticas e sugestões ao trabalho.

À colega Julia Keiko Sakurada pela colaboração dada a este trabalho.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pela amizade e estímulo.

Aos professores e técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelos ensinamentos recebidos.

A Universidade Federal do Paraná pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Pós-Graduação em Imunologia.

Agradecemos aos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP, pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (DIVISÃO DE IMUNOLOGIA)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Durante a realização deste trabalho, o autor foi bolsista da CAPES.

SUMÁRIO

	Pags.
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	3
RESULTADOS.....	9
1 - Contrôles dos reagentes e da especificidade dos antisoros.....	9
2 - Determinação do título dos anticorpos hemolíticos da fração IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro.....	15
3 - Inibição quantitativa da lise de EA2 pela IgGac.....	17
4 - Fixação do complemento por EA2 em presença da IgG.....	19
5 - Ação da IgGac sobre o complexo EA2C1.....	20
6 - Absorção da IgGac por EA2 e EA2C1.....	21
DISCUSSÃO.....	22
RESUMO E CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

ABREVIATURAS

- A: Sôro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro (hemolisina).
- A2: Fração II da cromatografia de hemolisina total em DEAE celulose.
- a.IgG: Sôro de carneiro anti-IgG de coelho.
- a.SNCar: Sôro de coelho anti-sôro normal de carneiro.
- a.SNC: Sôro de carneiro anti-sôro normal de coelho.
- C: Complemento.
- C1: Primeiro componente do sistema complemento.
- E: Eritrócitos de carneiro.
- EA: Sistema hemolítico constituído de eritrócitos de carneiro e hemolisina
- EA2: Sistema hemolítico constituído de eritrócitos de carneiro e fração II da hemolisina.
- EA2C1: Sistema hemolítico EA2 com C1 fixado.
- E.IgG: Eritrócitos de carneiro conjugados com IgG de coelho.
- IgG: IgG do sôro normal de coelho.
- IgSac: IgG do sôro de carneiro anti-IgG de coelho.
- IgSn: IgG do sôro normal de carneiro.
- R1: Reativo 1 do sôro normal de cobaias.
- SNCar: Sôro normal de carneiro.
- SNC: Sôro normal de coelho.
- T: Tampão.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre a localização do sítio responsável pela ativação do complemento por um sistema antígeno anticorpo mostraram a importância da região Fc da IgG (TARANTA e FRANKLIN 1961; ISHIZAKA, ISHIZAKA e SUGAHARA 1962; UTSUMI 1969). Por outro lado, alguns pesquisadores mostraram a importância de estruturas no fragmento F(ab')₂ na ativação do complemento (REISS e PLESCIA 1963; SCHUR e BECKER 1963).

Os trabalhos acima referidos, foram efetuados com a molécula de anticorpo digerida, mas recentes pesquisas indicam a importância da integridade de estruturas da imunoglobulina para a maior eficiência em ativar o sistema complemento. COLOMB e PORTER (1975) usando o fragmento Facb da IgG de coelho obtido pela digestão desta imunoglobulina com plasmina, verificaram que as unidades de complemento fixadas por este fragmento ou pela IgG íntegra tratada com ácido, eram significativamente menores do que as fixadas pela IgG nativa. A redução das pontes de dissulfeto da IgG de carneiro ou de coelho, ocasiona um decréscimo da eficiência destas imunoglobulinas em ativar o complemento (SCHUR e CHRISTIAN 1964) o que indica que a integridade da estrutura tridimensional é importante para a ativação do complemento. PRESS (1975) trabalhando com imunocomplexos constituídos de ovalbumina (Ov) e IgG de coelho anti-Ov, verificou que a máxima fixação de Cl a este imunocomplexo, era dependente da integridade de determinadas ligações covalentes e de outras não covalentes da imunoglobulina.

O conjunto de dados acima apresentados, mostraram a necessidade da utilização no estudo do sítio de ativação do complemento, de uma metodologia que não submeta a molécula de imunoglobulina a tratamentos que conduzam a desnaturação. Seria desejável portanto, que se dispusesse de um reagente que não alterasse a estrutura terciária da imunoglobulina e que fosse capaz de se combinar especificamente com o sítio de ativação do complemento na molécula da imunoglobulina.

Aparentemente alguns anticorpos anti-imunoglobulinas são potencialmente capazes de preencher estes requisitos. Vários autores (BORDET 1904; EHRlich 1906; FRIEDBERGER e Moreschi 1907; ALTMAN 1912; LA PORTE, DE LOOZE e ROULIER 1950; HUMPREY 1967) utilizando imunesoros anti-hemolisina, de

monstraram que estes imunesoros tinham a capacidade de inibir ou de reforçar a lise do sistema hemolítico. RANGEL (1968) trabalhando com soros de cobaias anti-IgG de coelho, mostrou que estes sôros poderiam inibir ou reforçar a lise, na dependência estrita do seu conteúdo relativo de gama-1 e gama-2.

ESTEVES, SANT'ANNA, ANNES e BINAGHI (1974) isolaram do soro de carneiro anti-DNP, duas imunoglobulinas da classe IgG e denominaram-as de IgS (slow) e IgF (fast) com relação às suas mobilidades eletroforéticas e verificaram que a IgS não ativava o complemento pela via clássica, e que a IgF tinha a propriedade de ativar por esta via.

SAKURADA (1974) mostrou que a IgS dos soros de carneiro anti-IgG de coelho, tinha a capacidade de inibir a lise das hemácias de carneiro, sensibilizadas pelo complexo soro albumina bovina (SAB) e soro de coelho anti-SAB. Utilizando imunoglobulinas do tipo IgS isoladas do soro de carneiro anti IgG de coelho, específicas para os determinantes antigênicos das regiões Fab e Fc da IgG de coelho e empregando o modelo utilizado por RANGEL (1968) foi possível a SAKURADA (1974) verificar que a inibição da lise do sistema SAB e anti-SAB por estes antisoros foi de 85 a 90%.

Estes dados sugerem a possibilidade de se utilizar a IgS de carneiro anti IgG de coelho para o estudo da inibição da imuno hemólise pelos soros anti imunoglobulina. Entretanto, o mecanismo desta inibição não é conhecido, e o presente trabalho foi realizado com o objetivo de contribuir para o conhecimento do mecanismo desta inibição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Antígenos

Soro normal de coelho. O soro normal de coelho foi obtido a partir do sangue coletado no matadouro da granja Selecta na cidade de Itu, do Estado de São Paulo. Este sôro era armazenado a -20°C até o momento de uso.

IgG de coelho. A IgG de coelho foi obtida através da cromatografia em coluna de DEAE celulose (24,0 cm X 1,5 cm) a partir de porções de 25 ml do soro normal de coelho, contendo um total de 1,3g de proteínas. A coluna estava prèviamente equilibrada com tampão fosfato 0,02M pH 8,0 e o material foi eluído com o mesmo tampão a um ritmo de 60 ml por hora, tendo sido coletado 10 ml por tubo. As frações eluídas nos volumes de 140 a 200 ml, foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C durante 2 horas e liofilizadas.

Soro normal de carneiro. Os carneiros normais foram sangrados por punção venosa e o soro obtido, foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

IgG do soro normal de carneiro. A IgG do soro normal de carneiro foi obtida através da cromatografia em coluna de DE (52) celulose (2,0 cm X 42,0 cm) a partir de porções de 18 ml do soro contendo um total de 1,98g de proteínas. A coluna estava prèviamente equilibrada com tampão fosfato 5mM pH 8,0 e o material foi eluído com o mesmo tampão, a um ritmo de 60 ml por hora, tendo sido coletado 5,0 ml por tubo. As frações eluídas nos volumes de 40 a 90 ml foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C durante 2 horas e liofilizadas.

2.2. Imunesoros.

Soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro. Cedido pelo Dr^o Humberto A. Rangel, continha um título de anticorpos hemolíticos de 1:1000

Sôro de coelho anti-soro normal de carneiro. Os coelhos foram imunizados inculando nos linfonodos 0,5ml da mistura em partes iguais do antígeno (10 mg/ml) e de adjuvante completo de Freund, quatro semanas após a primeira dose, os animais foram inoculados por via intramuscular, com 1,0 ml da mistura em partes iguais do antígeno (10 mg/ml) e de adjuvante completo de Freund.

Os animais foram sangrados duas semanas após a última dose. O sôro era então separado e inativado a 56°C durante 30 minutos.

Sôro de coelho anti-IgG de carneiro. Os coelhos foram imunizados com IgG normal de carneiro, seguindo-se o esquema utilizado para a obtenção do sôro de coelho anti-soro normal de carneiro. O sôro foi inativado a 56°C durante 30 minutos, e absorvido por três vezes com papa de hemácias de carneiro e armazenado a -20°C até o momento de uso.

Soro de carneiro anti-sôro normal de coelho. Os carneiros foram imunizados pela inoculação intramuscular, de quatro injeções de 1,0 ml da mistura em partes iguais do antígeno (10 mg/ml) em adjuvante completo de Freund, com intervalos de 30 dias entre cada inoculação. A seguir, foram efetuadas duas inoculações intramusculares de 1,0 ml da mistura em partes iguais do antígeno (10 mg/ml) em solução de NaCl 0,15M com intervalos de sete dias entre cada inoculação.

Após uma semana da última inoculação, os carneiros foram sangrados, separado o soro, e este inativado a 56°C durante 30 minutos e armazenado a -20°C até o momento de uso.

Sôro de carneiro anti-IgG de coelho. Os carneiros foram imunizados, tendo sido seguido o esquema preconizado por ESTEVES, SANT'ANNA, ANNES, SINACHI (1974).

2.3. IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro. A fração IgG da hemolisina, foi obtida através da cromatografia em coluna de DAE celulose (2,0 cm X 41,0 cm) a partir de porções de 25 ml do imunesoro, contendo um total de 1,4g de proteínas. A coluna estava previamente equi

librada com tampão fosfato 0,02M pH 8,0 e o material foi eluído primeira mente com o mesmo tampão a um ritmo de 60 ml por hora, tendo sido coleta do 5,0 ml por tubo. Após a eluição dos 225 ml, foi substituído o tampão inicial pelo tampão fosfato 0,05M pH 8,0 e mantido o mesmo fluxo e volume coletado. As frações eluídas nos volumes de 165 a 150 ml foram reunidas e denominadas de FI; as eluídas nos volumes de 300 a 325 ml foram reunidas e denominadas de FII; e as eluídas nos volumes de 345 a 375 foram reuni das e denominadas de FIII. As concentrações proteicas destas frações deter minadas pelo método de biureto, foram de 1,0 mg/ml para a FI, de 0,8 mg/ml para FII e de 1,6 mg/ml para a FIII.

2.4. IgG do sôro de carneiro anti-IgG de coelho. A IgG do sôro de carnei ro anti-IgG de coelho, foi fracionada de maneira idêntica à da obtenção da IgG do sôro normal de carneiro, com as modificações de que o volume do imunesoro era de 42,0ml, contendo um total de 3,2g de proteínas e a colu na de DE (52) celulose, era de 2,0 cm X 56,0 cm. As frações eluídas nos volumes de 120 a 165 ml foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em membrana de Amicon. A concentração proteica desta fração, determinada pelo método de biureto foi de 5,7 mg/ml e a concentração de proteínas de anticorpo pesquisada pelo método de precipitação em meio líquido, foi de 1,4 mg/ml.

2.5. Complemento. Como fonte de complemento, foi utilizado a mistura do sôro de 20 a 30 cobaias normais, liofilizado e armazenado a -70°C.

2.6. Soluções tampões. As soluções tampões, foram preparadas como indica do por GONDRI (1965). O tampão veronal sódico, contendo quantidades óti mas de Ca^{++} e Mg^{++} foram preparadas segundo MAYER, OSLER, BIER e HEIDEL BERGER (1948) com a adição de gelatina a 1% como indicado por STEIN e VAN NGU (1950). O tampão veronal sódico contendo EDTA 0,01M a pH 7,4 foi preparado de maneira similar, com excessão da ausência de Ca^{++} Mg^{++} e gelatina. O tampão fosfato utilizado para a hemólise passiva, foi prepara do como indicado por RANGEL e REPKA (1965).

2.7. 4' 4' bifenil-bis-diazonio-fluoroborato (BDF). Preparado segundo

as instruções de ROE (1967) e este reagente foi cedido pela Dr.^a Marlene B. Serafim e conservado a -20°C .

2.8. Hemácias de carneiro. O sangue de carneiros normais, colstados assêpticamente por punção venosa, em igual volume de solução de Alsever esté ril, como indicado em MAYER (1961) e armazenado a 4°C foi utilizado co mo fonte de hemácias. Estas hemácias foram utilizadas entre o 7^o e o 40^o dia após a obtenção.

2.9. Padronização das hemácias de carneiro. As hemácias foram lavadas em tampão veronal isotônico, e padronizadas de modo que a diluição 1/10 em água destilada, fornecesse uma D.O. de 0,42 a 550 nm. Esta suspensão con têm aproximadamente 1.10^9 hemácias por ml. Para a técnica da hemólise pas siva indireta, as hemácias foram lavadas em salina fosfatada e padroniza das de modo que a diluição de 1/20 em água destilada, fornecesse uma D.O. de 0,42 a 550 nm. Esta suspensão continha aproximadamente 2.10^9 hemácias por ml.

2.10. Preparo do sistema hemolítico (EA). Os sistemas hemolíticos foram preparados misturando-se volumes iguais de suspensão de hemácias de car neiro padronizadas e hemolisina A2 diluído a 1:16, ou hemolisina total di luída a 1:1000. A seguir os tubos foram incubados durante 30 minutos ou 2 horas a 37°C .

Após a incubação, as misturas foram lavadas por três vêzes em tampão vero nal isotônico, e repadronizadas de modo que a diluição a 1/5 em água des tilada fornecesse uma D.O. de 0,42 a 550 nm. Esta suspensão continha apro ximadamente 5.10^8 hemácias sensibilizadas por ml.

2.11. Preparo das hemácias de carneiro conjugadas com IgG do sôro normal de coelho. (E.IgG). A conjugação da IgG à hemácias de carneiro, foi rea lizada seguindo-se as indicações de RANGEL e REPKA (1965) com a modifi cação de que o ligante bifuncional empregado foi o BDF utilizado também por SERAFIM (1974), utilizando-se as seguintes condições: 5,0 ml da sus pensão de hemácias padronizadas de acôrdo com os autores, 40 mg de IgG de coelho dissolvidas em 1,0 ml de solução de NaCl 0,16M e 5,0 ml de BDF di

luído a 1:125 em salina fosfatada e a mistura incubada a 0°C durante 30 minutos. Após a incubação a mistura foi lavada em salina fosfatada, a seguir em tampão veronal isotônico e repadronizadas de modo que a diluição a 1/5 em água destilada fornecesse uma D.O. de 0,42 a 550 nm. Esta suspensão continha aproximadamente 5.10^6 hemácias sensibilizadas por ml.

2.12. Preparo e dosagem de Cl parcialmente purificado e do R1. Os reagentes Cl e R1, foram preparados a partir do soro normal de cobaias, pelo método da diluição como descrito em MAYER (1961).

Para a dosagem, 0,5 ml de diluições seriadas de Cl ou de R1, foram misturadas ao sistema hemolítico EA e como controle, a hemácias padronizadas e incubados a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação os tubos eram centrifugados e o grau de lise, determinado a 550 nm. Verificamos que a diluição de Cl a 1:10 e a de R1 a 1:8 em tampão veronal isotônico, quando incubados individualmente com o sistema hemolítico ou com hemácias padronizadas, não induziam à hemólise, no entanto obteve-se lise quando ambos os reativos foram adicionados ao sistema hemolítico.

2.13. Preparo do complexo constituído pelo sistema hemolítico e Cl parcialmente purificado. O complexo EA2Cl foi preparado, misturando-se 0,5 ml do sistema hemolítico EA2 a 0,5 ml de Cl diluído a 1:10 em tampão veronal isotônico. A mistura foi incubada a 0°C durante 30 minutos e após a incubação as hemácias foram lavadas em tampão veronal isotônico e repadronizadas de modo que a diluição a 1/5 desta suspensão em água destilada, fornecesse uma D.O. de 0,42 a 550 nm.

2.14. Cromatografias em DEAE celulose. As indicações de SÖBER et al. (1956) foram seguidas para a realização das cromatografias em DEAE celulose.

2.15. Imunoeletroforese. As técnicas de imunoeletroforese, foram realizadas segundo as indicações de SCHEIDEGGER (1955) em lâminas de vidro de 2,5 cm X 7,5 cm contendo uma camada de 3 mm de ágar a 1% em tampão veronal 0,05M pH 8,6 e foi empregado um gradiente de potencial de 4 V/cm durante 90 minutos a 4°C.

2.16. Reação de precipitação em meio líquido. As reações de precipitação foram efetuadas segundo o método de HEIDELBERGER e KENDALL (1935).

2.17. Determinação das concentrações proteicas. As concentrações proteicas foram determinadas pelo método de biureto segundo DITTENBRAND (1948) ou pela determinação espectrofotométrica a 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ II sendo utilizadas cubas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico.

2.18. Hemólise passiva direta. As técnicas de hemólise passiva direta foram efetuadas segundo as indicações de RANGEL e REPKA (1965).

2.19. Hemólise passiva indireta. As técnicas de hemólise passiva indireta foram realizadas como descrito por RANGEL (1968) e em tôdas as reações de hemólise, os valores apresentados, representam a média de pelo menos duas determinações.

3. RESULTADOS

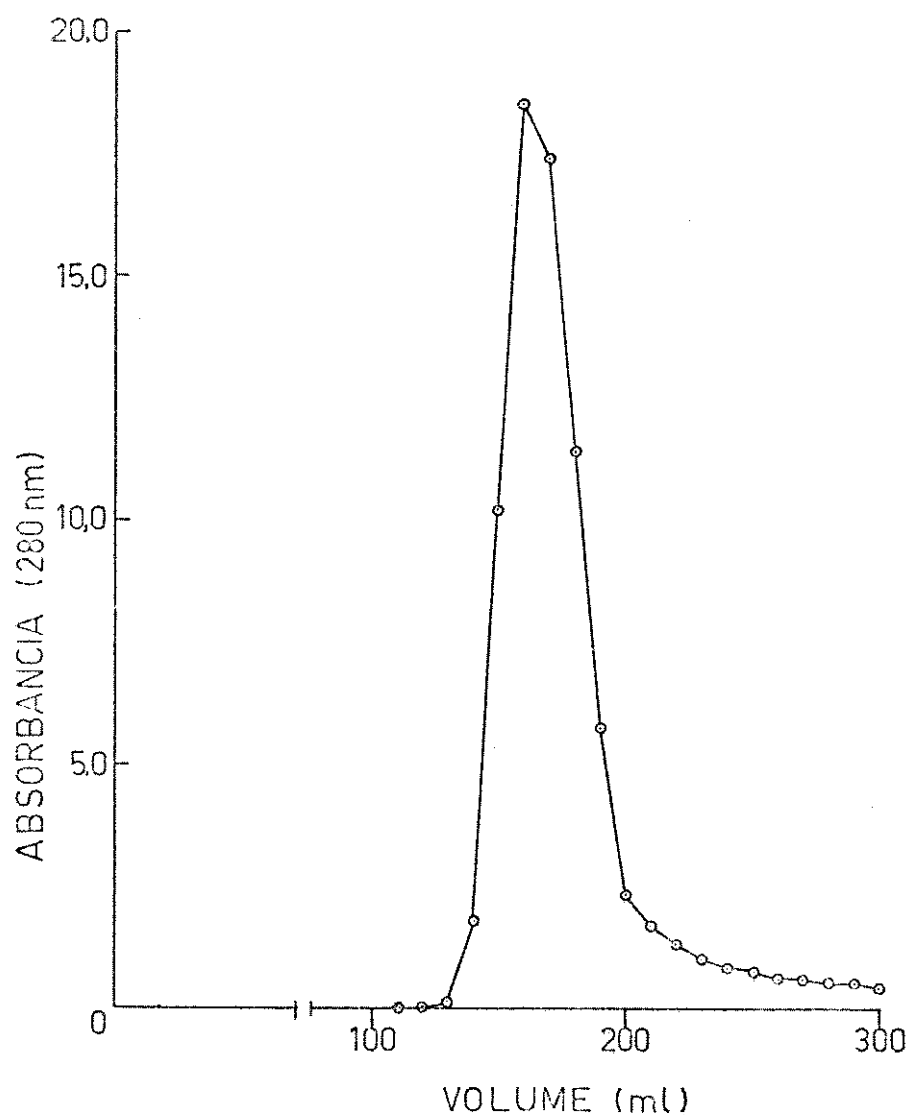
3.1. Contrôle dos reagentes e da especificidade dos antisoros.

A IgG de coelho, purificada por cromatografia (Fig. 1) quando testada por imunoeletroforese contra o sôro de carneiro anti soro normal de coelho, apresentou sômente um sistema precipitante na região das gama globulinas (Fig. 2).

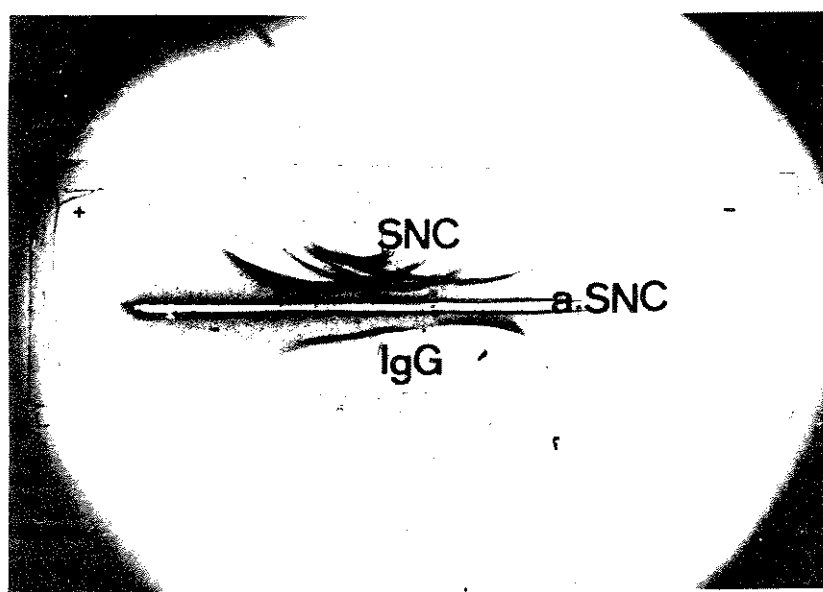
O sôro de carneiro anti IgG de coelho, obtido pela imunização dos carneiros com a IgG purificada, apresentou apenas um sistema precipitante quando testada por imunoeletroforese contra o soro normal de coelho (Fig. 3) .

A IgG do sôro de carneiro anti-IgG de coelho, e do sôro normal de carneiro purificadas por cromatografia em DE (52) celulose (Fig. 4 e 5) quando testadas por imunoeletroforese, utilizando-se o soro de coelho anti-soro normal de carneiro, apresentaram sômente um sistema precipitante na região das gama globulinas (Fig. 6 e 7).

A purificação da IgG do soro de coelho anti estroma de hemácias de carneiro por cromatografia em DEAE celulose, nos forneceu as frações FI, FII e FIII (Fig. 8) e quando testadas por imunoeletroforese utilizando-se sôro de carneiro anti sôro normal de coelho, as frações FI e FII evidenciaram apenas um sistema precipitante na região das gama globulinas, enquanto que a FIII apresentou vários sistemas precipitantes (Fig. 9).



- Fig. 1. Cromatografia em DEAE celulose da IgG do sêro normal de coelho.



- Fig. 2. Imunoeletroforese do soro normal de coelho (10 mg/ml) e da IgG do sêro normal de coelho (10 mg/ml)
 a.SNC: Sêro de carneiro anti-sêro normal de coelho.

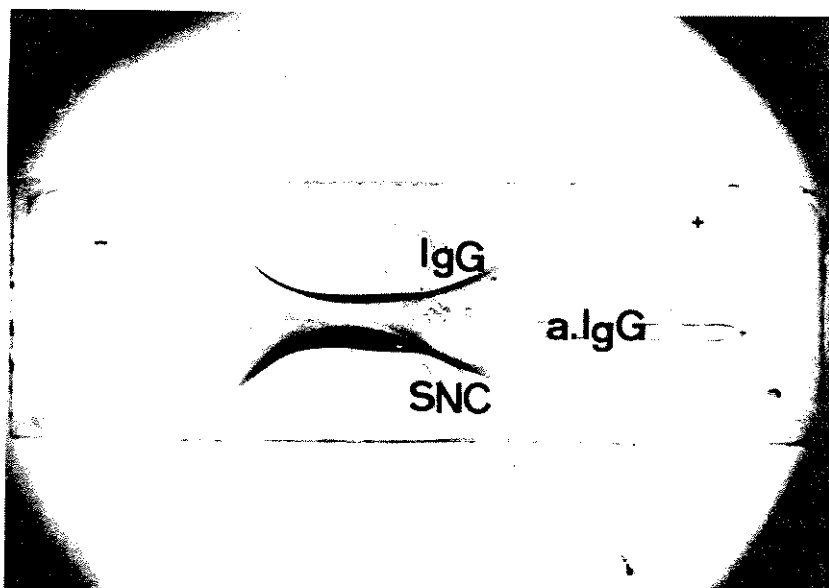


Fig. 3. Imunoeletroforese da IgG do soro normal de coelho (10 mg/ml) e do soro normal de coelho (10 mg/ml) a.IgG: Soro de carneiro anti-IgG de coelho.

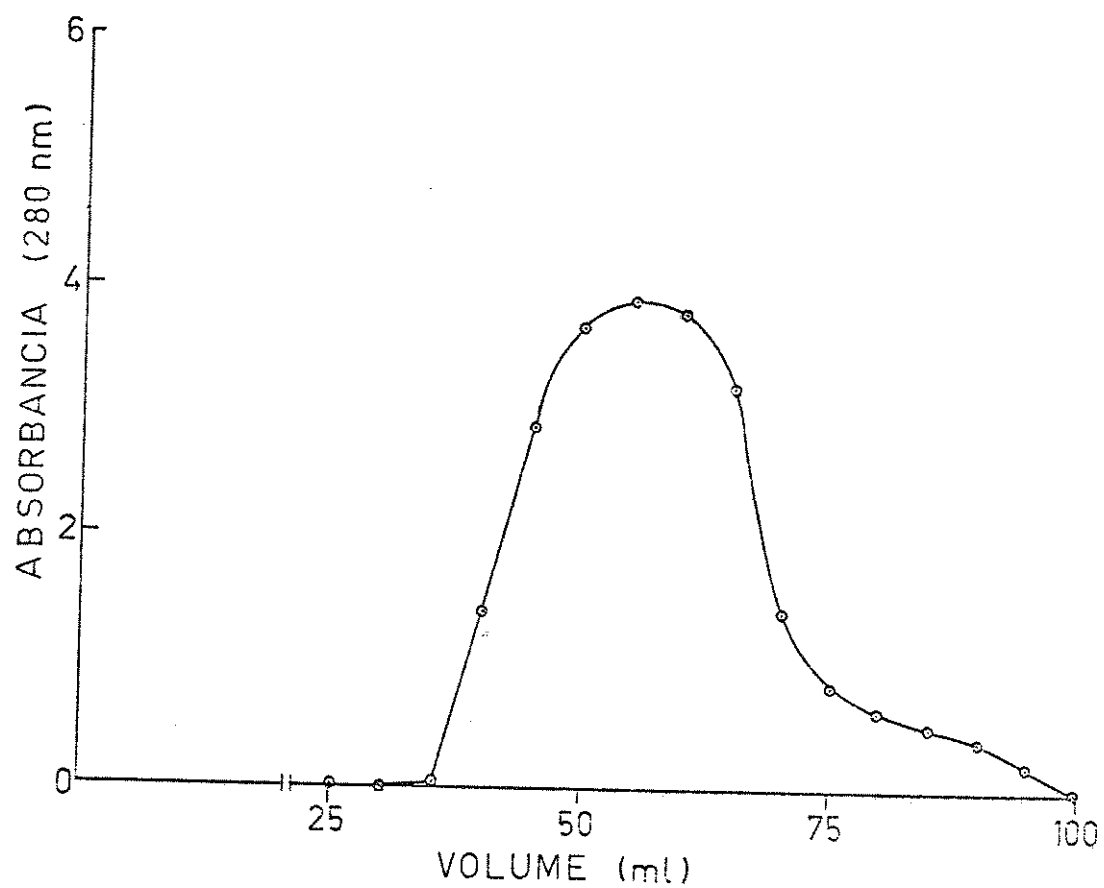


Fig. 4. Cromatografia em DE (52) celulose da IgG do soro de carneiro anti-IgG de coelho.

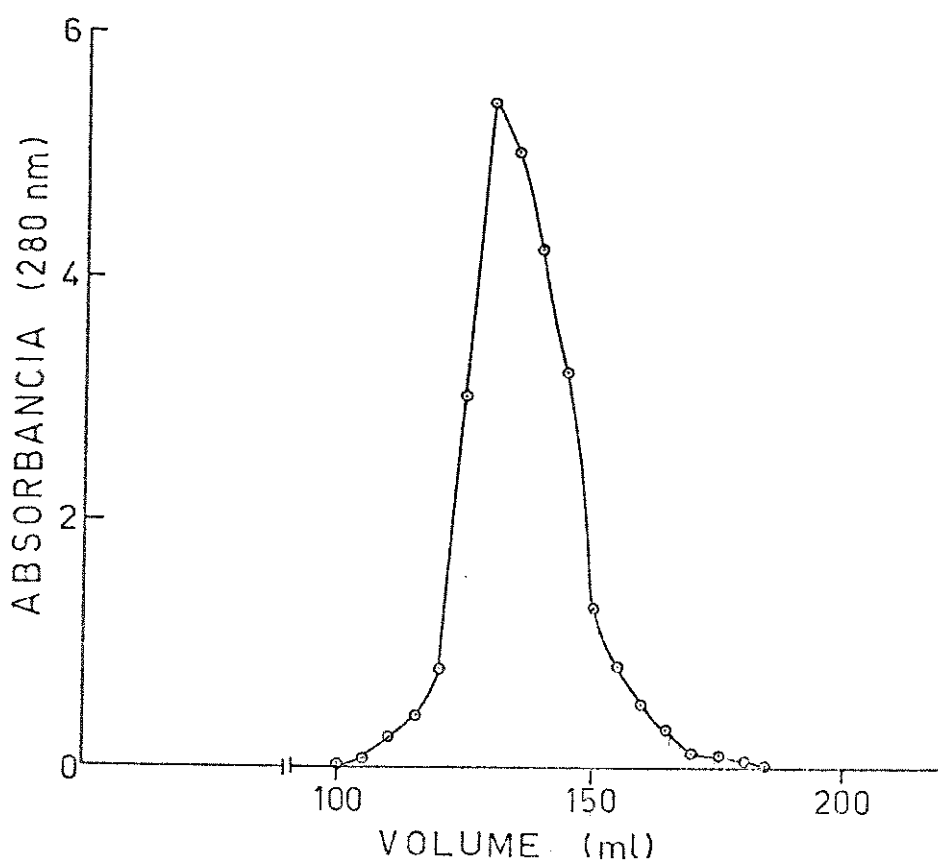


Fig.5. Cromatografia em DE (52) celulose da IgG do soro normal de carneiro.

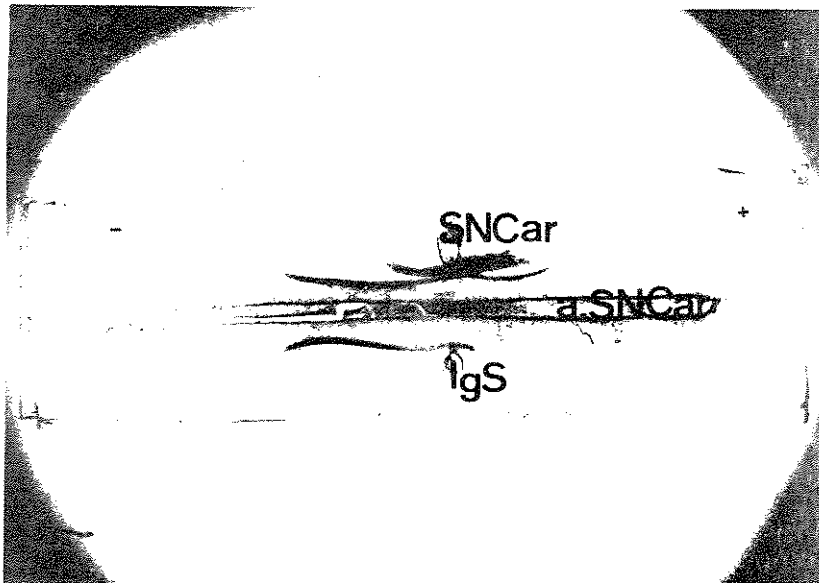


Fig.6. Imunoeletroforese da IgS do soro de carneiro anti-IgG de coelho (5,7 mg/ml) e do soro normal de carneiro (10 mg/ml).

a. SNCar: Soro de coelho anti-soro normal de carneiro.

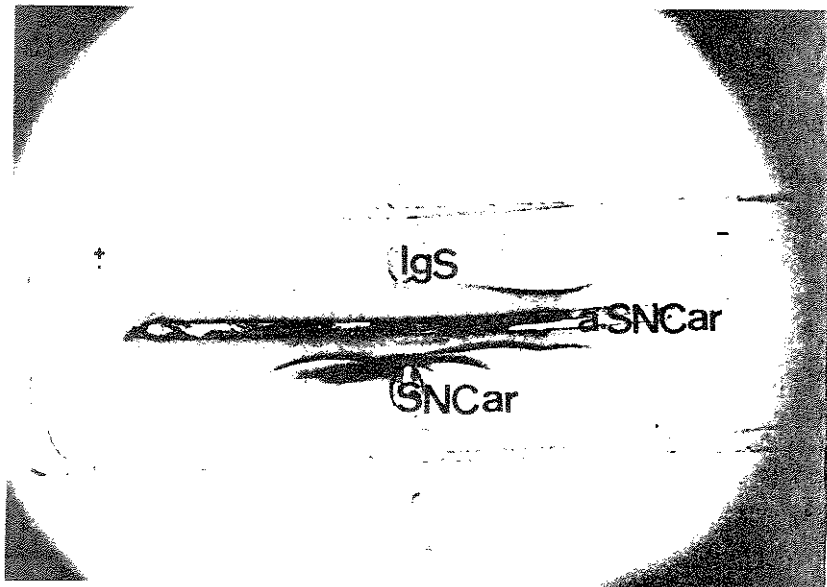


Fig.7. Imunoeletroforese da IgS do soro normal de carneiro (10 mg/ml) e do soro normal de carneiro (10 mg/ml).

a. SNCar: Soro de coelho anti-soro normal de carneiro.

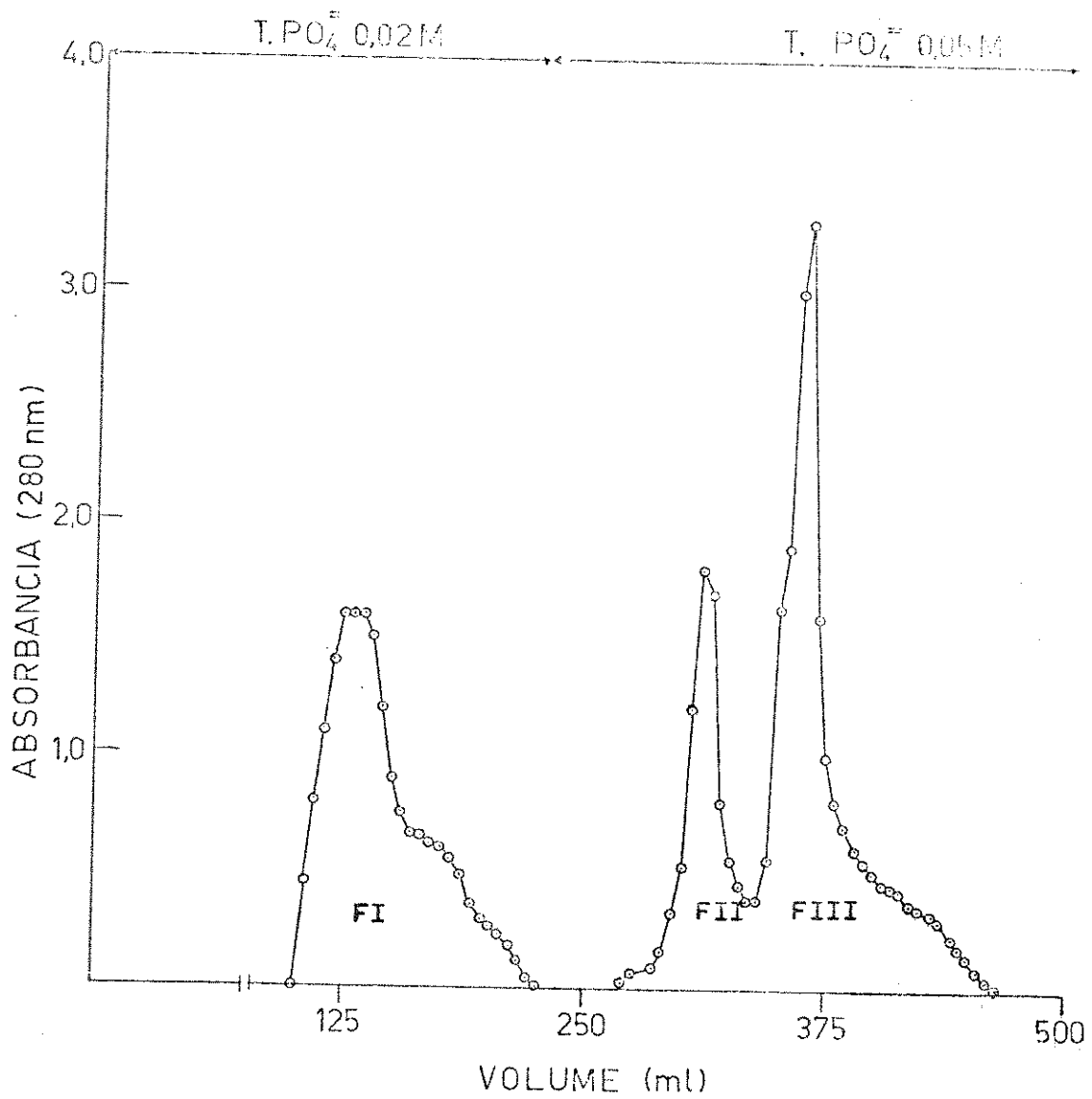


Fig.8. Cromatografia em DEAE celulose do sôro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro.

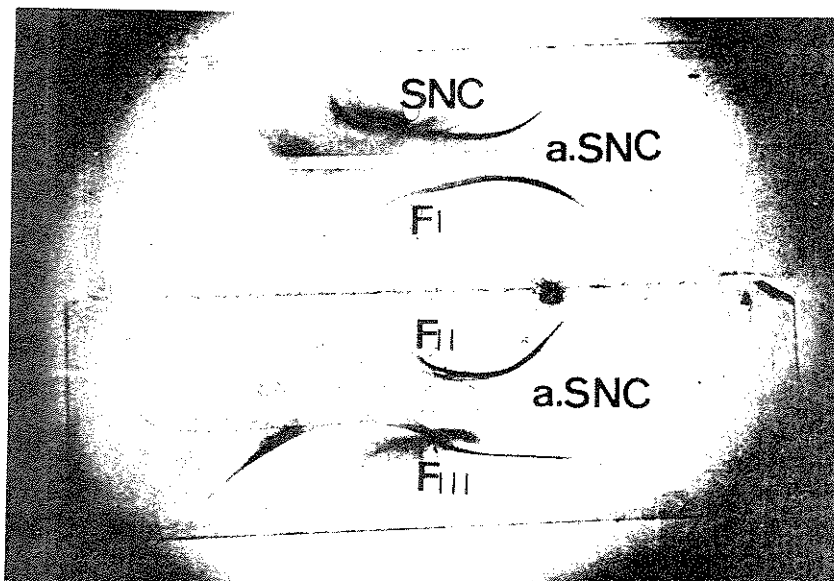


Fig.9. Imunoelctroforese do sôro normal de coelho (10 mg/ml) e das frações FI, FII, FIII (10 mg/ml).

3.2. Determinação do título dos anticorpos hemolíticos da fração IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro.

A um volume de 0,25 ml de hemácias de carneiro lavadas e padronizadas, foram adicionados iguais volumes de diluições seriadas da hemolisina A2 completados os volumes para 2,0 ml com tampão veronal isotônico e os tubos foram incubados a 37°C durante 30 minutos ou 2 horas.

Após a incubação, foram adicionados a todos os tubos 0,5 ml de complemento contendo 8 CH50/ml e incubados novamente a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados e a D.O. dos sobrenadantes determinada a 550 nm.

Os resultados estão expressos nas Tabelas 1 e 2, onde podemos verificar que o título dos anticorpos hemolíticos da fração A2 foi de 1:16 e este título não sofreu alteração com o prolongamento do tempo de incubação.

Tabela 1. Determinação do título hemolítico da hemolisina A2.
(Tempo de incubação de 2 horas a 37°C).

<u>Diluições da hemolisina</u>	<u>% de lise</u>
1:2	100
1:4	100
1:8	100
1:16	100
1:32	87,5
Contrôles	
E + hemolisina (dil. 1:2)	0,0
E + T + C	2,8

Tabela 2. Determinação do título hemolítico da hemolisina A2.
(Tempo de incubação de 30 minutos a 37°C).

<u>Diluições da hemolisina</u>	<u>% de lise</u>
1:2	100
1:4	100
1:8	100
1:16	100
<u>Contrôles</u>	
E + hemolisina (dil. 1:2)	0,0
E + T + C	2,1

3.3. Inibição quantitativa da lise de EA2 pela IgSac.

Com a finalidade de determinar a concentração mínima de IgSac capaz de inibir a lise do sistema hemolítico, a este foi adicionado igual volume de IgS contendo diferentes concentrações de proteínas de anticorpo e foram completados os volumes de reação para 2,0 ml com tampão veronal isotônico e incubados a 37°C durante 30 minutos.

Após a incubação, a todos os tubos foram adicionados 0,5 ml de complemento contendo 8 CH50 por ml e incubados a 37°C durante 45 minutos.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados e as D.O. dos sobrenadantes, determinadas a 550 nm. Os resultados acham-se expressos na Tabela 3, onde podemos verificar que a concentração de 20ug de proteínas de anticorpo por ml foi suficiente para inibir totalmente a lise do sistema hemolítico e na Figura 10 onde observamos que existe uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de IgSac e o logaritmo da função $(y/1-y)$, permitindo a determinação da quantidade de IgSac capaz de inibir 50% da lise do sistema hemolítico.

Tabela 3. Inibição quantitativa da lise de EA2 pela IgSac.
(hemácias sensibilizadas com A2 diluído a 1:16
e incubado 30 minutos a 0°C.

Concentração de IgS (ug de proteínas de Ac/ml)	% de lise
40	0,0
20	0,0
10	2,3
5	70,0
2,5	87,9
Contrôles	
EA2 + T	0,0
EA2 + T + C	100
E + T + C	4,3

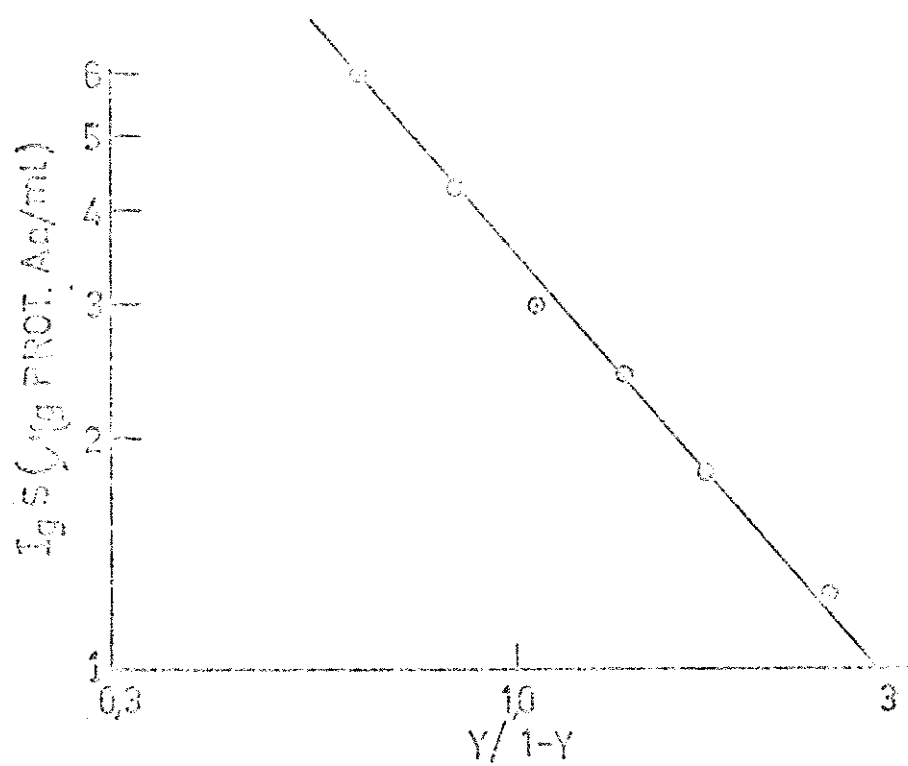


Fig.10. Determinação quantitativa da IgSac.

3.4. Fixação do complemento por EA2 em presença da IgG

A fim de verificar se nas condições experimentais utilizadas presentemente, poderia estar havendo algum consumo de complemento durante a incubação da IgSac com EA2, foram realizadas experiências em que EA2 foi previamente misturada a igual volume de uma solução de IgG contendo 20ug de proteínas de anticorpo por ml e colocada em presença de complemento contendo 8 CH50 por ml e incubado por 18 horas a 0°C.

Os controles foram constituídos de EA2 com IgSn contendo 100ug de proteínas totais e de complemento contendo 8 CH50 por ml e tamanho.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados e o complemento existente nos sobrenadantes foi retitulado. Os resultados estão esquematizados na Tabela 4, onde podemos verificar que o título do complemento no tubo contendo EA2 com IgSac não sofreu alteração apreciável em relação ao controle e que no sistema contendo EA2 com IgSn houve absorção do complemento.

Tabela 4. Fixação do complemento por EA2 em presença da IgG

<u>Composição da mistura</u>	<u>U CH50/ml após a reação</u>
EA2 + IgSn + C	<1
EA2 + IgSac + C	7,9
T + C	8,0

3.5. Ação da IgSac sobre o complexo EA2Cl.

A fim de verificar se a IgSac era capaz de inibir a imuno hemólise quando o complexo estava no estágio de EA2Cl, a seguinte experiência foi realizada: EA2 foi misturado a Cl ou a IgSac (20ug de proteínas de anticorpo por ml) e incubada a 0°C durante 30 minutos. Após o período de incubação, ao tubo que continha EA2Cl foi adicionado IgSac e aos tubos contendo EA2 e IgSac foi adicionado Cl. Os tubos foram novamente incubados por 30 minutos a 0°C e ao fim deste período, foi adicionado R1 a todos os tubos e incubados a 37°C durante 45 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados e as D.O. dos sobrenadantes, determinadas a 550nm. Os resultados estão expressos na Tabela 5 onde podemos verificar que não houve inibição da hemólise, quando Cl foi incubado com EA2 antes da adição da IgS, e que houve praticamente inibição total da hemólise, quando a IgS foi incubada antes da adição de Cl.

Tabela 5. Ação da IgSac sobre o complexo EA2Cl.

<u>Composição e ordem de adição dos reagentes</u>		<u>% de lise</u>
<u>1ª etapa</u>	<u>2ª etapa</u>	
EA2 + Cl (dil.1:10) +	IgSac (20ug/ml) + R1 (dil.1:8)	90,2
EA2 + IgSac (20ug/ml) +	Cl (dil.1:10) + R1 (dil.1:8)	14,1
<u>Contrôles</u>		
EA2 + Cl + R1		95,1
EA2 + IgSac + R1		0,0
EA2 + Cl		3,4
EA2 + IgSac		0,0
EA2 + R1		3,4
EA2		0,0
E + IgSac + R1		2,4
E + R1		2,1

3.6. Absorção da IgSac por EA2 e EA2C1.

A fim de verificar se EA2 e EA2C1 absorvem diferentes quantidades de IgSac, a experiência indicada a seguir foi realizada: porções de 2,0 ml de suspensões de E, EA2 e EA2C1, foram misturadas a 1,0 ml de IgSac (20 ug de proteínas de Ac/ml) e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados e o conteúdo de IgSac nos sobrenadantes foi determinado utilizando-se a técnica da hemólise passiva indireta. A capacidade destes sobrenadantes em inibir a lise de hemácias EA2 foi igualmente determinada nas seguintes condições: aos sobrenadantes foi adicionado EDTA na concentração final de 0,01M e diluições seriadas foram feitas em tampão veronal contendo EDTA. Essas diluições foram misturadas a EA2 e incubadas a 37°C por 30 minutos. As hemácias foram então lavadas em tampão veronal isotônico e ressuspensas em 2,0 ml do mesmo tampão. Estas suspensões foram misturadas com 0,5ml de complemento contendo 8 CH 50 por ml e incubadas a 37°C durante 45 minutos. Após este período os tubos foram centrifugados e as D.O. dos sobrenadantes foram determinadas a 550 nm. A quantidade de IgSac capaz de inibir 50% da lise, foi determinada utilizando-se a relação linear existente entre o logarítmo da concentração de IgSac e o logarítmo da função $y/1-y$.

Os dados obtidos, apresentados na Tabela 6, mostraram que não houve diferença significativa na quantidade de IgSac absorvida por EA2 e EA2C1 e que a quantidade de IgSac dos diferentes sobrenadantes, capazes de provocar 50% de inibição de lise, também não foram significativamente diferentes.

Tabela 6. Concentrações de IgSac nos sobrenadantes das reações entre IgSac (20ug/ml) e E, EA2 e EA2C1.

Sobrenadantes da reação:	Quantidade de IgSac (ug de Prot.Ac/ml)	Inibição 50% de lise (ug de Prot.Ac/ml)
E + IgSac	20	3,5
EA2 + IgSac	6,4	2,9
EA2C1 + IgSac	6,8	3,4

4. DISCUSSÃO

Vários autores (BORDET 1904; SHRLICH 1906; FRIEDBERGER e MORESCHI 1907; ALTMAN 1912; LA FORTE, DE LOOZE e ROULIER 1950) utilizando imunesoros anti-hemolisina, demonstraram que a lise do sistema hemolítico pelo complemento, era parcial ou totalmente protegida se o sistema era previamente incubado com o soro anti-hemolisina.

Esses autores, utilizaram em suas experiências, imunesoros anti-hemolisina total, não se tendo uma idéia da classe de imunoglobulina que estava presente nestes soros.

O fracionamento do soro imune de cobaias, permitiu a BELAGERRAF et al. (1963) demonstrar que existem duas imunoglobulinas da classe IgG com diferentes mobilidades eletroforéticas que foram denominadas de gama-1 a que possuía mobilidade mais rápida e de gama-2, a mais lenta.

Sobre o papel biológico destas imunoglobulinas, BLOCH et al. (1963) verificaram que a gama-1 não ativava o complemento e que a gama-2 tinha a propriedade de ativá-lo. OVARY, BELAGERRAF e BLOCH (1963) relataram que a gama-1 era capaz de induzir a anafilaxia e a gama-2 não tinha esta propriedade.

RANGEL (1968) utilizando gama-1 e gama-2 isoladas do soro de cobaias anti-IgG de coelho, indicou que a primeira tinha a capacidade de inibir a lise das hemácias de carneiro sensibilizadas pelo complexo soro albumina bovina (SAB) e soro de coelho anti-SAB e que a gama-2 tinha a capacidade de reforçar a lise do sistema.

A existência de diferentes subclasses de IgG em animais imunizados, foi observada em diferentes animais, entre os quais, o carneiro. SILVERSTEIN et al. (1963) verificaram a presença de duas diferentes classes de IgG no soro imune de carneiros e estas subclasses foram designadas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas de IgF (fast) e IgS (slow) por estes autores, ou de gama-1 e gama-2 respectivamente por WALUND, OSSEBOLD e MURPHY (1965). HARRISON e MAGE (1967) indicaram que as cadeias pesadas, bem como as imunoglobulinas intactas, diferem antigenicamente, eletroforeticamente e em composição de aminoácidos. Tais diferenças, não foram encontradas entre suas cadeias leves. Sobre a ação biológica destas imunoglobulinas, ESTEVES et al. (1974) verificaram que a IgS não fixa

complemento pela via clássica e induz anafilaxia cutânea passiva na espécie homóloga. Esta atividade não é destruída pelo aquecimento a 56°C durante 3 horas, ou pela ação de 2-mercaptoetanol. A IgG fixa complemento, mas é incapaz de induzir anafilaxia cutânea passiva na espécie homóloga e sim na heteróloga (em cobaias).

SAKURADA (1974) trabalhando com a IgG de carneiro anti-IgG de coelho, verificou também que esta imunoglobulina inibia a lise de hemácias de carneiro conjugadas com SAB e o soro anti-SAB. Os dados apresentados no presente trabalho, estendem aquelas observações ao sistema anticeptor e mostra que quando se utiliza hemácias sensibilizadas com a fração IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro, existe uma relação quantitativa entre a quantidade de IgG e o grau de lise do sistema hemolítico. A existência dessa relação quantitativa, sugere que a IgG e o complemento de coelha, competem para os mesmos determinantes, ou determinantes próximos. Esta competição é também sugerida nos trabalhos de FRIEDBERG e MORESCHI (1907) e o de ROMEYN e ONYSKO (1964) pela observação de que quando a uma determinada concentração de complemento e de anti-hemolisina são adicionados simultaneamente ao sistema hemolítico, ocorria menos inibição da lise do que quando o inibidor era incubado com o sistema e que dobrando-se a concentração de anti-hemolisina para uma mesma concentração de complemento, havia maior inibição da lise.

Em nossas experiências, observamos também que não houve absorção significativa do complemento quando o sistema hemolítico era incubado com a IgG anti-IgG e complemento por 18 horas a 0°C, temperatura esta demonstrada por BORSOS et al. (1968) ser a ótima para a fixação do complemento pela IgG. Nas condições utilizadas não houve eluição apreciável da IgG do sistema hemolítico, este dado indica que a IgG utilizada tem grande avidade pela IgG e que muito provavelmente nenhum dos componentes do complemento foi absorvido. Esses dados, mais o fato de que utilizamos complemento diluído, permitem afastar a hipótese de que o complexo IgG e anti-IgG esteja ativando a via alternativa de ativação do complemento (OSLER 1970; SANDBERG, OLIVEIRA e OSLER 1971).

Existem evidências experimentais (LEFGOW et al. 1963) que o primeiro componente do sistema complemento C1, se encontra no soro na forma de pró-enzima, sendo um complexo macromolecular Ca^{++} dependente, que se dissocia

reversivelmente com C3b em três subunidades denominadas de C1q, C1r e C1s e que a fixação de C1q a um sistema antígeno anticorpo capaz de ativar o complemento, ativa C1s por limitada proteólise, iniciando a ativação do complemento denominada de via clássica (MULLER-EBERHARD 1975).

Em nossos experimentos, verificamos que a IgSac inibiu a lise das hemácias EA2 mas não inibiu a lise das hemácias EA2C1 quando estas estavam em presença de R1 ou do complemento total, mostrando que a IgSac inibe a fixação e consequente ativação de C1. Provavelmente C1 foi liberado do complexo em presença da IgSac, porquanto não houve diferença significativa na quantidade de IgSac absorvida por EA2 ou por EA2C1. Por outro lado, a IgSac após a absorção por EA2 e EA2C1 continuava a inibir a lise de EA2 na mesma dose dos controles, indicando que não houve um aumento da especificidade da inibição da IgSac após a absorção.

Estas observações, estão de acordo com as informações existentes sobre a labilidade de C1 com EA, pois como demonstrado por BORSGO e RAPP (1965) C1 pode ser deslocado de um sistema antígeno anticorpo, com o aumento da força iônica do tampão. Ademais as observações de KIMURA, EULITZ e THIERFELDER (1970) utilizando os sêros de cão e de carneiro anti-Ig3 de coelho, indicaram que estes imunesoros eram capazes de provocar a liberação de C1 previamente fixado ao complexo EAC142.

O mecanismo pelo qual uma determinada classe de imunoglobulina inibe a reação da imuno hemólise permanece ainda desconhecido, não se sabendo se tal inibição ocorre devido a um impedimento estérico do sítio de ativação da molécula de anticorpo, ou por modificações alostéricas da molécula de imunoglobulina. Recentemente OVARY et al. (1976) em um teste para determinar as propriedades inibitórias dos fragmentos Fab dos anticorpos de cobaias dirigidos contra diferentes porções da molécula de Ig3 de coelho, verificaram que os fragmentos Fab dos sêros de cobaias anti-Fab, anti-Fc e anti-região de homologia C_H3 da Ig3 de coelho anti-DNP-333 possuíam a capacidade de inibir a fixação do complemento, sugerindo que esta inibição poderia refletir a contribuição de outras partes da molécula na capacidade em ativar o complemento por conseguinte, pode-se supor resultar de um efeito conformacional na região de homologia C_H2 e os dados atualmente apresentados não eliminam a possibilidade de que um efeito alostérico esteja implicado no fenômeno da inibição.

RESUMO E CONCLUSÕES

Com a finalidade de estudar o mecanismo da inibição da imuno hemólise por anticorpos anti-IgG, foram realizadas experiências utilizando-se hemácias sensibilizadas com a fração IgG isolada da hemolisina de coelho e anticorpos de carneiro anti-IgG de coelho da classe IgG purificada através de cromatografia de troca iônica. Os dados obtidos mostraram que:

1ª- Existe uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de IgG e o logaritmo da função $y/1-y$, sugerindo que a IgG e o complemento competem para os mesmos determinantes ou determinantes próximos entre si.

2ª- A IgG foi capaz de impedir a lise do complexo EA e não foi capaz de impedir a lise do complexo EACl, indicando que a IgG impede a fixação de Cl.

3ª- Não houve diferença significativa na quantidade de IgG absorvida por EA ou por EACl e o sobrenadante dessas absorções se comportaram de modo similar na inibição da imuno hemólise, o que sugere fortemente que Cl foi liberado do complexo EACl pela ação da IgG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALUND, G., OSEBOLD, J.W., MURPHY, F.A. (1965) : Isolation and characterization of ovine gamma globulins.
Arch. Biochem. Biophys., 109, (1), 142.
- ALTMAN, K. (1912) : Ueber immunisierung mit ambozeptorbeladenen blutkoerchen.
Z. Immun. Forsch., 13, 219.
- BENACERRAF, B., OVARY, Z., BLOCH, K.J., FRANKLIN, E.F. (1963) : Properties of guinea pig 7S antibodies. I. Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies.
J. Exp. Med., 117, (4), 937.
- BLOCH, K.J., KOURILSKY, F.M., OVARY, Z., BENACERRAF, B. (1963) : Properties of guinea pig 7S antibodies. III. Identification of antibodies involved in complement fixation and hemolysis.
J. Exp. Med., 117, 966.
- BORDET, J. (1904) : Les propriétés des antisesibilisatrices et les théories chimiques de l'immunité.
Ann. Inst. Pasteur, 18, 593.
- BORSOS, T., COLTEN, H.R., SPALTER, J.S., ROBERTINE, N., RAPP, H.J. (1968) : The C'1a fixation and transfer test: examples of its applicability of the detection and enumeration of antigens and antibodies at cell surfaces.
J. Immunol., 101, (3), 392.
- COGLOMB, M., PORTER, R.R. (1975) : Characterization of a plasmin-digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that binds antigen and complement.
Biochem. J., 145, 177.
- DITTENBRAND, M. (1948) : Application of the Weischselbaum biuret reagent to the determination of spinal fluid protein.
Am. J. Clin. Pathol., 18, 439.

EHRlich, P. (1906) : Studies on Immunity.
 (Transl. by C. Boldman). Wiley, New York.

ESTEVEs, M.B., SANT'ANNA, O.A., ANNES, V.C.S., BINAGHI, R.A. (1974) : Characterization and properties of an anaphylatic 7S antibody in sheep.
 J. Immunol., 112, (2), 722.

FRIEDBERGER, E., MORESCHI, C. (1907) : Ueber hämolyse beschleunigende immunsubstanzen.
 Zbl. Bakt. (Orig.), 45, 346.

GOMORI, S. (1965) : Methods in Enzimology.
 Academic Press, New York, 1, 138.

HARRISON, E.T., MAGE, M.G. (1967) : Isolation and characterization of sheep gamma-1 and gamma-2 immunoglobulins and their polypeptide chains.
 Biochim. Biophys. Acta., 147, 52.

HEIDELBERGER, M., KENDALL, F.E. (1935) : The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera.
 J. Exp. Med., 61, 559.

HUMPREY, J.H. (1967) : Haemolytic efficiency of rabbit IgG anti-forssman antibody and its augmentation by anti-rabbit IgG.
 Nature, 216, (5122), 1295.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T., SUGAHARA, T. (1962) : Biological activity of soluble antigen-antibody complexes. VIII. Role of an antibody fragment in the induction of biological activities.
 J. Immunol., 88, (6), 690.

KIMURA, I., EULITZ, M., THIERFELDER, S. (1970) : Effect of anti-rabbit IgG antisera on immune haemolysis.
 Immunology, 19, 689.

- LA FORTE, R., DE LOOZE, L.H., ROULIER, P. (1960) : Immunesérum antihémo-
lytiques.
Ann. Inst. Pasteur, 79, 381.
- LEPOW, I.H., NAFF, G.B., TODD, E.W., PENSKY, J., HINZ, C.F. (1963) :
Chromatographic resolution of the first component of human complement
into three activities.
J. Exp. Med., 117, 983.
- MAYER, M.M., OSLER, A.G., BIER, C., HEIDELBERGER, M. (1948) : Quantita-
tive studies of complement fixation. I. A method.
J. Immunol., 59, (2), 195.
- MAYER, M.M. (1961) : In Kabat, E.A. and Mayer, M.M. " Experimental Immu-
nochemistry " 1^a ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois
- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1975) : Complement.
Annu. Rev. Biochem., 44, 697.
- OSLER, A.G. (1976) : In " Complement " Mechanisms and Functions.
Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- OVARY, Z., BENACERRAF, B., BLOCH, K.J. (1963) : Properties of guinea
pig 7S antibodies. II. Identification of antibodies involved in passi-
ve cutaneous and systemic anaphylaxis.
J. Exp. Med., 117, 951.
- OVARY, Z., SALUK, P.H., QUIJADA, L., LAMM, M.E. (1976) : Biologic acti-
vities of rabbit immunoglobulin G in relation to domains of the Fc re-
gion.
J. Immunol., 116, (5), 1265.
- PRESS, E.M. (1975) : Fixation of the first component of complement by
immune complexes: effect of reduction and fragmentation of antibody.
Biochem. J., 149, 285.

- RANSEL, H., REPKA, D. (1965) : The use of passive haemolysis in the quantitative estimation of anti-protein antibodies.
Immunology, 8, (6), 618.
- RANSEL, H. (1968) : Studies on passive haemolysis mediated by antiserum globulin antibodies.
Immunology, 14, (2), 197.
- REISS, A.M., PLESCIA, D.J. (1963) : Fixation of complement to fragments of antibodies.
Science, 141, (3583), 812.
- RE, A. (1967) : Preparation of aromatic fluorine compounds from diazonium fluoroborates. The Schiemann reaction. In " Organic reaction " ADAMS, R., Ed. New York, John Wiley, 5, cap. 4, 205.
- ROMEYN, J.A., ONYSKO, E. (1964) : The effects of " anti-antibody " on immune haemolysis.
Immunology, 7, 217.
- SAKURADA, J.K. (1974) : Estudo sobre a localização do sítio de ativação do complemento na molécula de IgG de coelho.
Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - São Paulo.
- SANDBERG, A.L., OLIVEIRA, B., OSLER, A.B. (1971) : Two complement interaction sites in guinea pig immunoglobulins.
J. Immunol., 106, (1), 282.
- SCHEIDEGGER, J.J. (1955) : Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy., 7, 103.
- SCHUR, P.H., BECKER, E.L. (1963) : Pepsin digestion of rabbit and sheep antibodies. The effect on complement fixation.
J. Exp. Med., 118, 891.

- UCHUR, F.H., CHRISTIAN, G.O. (1964) : The role of disulfide bonds in the complement-fixing and precipitating properties of 7S rabbit and sheep antibodies.
J. Exp. Med., 120, (4), 531.
- SERAFIM, M.B. (1974) : Estudos quantitativos sôbre o fenômeno da hemólise passiva indireta.
Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - São Paulo.
- SILVERSTEIN, A.M., THORBECKE, G.J., KRANER, K.L., LUKES, R.J. (1963) : Fetal response to antigenic stimulus. III. gamma-globulin production in normal and stimulated fetal lambs.
J. Immunol., 91, 384.
- SOBER, H.A., BUTTER, F.J., WICKOF, M.M., PETERSON, E.A. (1956) : Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange adsorbentes.
J. Am. Chem. Soc., 78, 751.
- STEIN, G.J., VAN NGU, D. (1950) : A quantitative complement fixation test titration of litic sera the unit of 50% hemolysis.
J. Immunol., 65, (1), 17.
- TARANTA, A., FRANKLIN, E.C. (1961) : Complement fixation by antibody.
Science, 134, 1981.
- UTSUMI, S. (1969) : Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments.
Biochem. J., 112, 343.