

ESTUDO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DO SÍTIO
DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NA MOLÉ-
CULA DE IgG DE COELHO

J.K. SAKURADA

JULIA KEIKO SAKURADA

ESTUDO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DO SÍTIO DE ATIVAÇÃO DO COMPLE-
MENTO NA MOLÉCULA DE IgG DE COELHO

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Prof.H.A.Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas - São Paulo

(1974)

AGRADECIMENTOS

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, a autora e o orientador externam os seus agradecimentos às seguintes pessoas:

Prof. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo vigoroso apoio dado ao desenvolvimento da pesquisa e do ensino pós-graduado na UNICAMP.

Prof. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelo incentivo constante ao desenvolvimento das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação que contribuíram para a implantação do espírito científico.

Aos Professores Wilmar Dias da Silva (Instituto Butantan) e Maria Siqueira (Instituto Biológico) pela discussão crítica dos resultados.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo espírito de colaboração.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes Instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA

COORDENAÇÃO DO APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO

SUPERIOR

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Durante o desenvolvimento deste trabalho a autora foi Bolsista da FAPESP.

ABREVIATURAS

Ac - anticorpo

Ag - antígeno

Anti-SNC - sêro de cavalo anti-sêro normal de coelho

Anti-SNCr - sêro de coelho anti-sêro normal de carneiro

Anti-IgGco - sêro de carneiro anti-IgG de coelho

BBD - benzidina-bis-diazotada

C - Complemento

Hem.Ag - hemácias sensibilizadas com o antígeno

Hem.SAB - hemácias sensibilizadas com a sêro albumina bovina

Hem.SAB .Anti-SAB - hemácias sensibilizadas com o complexo

SAB.anti-SAB.

Prot. - proteína

SAB - sêro albumina bovina

SNC - sêro normal de coelho

SNCr - sêro normal de carneiro.

Sa - sêro de carneiro anti-IgG de coelho

Sb - sêro de carneiro anti-Fab de coelho

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	7
RESULTADOS	16
1 - ESTUDO QUANTITATIVO DO FENÔMENO DA INIBIÇÃO	16
2 - ESPECIFICIDADE DOS IMUNESOROS	18
3 - TEOR DE ANTICORPOS	20
4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS IMUNESOROS ANTI-IgG <u>SO</u> BRE A LISE DA HEM.SAB.ANTI-SAB	21
5 - FRACIONAMENTO DOS IMUNESOROS OBTIDOS EM COBAIAS E CARNEIROS	24
5.1 - FRACIONAMENTO DE GAMA 1 E GAMA 2	24
5.2 - ISOLAMENTO DAS IMUNEGLOBULINAS IgS e IgF DE CARNEIRO	24
6 - VERIFICAÇÃO DA PUREZA DAS FRAÇÕES FI E FII	26
7 - ATIVIDADE DAS FRAÇÕES FI E FII SOBRE A LISE DAS HEM. SAB. ANTI-SAB	28
8 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES FI E FII	29
8.1 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FI	29
8.2 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FII	29
8.3 - ATIVIDADE DAS FRAÇÕES PURIFICADAS SOBRE AS HEM. SAB.ANTI-SAB	32
9 - INIBIÇÃO DA LISE DE HEM.SAB.ANTI-SAB POR ANTICORPOS ANTI-FAB E ANTI-Fc	41
10- DISCUSSÃO	44

11 - RESUMOS E CONCLUSÕES	50
12 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

INTRODUÇÃO

O mecanismo de ativação de C_1 pelo complexo Ag.Ac. ainda não está elucidado, desconhecendo-se ainda o papel das diferentes regiões da molécula do anticorpo, no fenômeno da ativação.

A partir dos trabalhos de PORTER (1959) e de NISONOFF (1960) que permitiram obter fragmentos biologicamente ativos, foi possível iniciar-se estudos com o sentido de verificar a função das regiões Fab e Fc, no fenômeno de fixação de complemento. (Vide revisões de COHEN, 1964 e de MÜLLER EBERHARD, 1968).

TARANTA e FRANKLIN (1961) mostraram que os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ de coelho embora capazes de reagir com o antígeno, não eram capazes de induzir a reação de fixação de complemento. Este fato estava relacionado, ou com a incapacidade do fragmento Fab de formar uma rede tridimensional ou a perda de sítio essencial da molécula de IgG, para a fixação de complemento.

Em apoio desses dados, os trabalhos de ISHIZAKA et al (1962) mostraram que os imunocomplexos solúveis de fragmento Fab e $F(ab')_2$ de coelho são incapazes de fixar complemento ou produzir a reação de PCA. Observaram ainda que os agregados de fragmento Fab, produzidos através do uso de benzidina-bis-diazotada, não possuíam aquelas pro-

priedades biológicas, enquanto que o fragmento Fc, as possuíam. Estas propriedades foram constatadas através da reação de inibição, onde estes fragmentos competem com a molécula nativa de imunoglobulina. Estes autores concluíram então que o fragmento Fc da molécula de IgG de coelho, apresenta a estrutura essencial àquelas atividades biológicas.

O fragmento $F(ab')_2$ relativamente à molécula de IgG, fixa pouco C (AMIRAIAN e LEIKHIM, 1961). Embora este fragmento aglutine as hemácias de carneiro, não há produção de lise, quando se adiciona o C ao sistema. Este fato levou os autores a concluir, que a região Fc é essencial para a fixação de complemento. Esta conclusão foi reforçada pelas observações de que tanto a molécula de IgG nativa, quanto o fragmento Fc, eram capazes de inibir a lise das hemácias sensibilizadas com o antígeno.

O uso da papaina ligada a um suporte insolúvel, o copolímero de amino-ácido p-amino fenilalanina e leucina, (CEBRA, 1961) permitiu mostrar que os fragmentos Fab e Fc são resultantes de 2 ações sucessivas: 1) hidrólise de determinadas ligações peptídicas; 2) redução subsequente de grupos dissulfetos. A molécula de IgG que foi submetida à ação da papaina insolúvel na ausência de cisteína é capaz de fixar o complemento (CEBRA, 1963). A ação subsequente da papaina resulta na formação de fragmentos Fab e Fc, que não fixam o C. Com a base nesses dados o autor admitiu que

as pontes dissulfeto tem papel fundamental na manutenção dos sítios envolvidos na fixação de complemento.

As constatações de WIDERMANN et al. (1963), de que a molécula de IgG₂ humana, tratada com 2-mercaptoetanol perdem a sua capacidade de fixar C, apoiam essa interpretação.

SCHUR e CHRISTIAN (1963) submeteram a IgG de coelho e carneiro sob a ação de 2-mercaptoetanol e constataram que a redução de uma ponte dissulfeto lábil acarreta uma sensível diminuição na capacidade de fixação do C, ao passo que não observaram nenhuma diminuição na eficiência da reação de precipitação frente ao antígeno, tornava-se necessário a redução de 10 grupos dissulfetos por molécula de IgG.

Alguns dados indicam que outras estruturas da molécula de IgG além da região Fc, são importantes no fenômeno de fixação de C .

REISS e PLESCIA (1963) submeteram o complexo Ag.Ac. e complemento (sêro humano) à ação da papaina e analisaram o digesto imunoquimicamente. Observaram que o fragmento Fab achava-se complexado ao componente do sêro humano (complemento). No entanto, nestas experiências não foi possível demonstrar a presença dos componentes do C, complexado ao fragmento Fc. Este fato foi explicado, admitindo-se que o fragmento Fc fosse importante para desencadear a ativação dos componentes do C.

Os imune-complexos preparados a partir de F(ab')₂ fixam apenas 20 a 40% de C de cobaia. O C restante dessas ex-

periências não mais podem ser absorvidos por imune-complexos preparados com a IgG nativa (SCHUR e BECKER, 1963).

A existência na IgG₂ de cobaia de dois sítios capazes de interagir com o complemento foi evidenciada por SANDBERG et al. (1971). Um desses sítios localizado na região Fc que fixa o complemento através da via clássica C₁ a C₉. Outro sítio presente no fragmento F(ab')₂ fixa o C através da via alternada C₃ a C₉.

OLIVEIRA E LAMM (1971) isolaram de mapas diagonais de IgG₂ de cobaia um peptídeo designado P2 que contém 3 cisteínas comprometidas com a ligação H-H. Em comunicação recente Oliveira (1973), sugere que este peptídeo esteja relacionado com a capacidade do fragmento F(ab')₂ de ativar C₃.

UTSUMI, (1969) nas experiências realizadas com IgG de coelho digerida com a papaína sob condições variáveis de pH e força iônica obteve quatro fragmentos de tamanhos diferentes. Estes fragmentos foram denominados lFc, mFc, sFc e stFc, de acordo com o tamanho e foram utilizados em experiências orientadas no sentido de localizar os sítios responsáveis pelas atividades biológicas (fixação de C e sensibilização da pele de cobaia). Todos os fragmentos apresentavam atividades antigênicas. Apenas o fragmento lFc (com a região da dobradiça) foi capaz de sensibilizar a pele de cobaia. Os fragmentos lFc e mFc (este último sem a região da dobradiça) fixaram o complemento. No entanto, comparando-se a eficiência de fixação de C da molécula de IgG nativa e dos fragmen

tos lFc e mFc, observa-se que a molécula de IgG nativa era mais eficiente. Duas hipóteses são possíveis a partir desses dados: ou existe diferença de afinidade de combinação nas reações C x fragmentos e C x IgG nativa ou existe pelo menos dois sítios de combinação com o C na molécula de IgG nativa.

Os trabalhos realizados até o momento, no sentido de localizar o sítio de interação com o C na molécula de IgG nativa, foram realizados com moléculas de anticorpos digeridas. Os achados de RANGEL (1968), sugerem a possibilidade de se realizar investigações sem a necessidade de submeter a molécula de IgG nativa a tratamentos químicos ou enzimáticos.

Esse autor em (1968) estudando a ação dos soros anti-sôro globulinas (anti-SG), sobre as hemácias sensibilizadas com o complexo SAB.antiSAB, verificou que a lise neste sistema era estritamente dependente da natureza dos soros anti-SG, e não das imunoglobulinas do complexo SAB.anti-SAB, utilizado na sensibilização das hemácias. Quando soros anti-SG, capazes de fixar C eram utilizados nas experiências, observa-se a ocorrência da lise, mesmo quando o complexo SAB.anti-SAB fixado à hemácia era incapaz de fixar C e provocar a lise. Por outro lado observava-se a inibição da lise quando hemácias sensibilizadas com um complexo SAB.antiSAB que lisaria na presença de C, era submetido à ação de um sôro anti-SG incapaz de fixar C.

O nosso trabalho tem por escopo verificar a possibilidade de utilizar o fenômeno de inibição da lise por sôro an

ti-SG na investigação das regiões da molécula de IgG envolvidas no fenômeno de fixação do C.

Para tal fim procuramos verificar o comportamento dos soros anti-IgG de coelho produzidos na cobaia ou no carneiro sobre as hemácias SAB.antiSAB.

As imunoglobulinas presentes nesses soros, capazes de inibir a lise específica das Hem.SAB.anti-SAB, foram isoladas e caracterizadas, procurando-se verificar a especificidade para determinantes antigênicos das regiões Fab e Fc. Os dados apresentados no presente trabalho sugerem a existência de pelo menos dois sítios responsáveis pela fixação de C sobre a molécula de IgG de coelho.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTÍGENOS: A sêro albumina bovina (SAB) cristali na foi obtida conforme as instruções de KABAT e MAYER (1961) .

IMUNESOROS: Os imunesoros anti-Fab e anti-Fc, fo ram obtidos em cobaias segundo as indicações de BINAGHI (1966) e RANGEL (1968).

Os imunesoros de carneiro anti-IgG e anti-Fab de coelho , foram obtidos segundo as indicações de BINAGHI (1972, comunicação pessoal). Esses imunesoros foram prepa rados, inoculando-se por via subcutânea, 1 ml da mistura de volumes iguais de antígeno (IgG ou Fab) contendo 15 mg/ml em adjuvante completo de Freund. Decorridas 5 semanas após a primeira dose, os animais eram inoculados por via intramuscular, com 1 ml da mistura em partes iguais de an tígeno (10 mg/ml) e adjuvante completo de Freund. Após 12 dias os animais eram sangrados.

O imunesôro de cavalo anti-soro normal de coelho (anti-SNC) foi cedido pelo Professor Pierre Grabar, do Instituto Pasteur de Paris.

Um dos imunesoros de coelho anti-sôro normal de carneiro(anti-SNCr) foi cedido pelo Professor Benedito de Oliveira Filho, Fac. C.M. Biol. de Botucatu.

O outro imunesôro de coelho anti-sôro normal de carneiro (SNCr) foi obtido, inoculando-se nos linfonodos

0,5 ml da mistura em partes iguais de antígeno (10 mg/ml) e adjuvante completo de Freund, e quatro semanas após a primeira dose, os animais eram inoculados, por via intramuscular, com 1 ml da mistura de antígeno (10 mg/ml) e adjuvante completo de Freund. Os animais eram sangrados duas semanas após a última dose.

Todos os imunesoros utilizados nas experiências, foram inativados a 56°C por 30 minutos.

REAGENTES: Todos os reagentes utilizados, adquiridos no comércio, salvo alguns reagentes especiais, traziam a especificação de reagentes analíticos. A papaina (2 x cristalizada) foi obtida de Nutricional Biochemical Corporation. DEAE celulose e CM celulose foram obtidas de Bio Rad Laboratories, Richmond, California. DE-52 Whatman celulose foi obtida de W.R. Balstar, Inglaterra.

CROMATOGRAFIA EM CELULOSE MODIFICADA: As cromatografias em dietil-amino-etil celulose (DEAE celulose) e carboxi-metil celulose (CM-celulose) foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas em SOBER et al. (1956), utilizando-se colunas de 2,5 cm de diâmetro x 60 a 70 cm, a 4°C. Os tampões utilizados nessas cromatografias foram preparados de acordo com as instruções fornecidas por GOMORI (1955).

DOSAGEM DE PROTEINA: As concentrações de proteínas, foram de terminadas através do reativo de Biureto, segundo DITTENBRAND (1948) ou por determinação espectrofotométrica a 280 m μ em Espectrofotômetro Zeiss PMQ II, em cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO: As reações de precipitação em meio líquido, segundo o método de HEIDELBERGER e KENDALL (1935).

PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELIFICADO: As técnicas de imunodifusão foram realizadas em gel de ágar, em meio isotônico pH 7,2 a 7,4, segundo OUCHTERLONY (1958). As técnicas de eletroforese e de imunoeletroforese foram realizadas conforme as instruções de GRABAR e BURTIN (1964), em placas de vidro de 12 cm x 8 cm ou 6 cm x 4 cm, contendo uma camada de 3 mm de ágar a 1% em tampão veronal pH 8,4, 0,05 M, com gradiente de potencial de 10 volt/cm, tempo de 1 hora e 30 minutos. A microtécnica de eletroforese foi realizada, segundo SCHEIDGGER (1955) em placas de vidro de 2,5 cm x 7,5 cm com um gradiente de potencial de 6 volt/cm, tempo de 45 min..

PREPARAÇÃO DE IgG DE COELHO: Os soros de coelhos normais foram precipitados, pela adição de solução saturada de sulfato de amônio a 50% de saturação, a 4°C. O precipitado obtido foi centrifugado a 1.700 g, durante 15 min. a 5°C. A

fração I solada era dialisada contra solução de NaCl 0,15 M, até a prova negativa para ions de amônio, realizada com o reativo de Nessler. A fração assim obtida foi cromatografada em coluna de DEAE celulose, equilibrada com o tampão fosfato pH 8,0; 0,005 M, a um ritmo de 60 ml/h. O teor de proteína, foi determinado espectrofotometricamente a 280 m u. As frações correspondentes ao pico principal foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

Essas preparações purificadas continham apenas um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a gamaglobulina quando examinadas por eletroforese em gel de ágar (10 mg/ml) e por imunoeletroforese (5 mg/ml), utilizando-se um soro de cavalo anti-soro normal de coelho.

DIGESTÃO ENZIMÁTICA DA IgG DE COELHO: A IgG de coelho purificada foi submetida à ação da papaina, segundo as indicações de PORTER (1959). O material digerido foi dialisado contra tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M, durante 48 h, com agitação, removendo-se o tampão duas vezes em 24 h. Após a diálise o material digerido era centrifugado. Os sobrenadantes e os sedimentos obtidos eram utilizados para o preparo dos fragmentos Fab e Fc, respectivamente.

PREPARO DO FRAGMENTO Fc: O sedimento obtido, quando observado ao microscópio, apresentava-se sob a forma de cristais. Esses cristais eram lavados em tampão fosfato

pH 7,0, 0,1 M e em seguida, dissolvidos em solução de ácido acético 0,04 M. O material dissolvido era dialisado contra tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M para a recristalização. O material recristalizado era lavado em água destilada a 5°C e liofilizado.

PREPARO DO FRAGMENTO Fab: O sobrenadante obtido era dialisado contra tampão acetato de sódio 0,01 M pH 5,5. Após a diálise o material era submetido a cromatografia em CM celulose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após a eluição dos 200 ml com tampão acetato de sódio 0,01M, pH 5,5 era utilizado um gradiente cone esfera, para acetato 0,9 M, pH 5,5. As frações eluídas com um ritmo de 60 ml/h foram colhidas em volume de 10 ml. O teor de proteína foi determinado espectrofotometricamente a 280 m μ . As frações correspondentes ao primeiro pico foram reunidas e dialisadas contra água destilada, a 4°C, durante duas horas e a seguir liofilizadas.

COMPLEMENTO: Os soros de 20 a 30 cobaias normais eram utilizados como fonte de complemento. Estes soros eram liofilizados e armazenados a -20°C. O título de complemento, determinado de acordo com as instruções fornecidas em MAYER, OSLER, BIER, HEIDELBERGER (1946, 1948) era expresso em CH 50 unid./ml. O reagente R₁ foi preparado segundo as indicações de KABAT e MAYER (1961).

TAMPÕES: Três tipos de tampões foram utilizados nas experiências de lise específica. O tampão nº 1, designado como salina tamponada era constituído pela mistura de partes iguais de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,2 e solução de NaCl 0,15 M. O tampão nº 2, contendo cálcio e magnésio era constituído pela mistura de NaCl, 5,5 dietil barbiturato de sódio e ácido 5,5 dietil barbitúrico, preparado de acordo com as indicações de MAYER et al. (1946, 1948). O tampão nº 3, a qual se adiciona 0,1% de gelatina segundo STEIN e VAN NGU (1950).

BENZIDINA BIS-DIAZOTADA (BBD): A BBD foi preparada de acordo com as instruções fornecidas em KABAT e MAYER (1961) com pequenas modificações. 0,460 g de benzidina era dissolvida em 50 ml de água destilada, contendo 4,0 ml de ácido clorídrico 6 N. Esta solução era deixada em repouso por 30 min. à temperatura ambiente. Após este período de incubação o volume era completado para 100 ml e a diazotação realizada a 0°C, adicionando-se gota a gota, 1 ml da solução contendo 0,350 g de nitrito de sódio. A solução era agitada até a ausência de ions nitritos, verificada através do uso de papel impregnado com uma solução de iodeto de potássio e amido. A BBD era armazenada a -20°C.

SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS: O sangue estéril de carneiro, misturado com volumes iguais em solução de Alsever, pre

parado como indicado em KABAT e MAYER (1961) e preservado a 5°C, foi usado como fonte de hemácias. No momento do uso, essas misturas eram centrifugadas a 270 g e as hemácias lavadas três vezes com salina tamponada. As suspensões preparadas em salina tamponada, eram padronizadas de modo que, quando diluídas a 1/20 em água destilada desse um coeficiente de extinção E de 0,420 em espectrofotômetro Colemann Jr., em cubas de 10 x 120 mm a 550 m μ .

PREPARAÇÃO DE HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS COM O ANTÍGENO:

Quando necessário às experiências, as hemácias eram sensibilizadas com o antígeno (Hem.Ag), utilizando-se a BBD para conjugar o antígeno (SAB, Fc e Fab) às hemácias. As conjugações eram realizadas, misturando-se a 0°C, 5 ml de suspensão de hemácias padronizadas com 10 mg de antígeno diluído em 0,5 ml de solução de NaCl e adicionando-se 5 ml de BBD diluída a 1/30 em solução de salina tamponada. A mistura era incubada a 0°C por 30 min. As hemácias sensibilizadas eram lavadas três vezes com tampão nº 2 e ressuspendidas em tampão veronal, de modo que a diluição 1/5 em água destilada fornecesse uma E de 0,420 a 550 m μ .

PREPARAÇÃO DE HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS COM O COMPLEXO

SAB. anti-SAB: Hemácias sensibilizadas com o complexo SAB. anti-SAB (Hem.SAB.anti-SAB) eram preparadas em tubos calibrados, adicionando-se 2,5 ml da suspensão padronizada de hemácias

sensibilizadas com SAB e 5 ml de uma diluição de soro anti SAB, previamente titulada de modo a fornecer 50% de lise, quando na presença de excesso de complemento. Essas misturas após lavadas duas vezes em tampão veronal, eram ressuspendidas em 5 ml do mesmo tampão.

HEMÓLISE PASSIVA: O método de hemólise passiva foi executado de acordo com RANGEL e REPKA (1965) e o método indireto, segundo as indicações de RANGEL (1968).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS SOROS

ANTI-IGG SOBRE A LISE DAS HEM.SAB.ANTI-SAB: Aliquotas de 1 ml das diluições seriadas em tampão veronal de imunesoro anti-IGG, anti-Fab, ou anti-Fc, eram misturadas com 1ml das suspensões de Hem.SAB.anti-SAB. O controle dessas experiências, eram constituídos pela mistura de 1 ml de tampão, com 1 ml de Hem.SAB.anti-SAB. O branco da reação era constituído por 1 ml de Hem.SAB.anti-SAB, misturado a 1,5 ml de tampão. Todas as misturas eram incubadas a 37°C por 30 min. Após este período de incubação as misturas eram incubadas em banho de gelo e porções de 0,5 ml de C contendo 7,5 CH 50/ml eram adicionadas a todos os tubos de reação executando-se o do branco. As misturas eram incubadas a 37°C por 45 min. e o grau de lise determinado espectrofotometricamente a 550 m μ .

Os resultados acham-se expressos em porcentagem de inibiçã^o ou aumento de lise (P), calculada através da fórmula:

$$P = 100 (E - E_c) / E_c$$

onde: E_c = densidade ótica do tubo contrôle

E = densidade ótica do tubo de experiência ,
contendo determinada concentração de soros anti-IgG.

RESULTADOS

1 - ESTUDO QUANTITATIVO DO FENÔMENO DE INIBIÇÃO.

Com o sentido de verificar se há paralelismo entre a quantidade de complemento fixado na superfície da hemácia e o grau de lise, foram realizadas experiências utilizando Hem. sensibilizadas com SAB, submetidas a ação de diferentes quantidades de sôro anti-SAB, previamente titulado pela hemólise passiva direta, na presença de excesso de complemento. Os reagentes utilizados, nas proporções indicadas para a hemólise passiva direta, foram misturados a 0°C e incubados nesta temperatura, durante 18 horas. Após esse período, a mistura era centrifugada a 0°C, o complemento do sobrenadante dosado. O sedimento constituído, por Hem.SAB.anti-SAB.C, era lavado duas vezes com o tampão veronal, ressuspendido em 2,5 ml de tampão e incubados a 37°C por 45 min. e o grau de lise determinado espectrofotometricamente.

Os resultados obtidos acham-se representados na tabela 1, onde se pode verificar que houve um paralelismo entre a quantidade de anticorpo utilizado e a quantidade de C fixado pelas Hem.SAB. Contudo, pode-se observar também que as Hem.SAB.anti-SAB.C não lisaram quando incubadas posteriormente a 37°C.

Para explicar a ausência da lise do sedimento, levantou-se a hipótese de que nas condições que foram realizadas

as experiências, apenas alguns componentes do C eram fixados pelo sistema Hem.SAB.anti-SAB. Para confirmar esta hipótese, os sedimentos obtidos nas experiências acima foram lavados duas vezes com tampão veronal e colocados frente ao reagente R₁ e incubados a 37°C durante 45 min. Nessas condições observou-se uma lise apreciável dessas hemácias, após incubação a 37°C por 45 min., indicando a existência de C₁ fixado ao complexo SAB.anti-SAB.

TABELA 1

RELAÇÃO ENTRE COMPLEMENTO FIXADO E A QUANTIDADE DE ANTI-SAB.

QUANTIDADE DE ANTICORPO (UH 50 %)	CH 50 DO SOBRENADANTE	CH 50 FIXADO	LISE DO SEDIMENTO (Hem.SAB. anti.SAB.C
4,0	1,48	1,36	0
2,0	2,15	0,69	0
1,0	2,49	0,35	0
0,5	2,67	0,17	0
CONTRÔLE	2,84	0,00	0

2 - ESPECIFICIDADE DOS IMUNESOROS.

A especificidade dos imunesoros obtidos foi testada através da análise imunoeletroforética e teste de OUCHTERLONY.

As experiências de imunoeletroforese utilizando um sôro de cavalo anti-sôro normal de coelho (anti-SNC) mostraram que o sôro normal de coelho contém vários sistemas precipitantes, ao passo que as preparações purificadas de IgG de coelho (entre 1 a 10 mg/ml) continham apenas um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a gamaglobulina (Fig. 1).

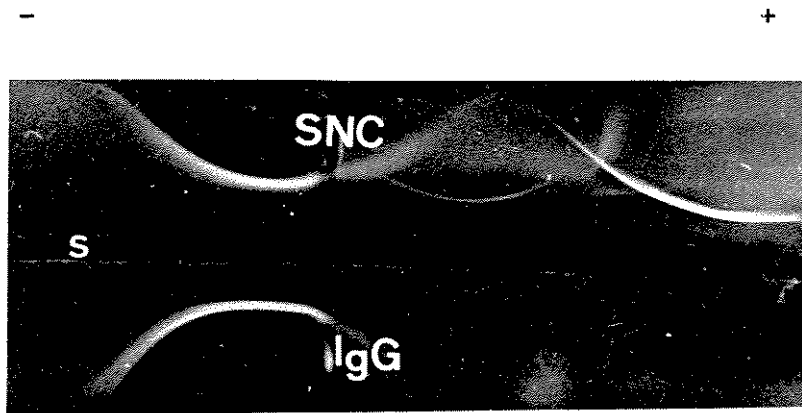


Fig. 1 - Imunoeletroforese de SNC e anti-IgG de coelho.
s= anti-SNC

Os soros de carneiro anti-IgG de coelho (anti-IgGco), nas experiências de imunoeletroforese, revelaram apenas um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a gamaglobulina quando testados contra IgG de coelho (Fig. 2).

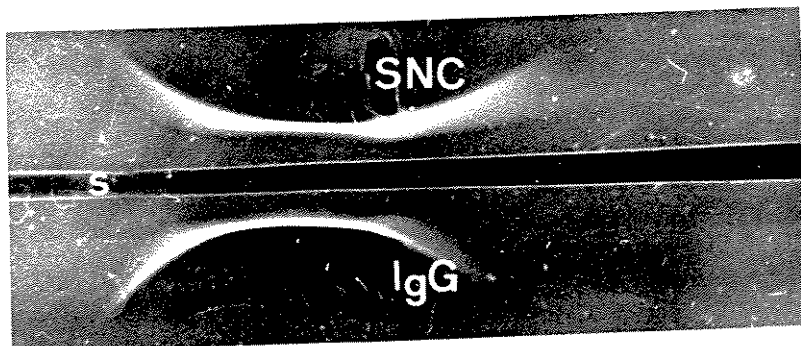


Fig. 2 - Imunoeletroforese de SNC e IgG de coelho.
s = anti-IgGco.

As experiências de imunodifusão (Fig. 3) mostraram que esses imunesoros precipitam frente aos fragmentos Fab e Fc, observando-se uma reação cruzada entre a IgG e esses fragmentos. Nenhuma relação antigenica foi observada entre os fragmentos Fab e Fc quando testados com estes soros.

Os imunesoros de carneiro anti-Fab de coelho, nas experiências de imunodifusão, reagiram apenas com a IgG ou com o fragmento Fab, apresentando uma relação de identidade, nenhuma precipitação foi observada quando o fragmento Fc foi testado.

Os imunesoros obtidos em cobaias, reagiram com o fragmento Fc e IgG de coelho. As reações com o fragmento Fab, foram extremamente fracas ou inexistentes.



Fig. 3 - Teste de Ouchterlony. IgG, fragmentos Fab e Fc.

sa = sôro anti-IgGco e sb= soro anti-Fab.

3. TEOR DE ANTICORPOS PRESENTES NOS IMUNESOROS DE CARNEIRO.

O sôro anti-IgGco, quando testado com IgG, continha 3,6 mg de Prot.Ac/ml. Testado com os fragmentos Fc e Fab, apresentou respectivamente 2,6 mg de Prot.de Ac/ml e 1,0 mg de Prot. de Ac/ml.

O imunesoro de carneiro anti-Fab, continha 2,8 mg de Prot. de Ac/ml quando testado com o fragmento Fab.

4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS IMUNESOROS ANTI-IgG
SOBRE A LISE DE HEM.SAB.ANTI-SAB.

A atividade dos imunesoros obtidos em cobaias e carneiros foi determinada conforme indicado em material e métodos.

As Fig. 4 e 5 apresentam os resultados de uma dessas experiências. Pode-se observar que tanto os imunesoros obtidos em cobaias como os obtidos em carneiro tem a capacidade de inibir a lise ou reforçar a lise das hemácias, dependendo da concentração utilizada. Observa-se também que a atividade inibitória dos soros obtidos em cobaias, manifesta-se quando em baixas concentrações.

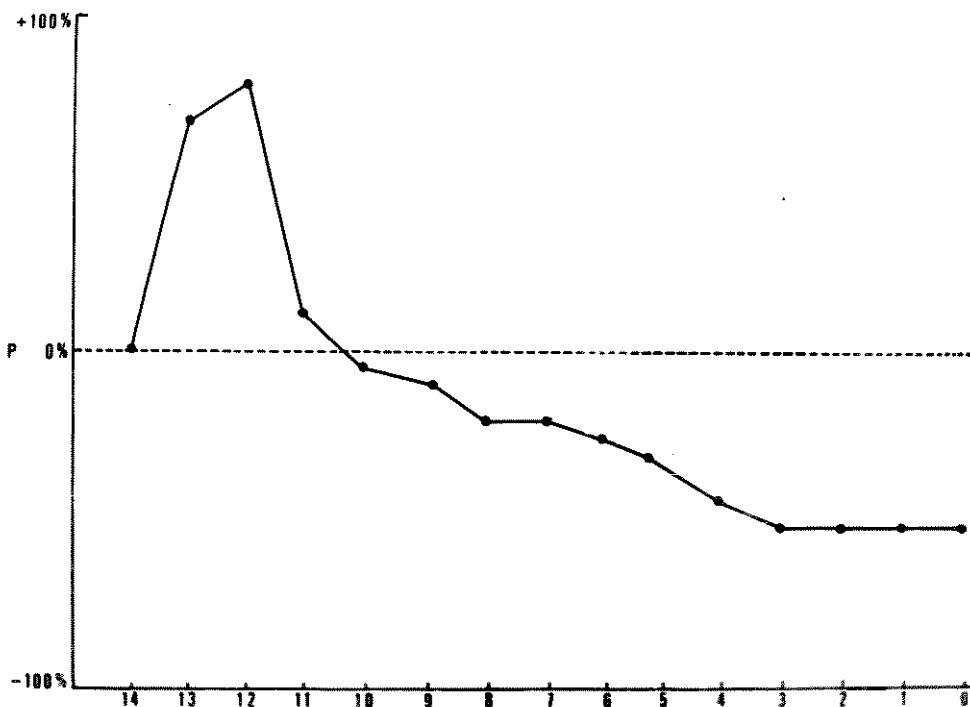


Fig. 4 - Atividade do sôro de cobaia anti-IgG de coelho sobre as hemácias SAB.anti-SAB. Na ordenada está representada a função: $P = 100 (E - E_c) / E_c$. Na abcissa acha se representado o valor de n da expressão \log_2^{-n} correspondente a diluição do sôro.

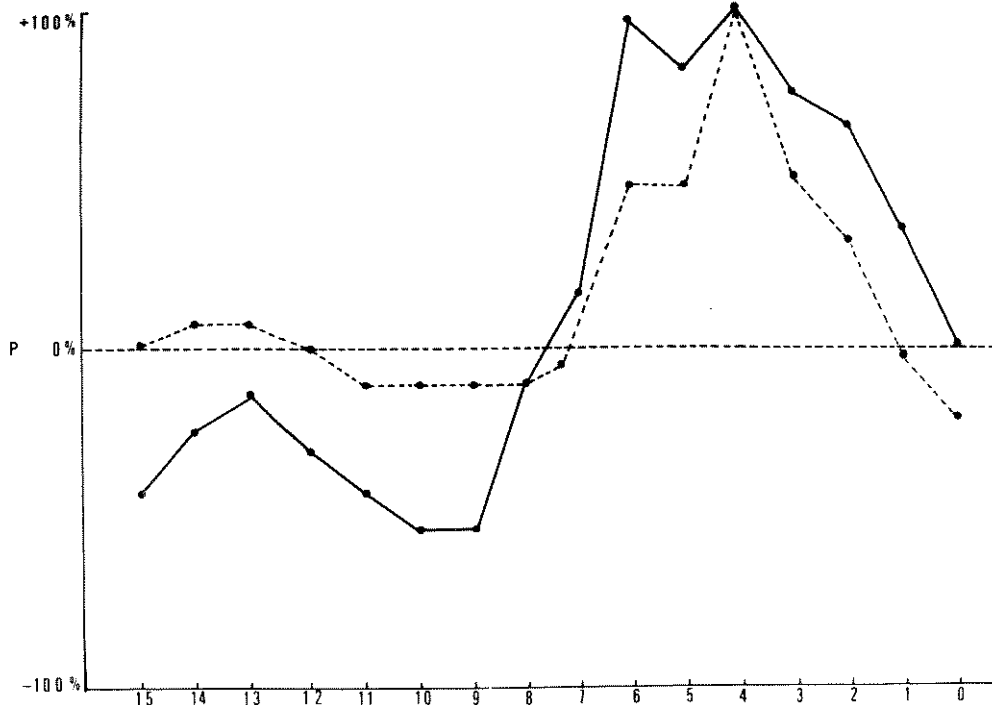


Fig. 5 - Atividade de imunesoros de carneiros anti-IgG ●—●—● e anti-Fab ●-●-●, sobre as hemácias SAB.anti-SAB. Na ordenada está representada a função: $P = 100 (E - E_c) / E_c$. Na abcissa acha-se representado o valor de n da expressão \log_2^{-n} correspondente a diluição do soro.

5 - FRACIONAMENTO DOS IMUNESOROS OBTIDOS EM COBAIAS E CARNEIROS.

Os imunesoros obtidos em cobaias ou em carneiros, que apresentaram atividade inibitória, foram inicialmente fracionados com solução saturada de sulfato de amônio, segundo as indicações de KABAT e MAYER (1961). A fração precipitada foi dialisada contra tampão fosfato pH 8,0, 0,005 M e em seguida cromatografada como abaixo indicado.

5.1 - FRACIONAMENTO DE GAMA 1 E GAMA 2 DE COBAIA.

As imunoglobulinas de cobia foram cromatografadas em coluna de DE-52 Whatman celulose, segundo as indicações de Oliveira et al (1970). As frações obtidas foram testadas quanto a sua atividade hemolítica. Os resultados obtidos nesse fracionamento indicam um baixo teor de anticorpo, tipo gama 1, específico para a IgG de coelho.

5.2 - ISOLAMENTO DAS IMUNEGLOBULINAS IgS E IgF DE CARNEIRO.

As frações precipitadas com a solução de sulfato de amônio a 50% de saturação, dialisada contra tampão fosfato pH 8,0, 0,005 M, contendo 1,8 g de proteína, foram cromatografadas em coluna de DEAE celulose (2,0 x 70 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição do material

foi realizada com o tampão fosfato pH 8,0, 0,005 M, até o aparecimento do primeiro pico e em seguida com solução de NaCl 0,5 M. Os eluatos foram colhidos em frações de 10 ml, com um fluxo de 60 ml/h. As frações eluídas com tampão fosfato correspondendo aos tubos 11 à 20, foram reunidas, constituindo a fração FI e as frações eluídas com a solução de NaCl, correspondendo aos tubos 61 à 70, reunidas, constituíam a fração FII, conforme mostra os resultados apresentados na Fig. 6.

As frações FI e FII, foram dialisadas contra água destilada por duas horas, liofilizadas e armazenadas até o momento de uso.

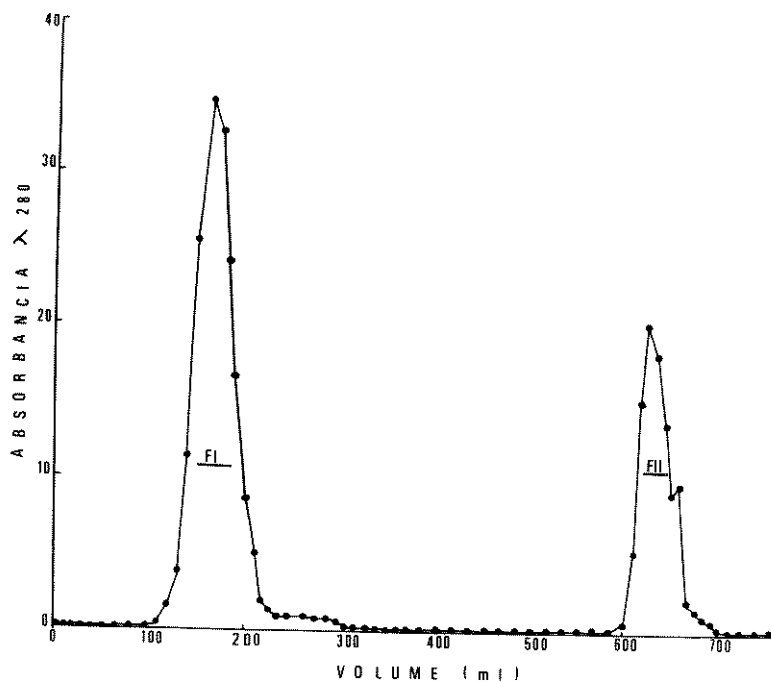


Fig. 6 - Cromatografia em DEAE celulose, da fração globulina de sôro de carneiro anti-IgGco.

6 - VERIFICAÇÃO DA PUREZA DAS FRAÇÕES FI E FII.

As frações obtidas por cromatografia em DEAE celulose, foram submetidas a análise eletroforética e imunoeletroforética, segundo as indicações de GRABAR e BURTIN

(1964) e SCHEIDGGER (1955). As reações de imunoeletroforese foram realizadas utilizando-se o sôro de coelho anti-sôro normal de carneiro (anti-SNCr).

A Fig. 7 apresenta um dos resultados obtidos. Po-de-se observar que nas experiências de eletroforese as frações cromatografadas apresentaram traços de contaminantes. Em concordância com estes resultados, observaram-se várias linhas de precipitação nas experiências de imunoeletroforese quando FI e FII foram testados frente a um sôro de coelho anti-sôro normal de carneiro (anti-SNCr).

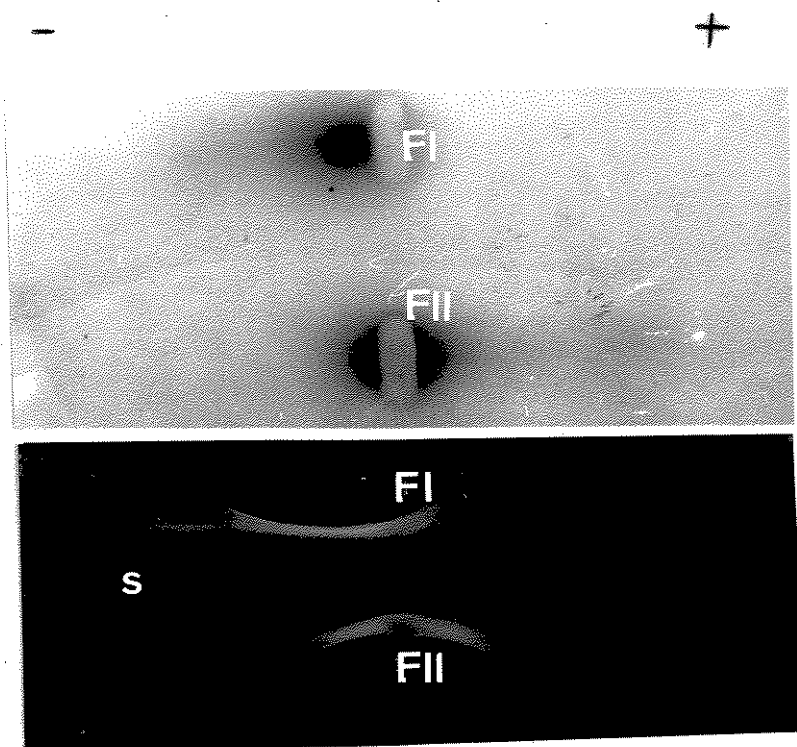


Fig. 7 - Eletroforese e imunoeletroforese das frações FI e FII. s = anti-SNCr.

7 - ATIVIDADE DAS FRAÇÕES FI E FII SOBRE A LISE
DAS HEM.SAB.ANTI-SAB.

Análise da atividade das frações FI e FII mostrou que ambas as frações são capazes de reforçar ou inibir a lise, dependendo da concentração utilizada no sistema. (Fig. 8).

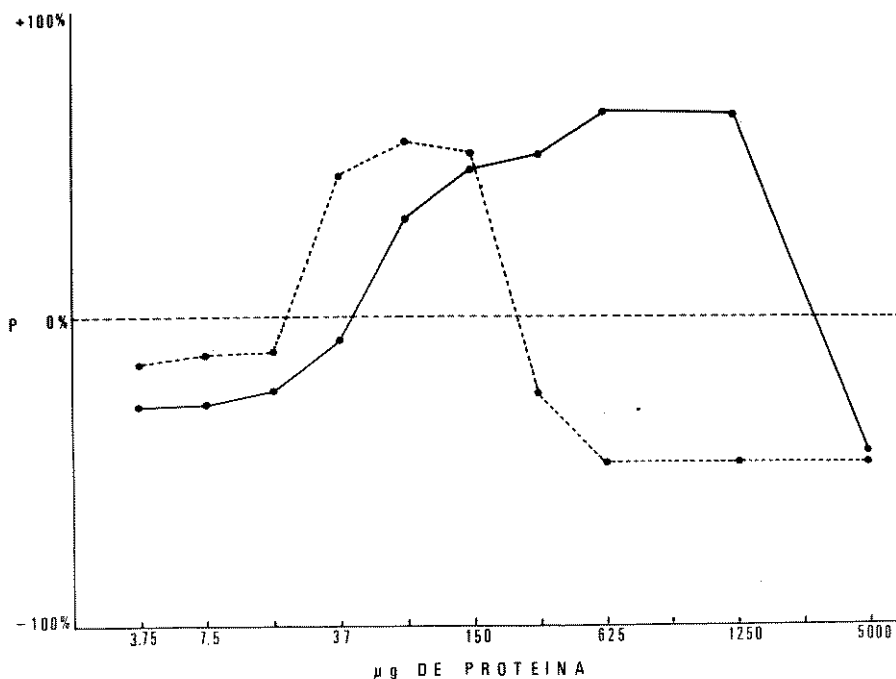


Fig. 8 - Atividade das frações FI ●—●—● e FII ●---●---●. Na ordenada está representada a função: $P = 100 \cdot (E - E_c) / E_c$, e na abscissa a concentração proteica das frações FI e FII.

8 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES FI E FII.

As frações FI e FII foram purificadas como indicado a seguir.

8.1 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FI.

Porções de 700 mg de proteína da fração FI foram dissolvidas em 10 ml de solução de NaCl 0,15 M. Esta solução foi dialisada contra tampão tris pH 8,4, 0,01 M e cromatografada em coluna de DEAE celulose (2,0 x 70 cm), equilibrada com o mesmo tampão.

A eluição do material foi realizada com 200 ml de tampão tris pH 8,4, 0,01 M, seguido por 200 ml de tampão tris pH 8,0, 0,1 M e com gradiente linear de KH_2PO_4 0,1 M e NaCl 0,5 M, com um fluxo de 60 ml por hora, colhendo-se frações de 2 ml.

Um dos resultados obtidos, nessas experiências, acha-se representado na Fig. 9. Pode-se observar que foram isoladas 9 frações designadas FI_1 a FI_9 . Essas frações foram dialisadas 2 horas, contra água destilada e liofilizadas.

8.2 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO FII.

Porções de 500 mg de fração FII, dissolvidas em 10 ml de solução de NaCl 0,15 M e dialisadas contra tampão

tris pH 8,4, 0,005 M foram cromatografadas em coluna de DEAE celulose(2,0 x 70 cm) equilibrada com tampão tris pH 8,4, 0,05 M. O material foi eluido com o mesmo tampão, seguido por uma solução de NaCl 0,5 M, com um ritmo de 60 ml/h, em frações de 2,0 ml.

Os eluatos dessa coluna foram separados em 6 frações, designados FII₁ a FII₆, conforme mostra a Fig. 10.

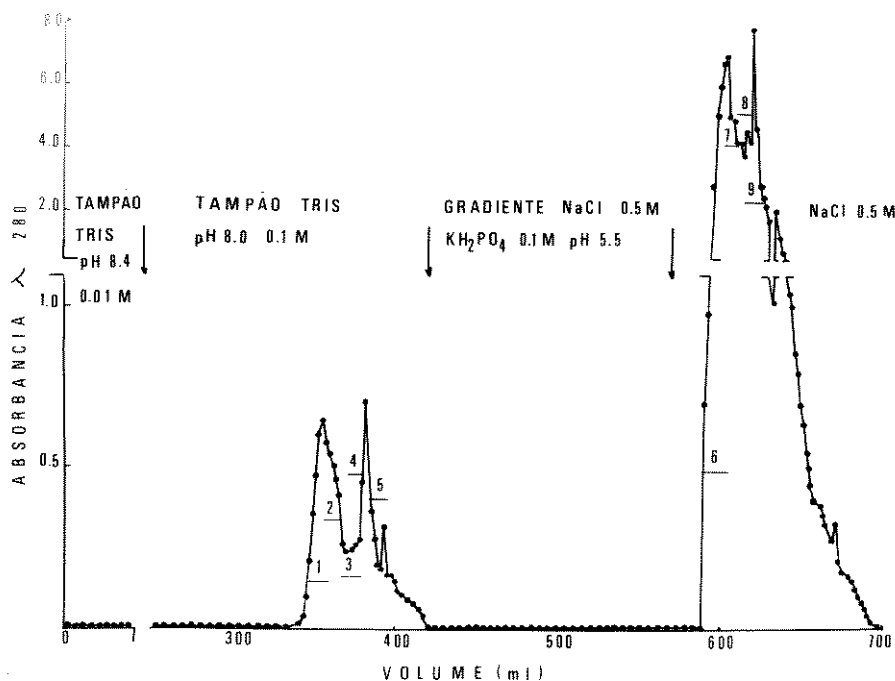


Fig. 9 - Cromatografia em DEAE celulose da fração

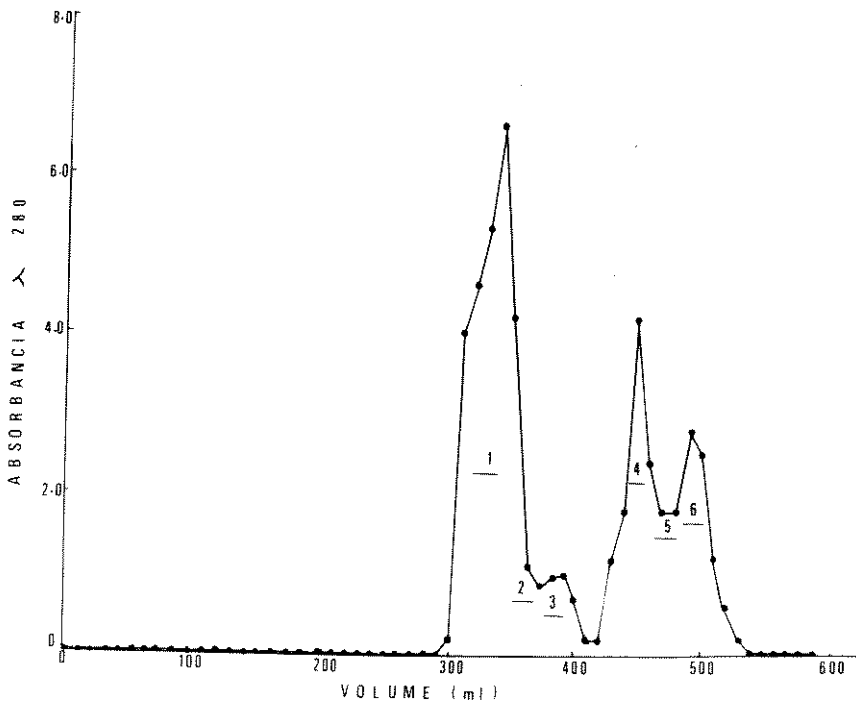


Fig.10 - Cromatografia em DEAE celulose da fração

FII.

8.3. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES PURIFICADAS SOBRE AS HEM.
SAB.ANTI-SAB.

A determinação da atividade das frações purificadas sobre as Hem.SAB.Anti-SAB, mostrou que as frações Fl₁ a Fl₄ testadas conforme descrito em material e métodos para a determinação da atividade dos imunesoros, em diferentes concentrações, apresentaram acentuada capacidade de inibir a lise em quaisquer das concentrações testadas. Pode-se observar que o grau de inibição foi proporcional a concentração proteica das frações estudadas, atingindo-se uma inibição de 100 %, quando concentrações iguais ou superiores a 62,5 µg de proteína foram utilizadas. A fig. 11 apresenta um dos resultados obtidos.

As demais frações testadas apresentaram resultados semelhantes aos apresentados nas Figs. 12 e 13. Pode-se observar que com essas frações obtem-se a inibição ou reforço da lise das Hem.SAB.anti-SAB, dependendo da concentração proteica utilizada.

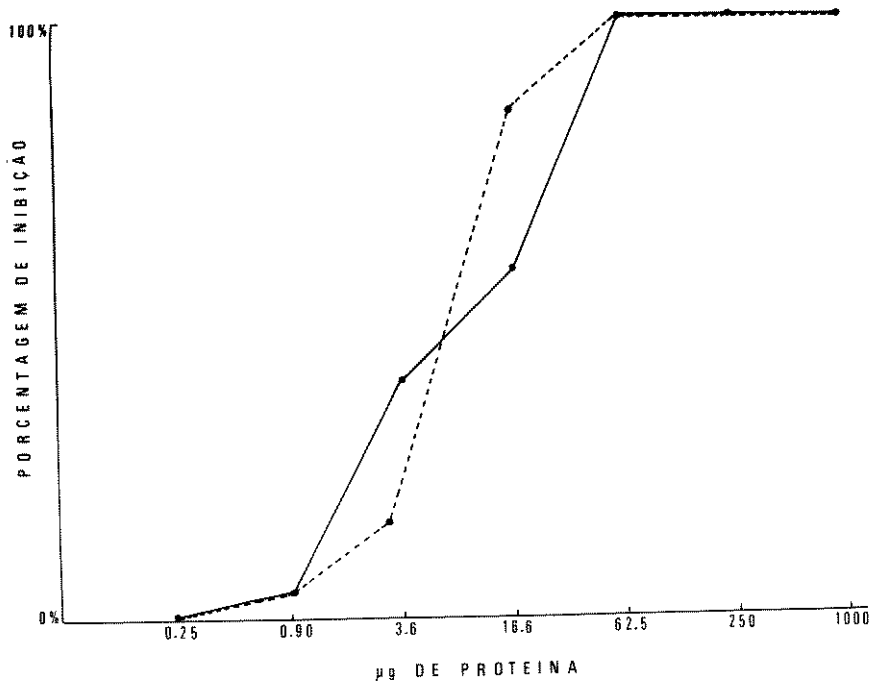


Fig. 11 - Atividade das frações FI₁ ●—●—●, FI₂ ●—●—● e FI₄ ●---●---●, obtidas por cromatografia em DEAE celulose, sobre as Hem.SAB.anti-SAB.

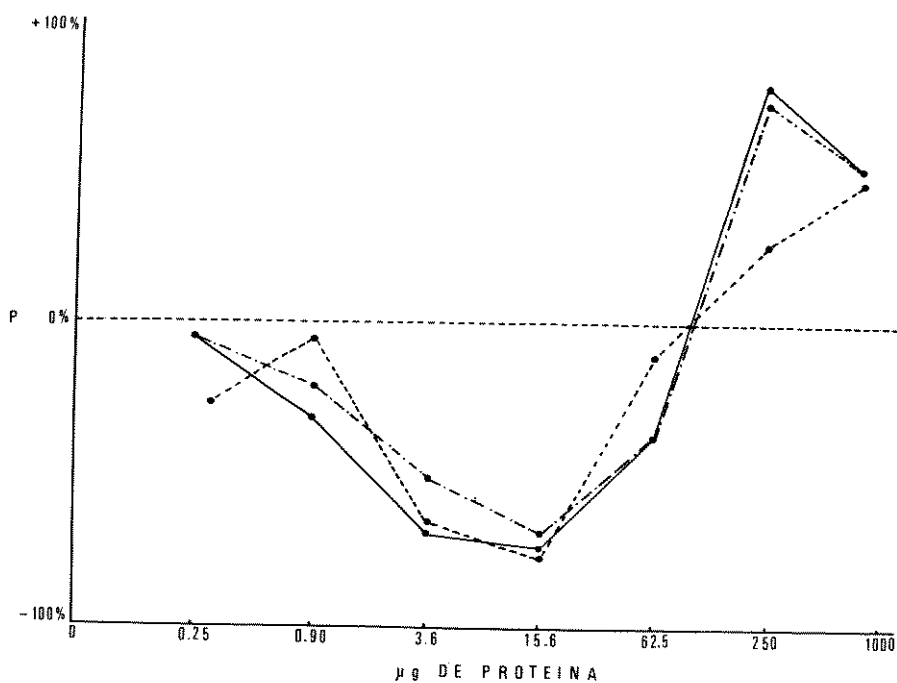


Fig. 12 - Atividade das frações FI₆ ●—●—●, FI₇ ●—●—● e FI₉ ○—○—○, obtidas por cromatografia em DEAE celulose, sobre as Hem.SAB.anti-SAB. Em ordenada está representada a função: $P = 100(E - E_c) / E_c$, e na abcissa, a concentração das frações.

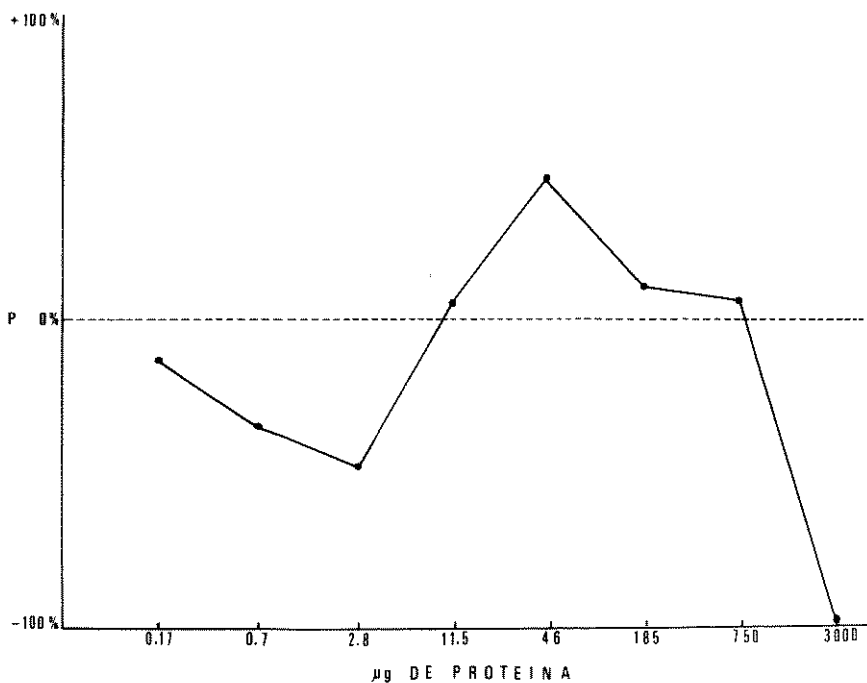


Fig. 13 - Atividade da fração FII_1 , obtida da cromatografia em DEAE celulose, sobre as Hem.SAB.anti-SAB. Em ordenada está representada a função: $P = 100 (E - E_c) / E_c$, e na abscissa a concentração da fração.

8.4 - CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS.

As frações obtidas através da cromatografia em DEAE celulose foram analisadas através de eletroforese e imunoeletroforese, utilizando-se soros anti-SNCR.

Os resultados dessas experiências mostraram que as frações FI₁ a FI₅ continham apenas um único componente (Fig. 14 e 15). As frações FI₆ a FI₉ apresentavam um componente principal (Fig. 16 e 17) com mobilidade correspondente a gama₁, e traços de outros componentes, dificilmente detectáveis pelas técnicas utilizadas.

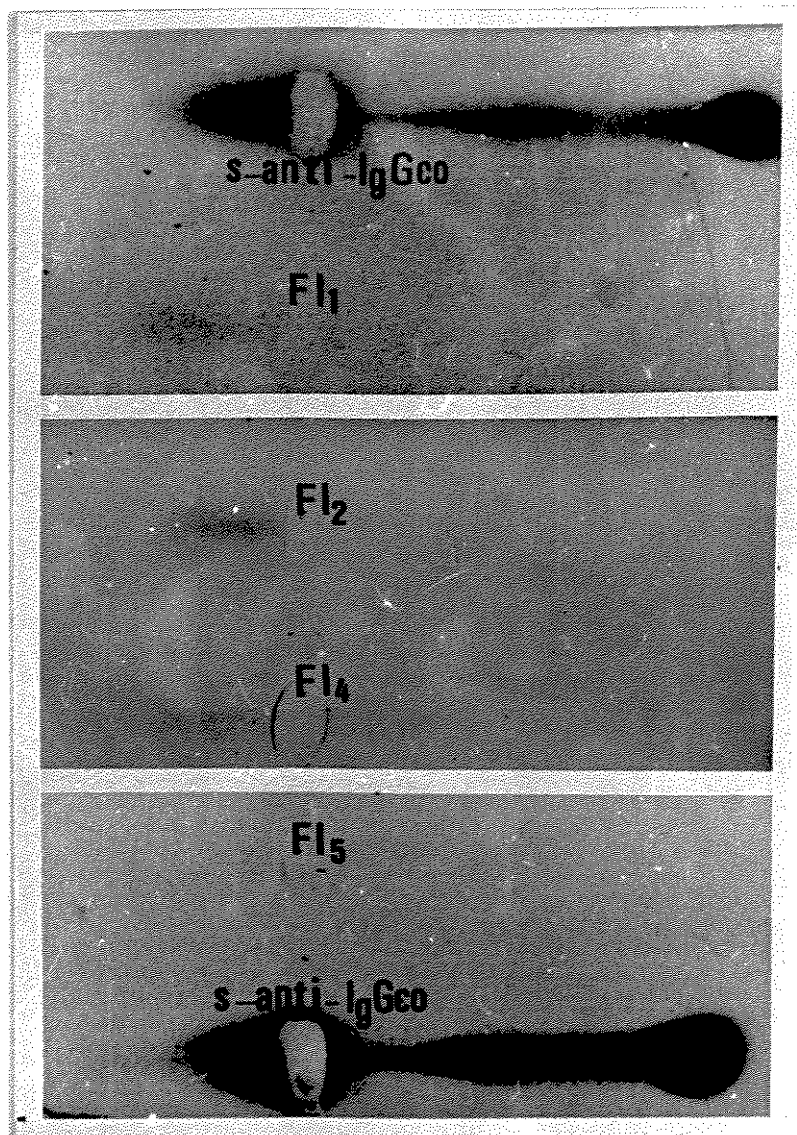


Fig. 14 - Eletroforese das frações FI₁ a FI₅, contendo 2,5 mg Prot./ml.

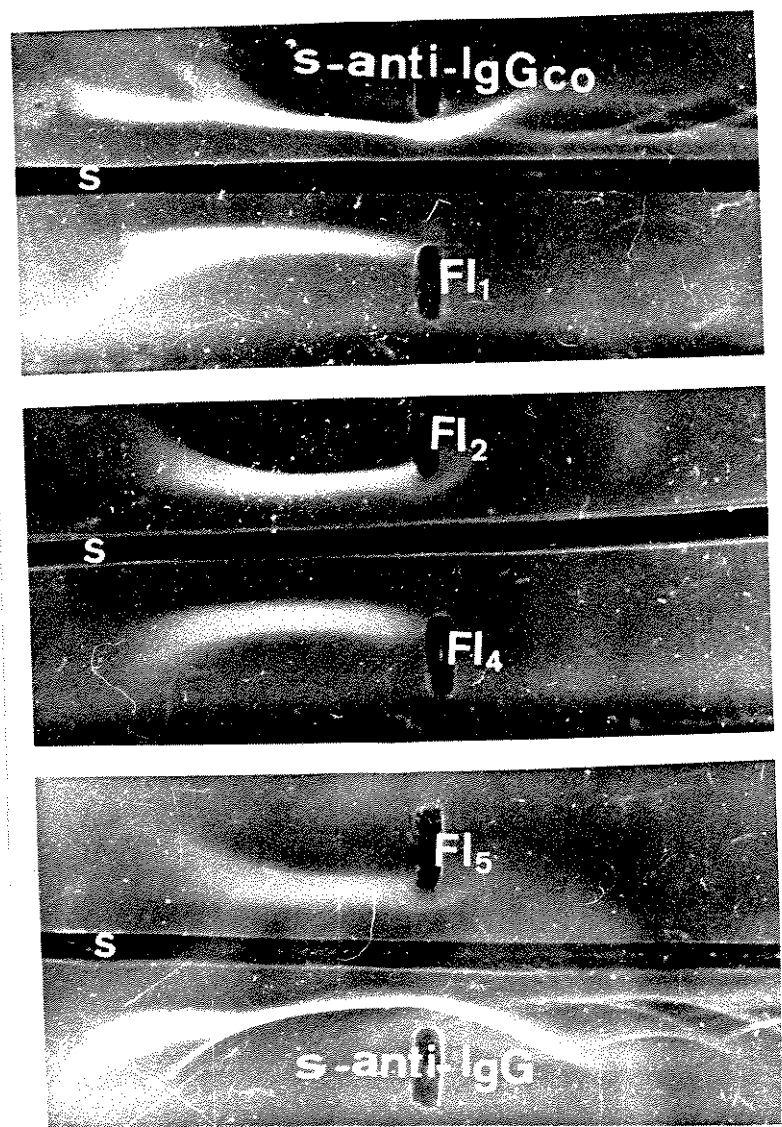


Fig. 15 - Imunoeletroforese das frações FI₁ a FI₅,
contendo 2,5 mg Prot./ml. s = sôro de coelho anti-SNCr.

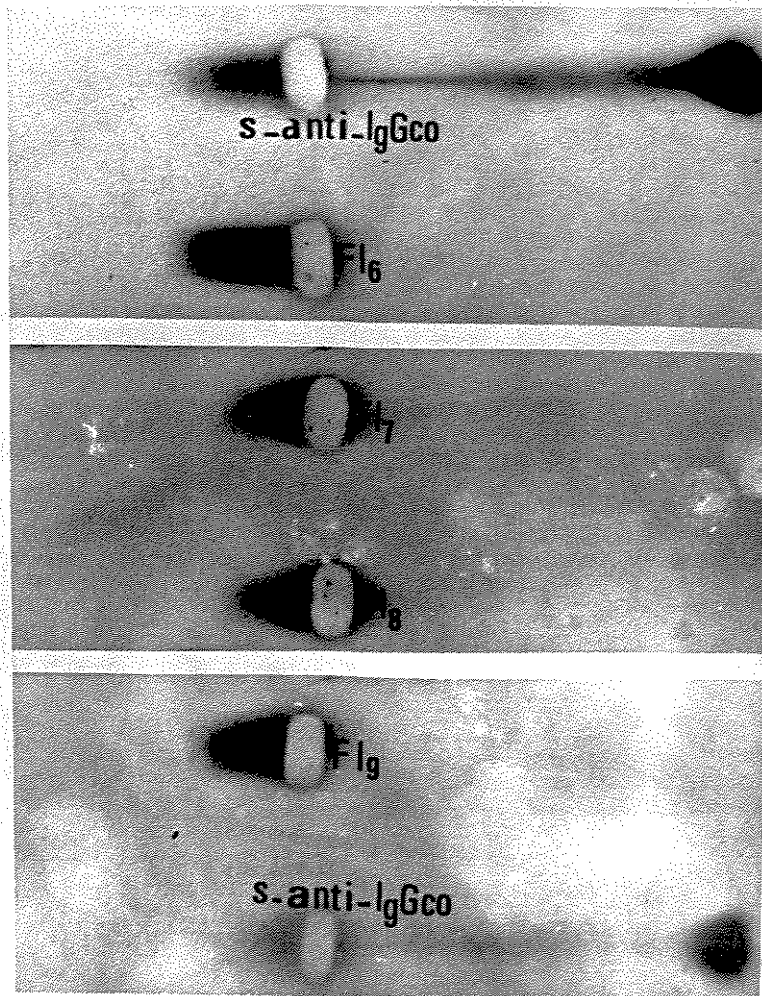


Fig. 16 - Eletroforese das frações FI₆ a FI₉, contendo 5 mg Prot./ml.

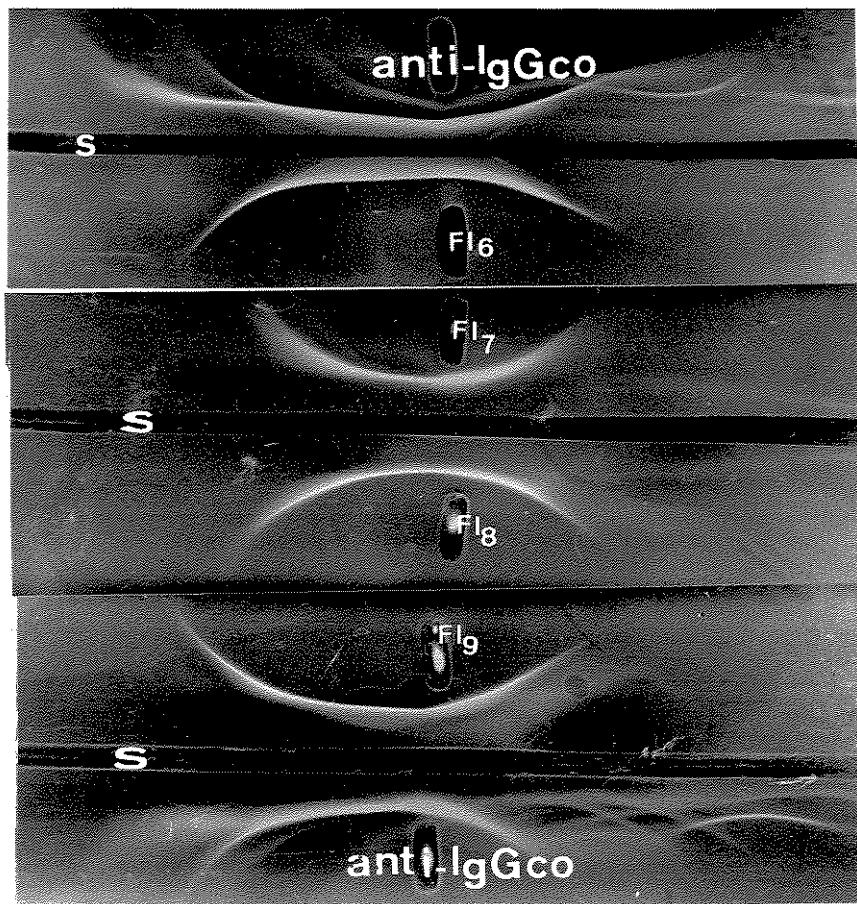


Fig. 17 - Imunoeletroforese das frações FI₆ a FI₉,
contendo 5 mg Prot./ml. s= sôro de coelho anti-SNCR.

9 - INIBIÇÃO DA LISE DE HEM.SAB.ANTI-SAB POR ANTI-CORPOS ANTI-Fab E ANTI-Fc.

Nas experiências realizadas (Ítem 8.3) pode-se observar que a fração FI_1 inibe a lise das Hem.SAB.anti-SAB sendo essa inibição proporcional a concentração de FI_1 adicionada ao sistema.

Com o fito de verificar se essa inibição era devido a combinação do anticorpo com os determinantes antigênicos localizados na região Fc ou Fab da molécula de IgG de coelho, foram realizadas as experiências indicadas a seguir.

A fração FI_1 foi absorvida com o fragmento conjugado às hemácias (Hem.Fc), preparadas conforme as indicações de material e métodos, a fim de obter anticorpos específicos para a região Fab da molécula de IgG de coelho. A fração absorvida, contendo 3 mg Prot./ml, não aglutinou Hem.Fc quando testadas em experiências de hemaglutinação passiva.

Porções da fração FI_1 foram absorvidas com o fragmento Fab conjugado às hemácias (Hem.Fab) de modo a obter anticorpos específicos para a região Fc da molécula de IgG de coelho. A fração FI_1 absorvida com o fragmento Fab, contendo 3 mg Prot./ml, não aglutinou na presença de Hem.Fab quando testada em experiências de hemaglutinação passiva.

A atividade da fração FI_1 não absorvida e absorvida com os fragmentos Fc, Fab, sobre as Hem.SAB.anti-SAB foi testada conforme indicado em material e métodos.

Os resultados obtidos acham-se representados na Fig. 18. Pode-se observar que a fração FI_1 não absorvida, contendo anticorpos específicos para a região Fc e Fab, foi capaz de inibir totalmente a lise do sistema, quando concentrações iguais ou superiores a 62,5 μ g de proteína foram utilizadas, ao passo que não foi possível observar inibição total da lise, quando foi utilizada a fração FI_1 , contendo anticorpos para a região Fc (anti-Fc) ou para Fab (anti-Fab).

As experiências realizadas com as misturas em proporções convenientes de anti-Fc e anti-Fab deram resultados idênticos aos observados com a fração FI_1 não absorvida.

A presença de excesso de C no final da reação entre FI_1 e as Hem.SAB.anti-SAB foi verificada centrifugando-se os tubos de reação e dosando-se o C dos sobrenadantes. A presença de excesso de C foi observada em todos os tubos de reação, contendo de 0 a 1000 μ g de proteína da fração FI_1 .

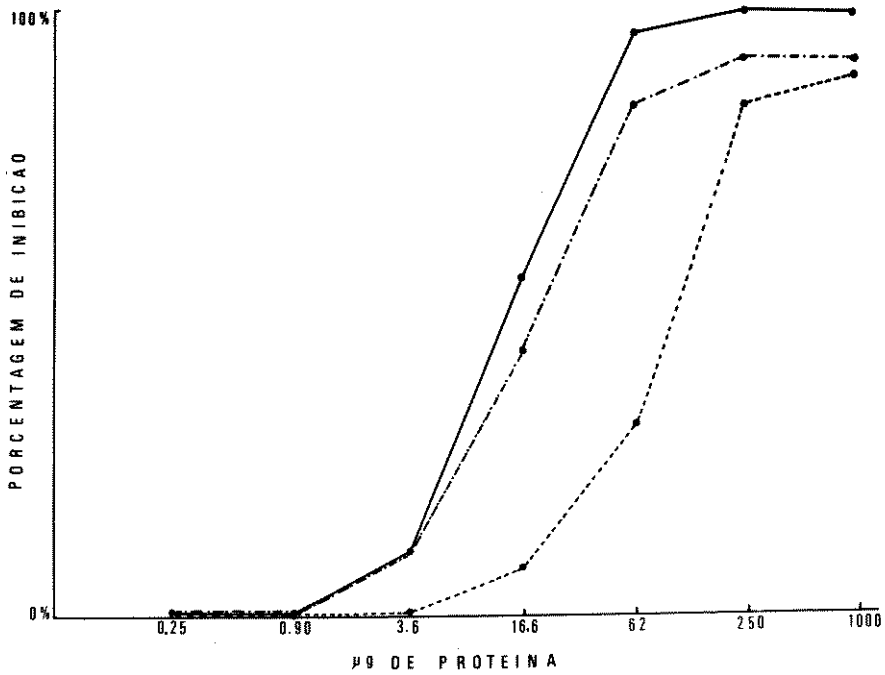


Fig. 18 - Atividade das frações FI₁ não absorvida
●—●—●, FI₁ absorvida com Fab (anti-Fc) ●---●---● e
FI₁ absorvida com Fc (anti-Fab) ●---●---● sobre as Hem.
SAB. anti-SAB.

DISCUSSÃO

As experiências orientadas no sentido de verificar se na hemólise passiva direta existe um paralelismo entre o grau de lise e a quantidade de C fixado pelo complexo Hem.SAB.anti-SAB, mostraram que existe uma correlação entre a quantidade de Ac adicionado ao sistema e quantidade de C fixado pela Hem.SAB.anti-SAB. Nas nossas experiências as Hem.SAB.anti-SAB não apresentam lise, quando incubados a 37 °C. Este fato pode ser interpretado, admitindo-se que apenas alguns componentes do C, foram fixados nas condições de experiência. De fato, utilizando-se o reagente R₁, foi possível demonstrar a presença de C₁ fixado ao complexo Hem.SAB.anti-SAB.

Uma vez que o fenômeno lítico é estritamente dependente da quantidade de C fixado às Hem.SAB.anti-SAB, pode-se prever que o fenômeno de inibição da lise de Hem.SAB.anti-SAB pelos soros anti-SG seja decorrente de um bloqueio da fixação de C. De fato, experiências controle, indicaram que o C não é absorvido pelas Hem.SAB.anti-SAB, quando determinados soros anti-SG são adicionados ao sistema.

A capacidade dos soros anti-SG de inibir a lise de Hem.SAB.anti-SAB é dependente da natureza das imunoglobulinas presentes nesses soros (RANGEL, 1968). Nos soros anti-SG, obtidos em cobaias, o fenômeno inibitório é dependente da

presença de imunoglobulinas da classe IgG₁.

As nossas tentativas de obter soros de cobaia anti-IgG de coelho, com alto teor de anticorpo IgG₁, foram infrutíferas, a despeito de termos utilizado os esquemas preconizados por diferentes autores (BINAGHI, 1966; RÁNGEL, 1968 ; OLIVEIRA, 1970). A causa do insucesso não foi esclarecida, estando possivelmente ligada a origem dos animais utilizados.

A imunização de carneiros com IgG purificada de coelho permitiu a obtenção de soros, que em determinadas concentrações eram capazes de inibir a lise de Hem.SAB.anti-SAB.O soro desses animais contém duas imunoglobulinas da classe IgG (ESTEVES et al.. 1973) designadas respectivamente IgS e IgF segundo a sua mobilidade eletroforética. Essas imunoglobulinas tem o mesmo peso molecular, similar ao da IgG humana. A IgS que foi caracterizada como indutora de PCA homólogo, não fixa o complemento pela via clássica. A atividade biológica de IgS não foi destruída pelo aquecimento a 56° C ou por ação de 2-mercaptoetanol. A sensibilização da pele induzida por IgS não persiste mais que duas horas. A IgF fixa o C e não é anafilética para o carneiro.

A análise dos soros de carneiro anti-IgG, mostrou que esses soros eram específicos para determinantes antigênicos presentes na molécula de IgG de coelho. Estes soros

davam apenas uma única linha de precipitação nas experiências de imunoeletroforese, quando o sêro normal de coelho ou a IgG purificada eram utilizados. Quando a IgG e os fragmentos Fab e Fc foram testados em experiências de imunodifusão, foram observadas reações cruzadas entre estes fragmentos e a molécula de IgG nativa, não se observando nenhuma relação antigênica entre o fragmento Fab e Fc.

As experiências de imunodifusão com o sêro anti-Fab obtido, mostraram que este sêro reage apenas com a molécula de IgG nativa ou fragmento Fab, não se observando nenhuma reação com o fragmento Fc.

A análise da atividade hemolítica dos imune-soros anti-Fab e anti-Fc mostrou que esses soros tem a capacidade, tanto de inibir quanto de reforçar a lise das Hem.SAB.anti-SAB, dependendo da concentração. Esses dados sugerem duas classes de imunoglobulinas.

Um primeiro fracionamento dessas imunoglobulinas com atividade inibitória, pela precipitação por sulfato de amônio, seguindo-se a cromatografia em DEAE celulose, resultou duas frações denominadas FI e FII.

O estudo imunoeletroforético em concordância com a atividade sobre as Hem.SAB.anti-SAB, mostraram que dois tipos de imunoglobulinas continuavam presentes nas frações obtidas. Contudo, uma dessas frações FI, comparativamente à

FII, apresentava maior quantidade de uma imunoglobulina de mobilidade menor que, quando testada no sistema Hem.SAB.anti-SAB, possuía capacidade de inibir a lise das hemácias.

As experiências de recromatografia, mostraram que várias subfrações podem ser obtidas, algumas das quais, são constituídas por populações de moléculas homogêneas, conforme observado por eletroforese e imuno-eletroforese. nessas experiências, as frações purificadas, apresentaram uma mobilidade eletroforética comparável à descrita por ESTEVES et al (1973) para a IgS, e em concordância com os achados desses autores, essas imunoglobulinas foram incapazes de fixar o C.

As experiências de inibição da lise, realizadas com as subfrações, constituídas por populações de moléculas homogêneas (FI₁ a FI₄), mostraram que a inibição da lise de Hem.SAB.anti-SAB é proporcional a concentração dessas frações. As frações purificadas (FI₁ a FI₄ eram capazes de reagir tanto com a região Fc, quanto com a região Fab. A absorção dessas frações com os fragmentos Fab e Fc, permitiu preparar anticorpos específicos para Fc ou Fab. Quando a atividade destes anticorpos, sobre as Hem.SAB.anti-SAB, foi investigada, verificou-se uma inibição da lise das Hem.SAB.anti-SAB proporcional a concentração das frações. Contudo, nenhuma fração foi capaz de inibir totalmente a lise, mesmo quando

altas concentrações eram empregadas. Esses dados indicam que a combinação de anticorpos com a região Fc ou Fab não bloqueia totalmente a fixação de C e sugerem a presença de dois sítios capazes de fixar C.

Em concordância com essa hipótese, observou-se que a mistura em proporções adequadas de anticorpos anti-Fc e anti-Fab é capaz de inibir 100% da lise.

Essa interpretação encontra apoio em diferentes experiências que sugerem a existência de pelo menos dois sítios capazes de fixar o C, um situado na região Fc e outro, na região Fab.

A importância do fragmento Fc para a fixação de C, tem sido ressaltada em uma série de experiências (TARANTA e FRANKLIN, 1961; AMIRAIAN e LEIKHIM, 1961, ISHIZAKA et al, 1962; CEBRA, 1963; UTSUMI, 1969). Contudo, nas experiências de REISS e PLESCIA (1963), foi observado que a região da molécula de IgG de coelho é capaz de complexar aos componentes do C humano, enquanto que nenhum componente do C foi encontrado formando complexo com a região Fc. Em razão dos achados de diferentes autores sobre a importância da região Fc, REISS e PLESCIA (1963) emitiram a hipótese de que a região Fc fosse importante para iniciar o fenômeno de fixação de C.

A observação de que os complexos formados a partir de $F(ab')_2$ (SCHUR e BECHER, 1964) são capazes de fixar uma

parte do C de cobaia, e o trabalho de UTSUMI (1969) sugerem su
gerem igualmente que o fragmento Fab está implicado no fenô-
meno de fixação de C.

Nas recentes experiências de SANDBERG et al. (1971),
foi possível demonstrar que na IgG₂ de cobaia existem dois
sítios capazes de interagir com o complemento, um desses sítios
localizado na região Fc é capaz de fixar o C através
da via clássica C₁ a C₉. Outro, presente no fragmento
F(ab')₂, é capaz de ativar através da via alternada C₃ a C₉.

O fato de que as frações purificadas de soro de car-
neiro anti-IgG de coelho, específicas para a região Fc ou
Fab, são capazes de inibir a lise das Hem.SAB.anti-SAB cons-
titui um instrumento útil na investigação da interação do
complexo SAB.anti-SAB com C, sobretudo se, nas experiências
futuras, forem utilizados anticórpors com especificidade res-
trita a poucos determinantes.

RESUMO E CONCLUSÕES

1 - Os soros de carneiro anti-IgG de coelho, possuem a capacidade de inibir ou reforçar a lise de Hem.anti-SAB, dependendo da concentração utilizada na experiência.

2 - O fracionamento destes soros permitiu mostrar que a capacidade de inibir a lise das Hem.SAB.anti-SAB está ligada a imunoglobulinas, caracterizadas como IgS, enquanto que a capacidade de reforçar a lise das Hem.SAB.anti-SAB se deve a presença de imunoglobulinas caracterizadas como IgF.

3 - Os dados obtidos em experiências de inibição da lise, utilizando imunoglobulinas IgS, específicas para determinantes antigênicos presentes na região Fc ou Fab da molécula de IgG de coelho, sugerem a existência de pelo menos dois sítios capazes de ativar complemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMIRAIAM, K. and KEIKHIM, E.J. (1961) - Interaction of fragment III of rabbit gamma globulin and guinea pig complement. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108:454.
- 2 - BINAGHI, R. (1966) - Production of 7S immunoglobulin in immunized guinea-pig. J. Immunol., 97:157.
- 3 - CEBRA, J.J.; GIVOL, D.; SILMAN, H.I. and KATCHALSKI, E. (1961). A two stage-cleavage of rabbit gammaglobulin by water insoluble papain preparation followed by cysteine. J. Bio. Chem., 236:1720.
- 4 - CEBRA, J.J. (1963) - "In conceptual advances in Immunology and Oncology" (R.W. Cumley, D.M. Aldrige J. Hadroz and J. Mac Cay, eds.) p.220. Harper & Row New York.
- 5 - COHEN, S. and PORTER, R.R. (1964) - Structure and biological activity of Immunoglobulins. "In Advances in Immunology" (Dixon F.J. Jr. and Kunkel, H. G. eds.) 4:287. Academic Press New York and London.
- 6 - DITTENBRAND, M. (1948) - Application of the Weischsebaun biuret reaction to the determination of protein. American J. Chem. Path., 18:439.
- 7 - ESTEVES, M.B.; ESTEVES SANT'ANNA, O.A.B.; SANTOS ANNE, V.C. and BINAGHI, R. (1973) - Characterization of a 7S anaphylactic (non reaginic) antibody in

sheep. Joint Meeting of European Societies for Immunology. Strasbourg, September. 4-7, p.22.

- 8 - GOMORI, G. (1965) - Methods in Enzimology. 1:138
Academic Press New York.
- 9 - GRABAR, P. and BURTIN, P. (1964) - Immunoelktrophoretische analyse. Elsevier, Amsterdan.
- 10- HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F.E. (1935) - The precipi
tin reaction between type III pneumococcus polysa
caride and homologus antibody. II - Condictions
for quantitative precipitation of antibody in hor
se sera. J. Exp. Med. 61: 559.
- 11- ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. and SUGAHA, T. (1962) - Bio-
logical activities of soluble antigen-antibody com
plex.VII - Role of an antibody fragment in the in
duction of biological activities. J. Immunol. 88:
690.
- 12- KABAT, E.A. and MAYER, M.M. (1961) - Experimental Immu
nochemistry. 1st ed. Charles C.Thomas Publisher,
Springfield Illinois USA.
- 13- MAYER, M.; OSLER, A.; BIER, O. and HEIDELBERGER, M.(1946)
The activating effect of magnesium and other ca-
tions on the hemolytic funtion of complement. J.
Exp.Med. 48:538
- 14- MAYER, M.; OSLER, O.; BIER, O and HEIDELBERGER, M.(1948)
- Quantitative studies of complement fixation. I-
Method.J. Immunol., 59: 195.

- 15- NISONOFF, A.; WISSLER, F.C.; LIPMAN, L.N. and WOERNLY, D.L.(1960) - Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. Arch.Bioch.Biophys.,89: 230.
- 16- MÜLLER- EBERHARD, H.J. (1968) - Chemistry and reaction mechanisms of complement. In Advances in Immunology (Dixon, F.J.Jr. and Kunkel, H.G. eds.) 8: 1. Academic Press. New York and London.
- 17- OLIVEIRA, B. and LAMM, M.E. (1971) - Interchain disulfide bridges of guinea-pig γ_2 immunoglobulin. Bioch. 10:26.
- 18- OLIVEIRA, B.; OSLER, A.; SIRAGANIAN, R.P. and SANDBERG, A. (1970) - The biologic activities of guinea-pig antibodies. I - Separation of γ_1 and γ_2 immunoglobulins and their participation in allergic reaction of the immediate type. J.Immunol.,104: 320.
- 19- OLIVEIRA, B. (1973) - Sites of complement interaction on guinea-pig γ_2 immunoglobulin. Agents and Actions, 3:384.
- 20- OUCHTERLONY, O. (1958) - Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr.Allergy, 5:78.
- 21- PORTER, R. (1959) - The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papaine. J.

Biochem., 73:119.

- 22- RANGEL, H. and REPKA, D. (1965) - Use of passive hemolysis in the quantitative estimation of anti-protein antibodies. Immunol., 14:618.
- 23- RANGEL, H. (1968) - Studies on passive hemolysis mediated by anti-serum globulin antibodies. Immunol., 14:812.
- 24- REISS, A.M. and PLESCIA, O.J. (1963) - Fixation of complement to fragments of antibodies. Science, 141:812.
- 25- SCHEIDGGER, J.J. (1955) - Une micro method d'immune electroforese. Int.Arch.Allergy, 7:103.
- 26- SCHUR, P.H. and BECKER, E.L. (1963) - Pepsin digestion of rabbit and sheep antibodies. The effect on complement fixation. J. Exp. Med., 118:891.
- 27- SCHUR, P.H. and CHRISTIAN, G.D. (1964) - The role of disulfide bonds in the complement fixing and properties of 7S rabbit and sheep antibodies. J. Exp. Med., 120:531.
- 28- SOBER, H.A.; GUTTER, F.J.; WICKOF, M.M. and PETERSON, E. A. (1956) - Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange adsorbentes. J. Chem. Soc., 78:751.
- 29- STEIN, G.J. and VAN NGU, D. (1950) - A quantitative complementfixation test titration of litic sera the unit of 50% hemolysis. J. Immunol., 65:17.
- 30- SANDBERG, A.L.; OLIVEIRA, B. and OSLER, A. (1971) - Complement interaction sites in guinea-pig immuneglo-

bulins. J. Immunol., 106:282.

- 31- TARANTA, A. and FRANKLIN, E. (1961) - Complement fixation by antibody. Science, 134: 1982.
- 32- UTSUMI, S. (1969) - Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically activities Fc fragments. Biochem. J., 112:343.
- 33- WIDEMANN, G.; MIECHER, P.A. and FRANKLIN, E.C. (1963) - Effect of mercaptoetanol on complement binding ability of human 7S gamma globulin. Proc.Soc.Exp.Biol. Med., 113: 609.