

ALBETIZA LÔBO DE ARAÚJO

LIBERAÇÃO DE CI DO COMPLEXO
EAC1 POR ANTICORPOS ANTI-
IMUNOGLOBULINAS.

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Prof.Dr. HUBERTO DE ARAÚJO RANGEL

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas. - São Paulo

(1978)

UNICAMP
BIBLIOTECA

H O M E N A G E M

"Ao Paulo

Cecília Maria

e *Lia*

Pelos momentos que não estive
minha maior ternura".

"A *Antonio Pereira Lôbo*, meu pai, que se foi deixando em mim
fonte de vida, e muitos ensinamentos que me conduziram até
o momento, e me acompanharão no futuro".

"A *Cecília Soares Lôbo*, minha mãe, que sem ela eu não existi
ria".

"E aos meus

dezessete irmãs".

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

ABREVIATURAS

Cl, primeiro componente do sistema complemento parcialmente purificado.

E, eritrócitos de carneiro.

EA, hemácias sensibilizadas com a fração IgG de soro de coelho anti-estroma de carneiro.

EACl, sistema hemolítico EA com Cl fixado

Hem.SAB-Anti-SAB, Hemácias sensibilizadas com soro albumina bovina e anti-SAB.

IgS ac, IgS do soro de carneiro anti-IgG de coelho.

IgS n, IgS do soro normal de carneiro.

SAB, soro albumina bovina.

Prot, proteína

Rl, reagente de complemento isento de Cl, obtido pelo método de diluição.

TVI, tampão veronal isotônico 0.15 μ .

TVS, tampão veronal sacarose 0.065 μ .

U, unidades.

EA_{cb}, hemácias sensibilizadas com soro de cobaia anti-estroma de carneiro.

Í N D I C E

	Pags.
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	16
1 - Quantificação de Cl fixado ao complexo EACI.....	16
2 - Influência da IgS-Anticorpo na liberação de Cl do complexo EACI.....	18
3 - Influência da força iônica na liberação de Cl do complexo EACI pela ação da IgS-Anticorpo.....	21
DISCUSSÃO.....	23
RESUMO E CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

INTRODUÇÃO

O progresso científico na área da imunquímica de proteínas tem contribuído significativamente para o estudo da biologia molecular do sistema complemento. Dessa contribuição, resultou a informação de que tal sistema é integrado por onze proteínas, presentes no soro normal ou imune, e que agem em conjunto podendo participar em várias manifestações biológicas. Dentre essas manifestações ressalta a sua ação efetora do sistema imune, quando age em combinação com o complexo antígeno-anticorpo. Contudo, segundo predições iniciais de PILLIMER et al. (1954) e observações mais recentes de outros pesquisadores (GÖTZE, O. and MÜLLER-EBERHARD, H.J., 1970; KIERSZENBAUM, F. and WEINMAN, D. 1977), uma atividade independente do complemento poderia representar um mecanismo inicial de defesa contra a invasão de células estranhas, atuando na ausência de anticorpo, e portanto, antes da manifestação de expressões da resposta imune específica.

Embora os mecanismos ainda não estejam bem esclarecidos, operacionalmente, o sistema complemento pode ser ativado de duas maneiras: pela via clássica e pela via alternativa. Na via clássica, ativada por complexos antígeno-anticorpo contendo imunoglobulinas dos tipos IgG e IgM, as onze proteínas do sistema são distribuídas em três unidades: a unidade C1 de reconhecimento, composta de três componentes C1q, C1r e C1s (LEPOW, I.H.

et al., 1963; NAFF, G.B. et al., 1964); a unidade de ativação C2, C3 e C4 (MÜLLER-EBERHARD, H.J., 1975); e a unidade de ataque à membrana C5, C6, C7, C8 e C9 (MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1971 e 1972). A via alternativa descrita por PILLIMER, L. et al. (1954), é ativada por agregados de IgA, por polissacarídes e lipopolissacarídes. Nesta via que exclui a participação de C1, C2 e C4, participam no mínimo cinco proteínas do soro, uma das quais é o C3, que uma vez ativado atua sobre C5-9 de maneira análoga ao mecanismo de ativação da via clássica.

Um grande número de pesquisadores têm procurado uma explicação sobre o mecanismo de ativação do complemento. Acredita-se que a ativação do sistema complemento é uma função do fragmento Fc da IgG (AMIRAIAN, K. and LEIKHIM, E.J., 1961; TARANTA, A. and FRANKLIN, E.C., 1961; ISHIZAKA, K. et al 1962; CEBRA, J.J., 1963; UTSUMI, S., 1969; KEHOE, J.M. and FOUGEREAU, M., 1970; AUGENER, W. et al., 1971; ALLAN, R. and ISLIKER, H., 1974; COLOMB, M. and PORTER, R.R., 1975; OVARY, Z. et al., 1976; AREND, W.P. and WEBSTER, E., 1977). Outros autores têm demonstrado que o fragmento $F(ab')_2$ talvez seja importante nesta ativação (REISS, A.M. and PLESCIA, O.J., 1963; SCHUR, P. and BECKER, E.L., 1963; REID, K.B.M., 1971; VUAGNAT, P., 1977). O sítio de ligação do C1q na IgG está localizado no fragmento Fc dentro do domínio C_H2 da cadeia γ (KEHOE, J.M. and FOUGEREAU, M., 1970; ELLERSON, J.R. et al., 1972; YASMEEN, D. et al., 1976). Foi sugerido no entanto, que o domínio C_H3 também poderia es-

tar envolvido nesta ligação (ALLAN, R. and ISLIKER, H., 1974; OVARY, Z. et al., 1976). Na IgM o sítio de ligação está localizado no domínio C_{H4} da cadeia μ (MÜLLER-EBERHARD, H.J., 1975). Todos esses trabalhos citados, foram realizados, utilizando a molécula de anticorpo digerida. informações mais recentes, têm salientado a importância da integridade da molécula de anticorpo para a ativação do sistema complemento: a capacidade de fixar complemento do fragmento Facb da IgG de coelho obtido da digestão desta imunoglobulina com plasmina, bem como da IgG tratada com ácido, foi inferior àquela da IgG nativa (COLOMB, M. and PORTER, R.R., 1975); a redução das pontes de dissulfeto da IgG de carneiro ou de coelho, determinou uma diminuição na capacidade de fixar complemento (SCHUR, P.H. and CHRISTIAN, G.D., 1964); a máxima fixação de C1 ao complexo antígeno-anticorpo, era dependente da integridade de determinadas ligações covalentes e outras não covalentes da imunoglobulina (PRESS, E.M., 1975). Os dados apresentados sugerem que outras estruturas da molécula do anticorpo, além da região Fc, são importantes no fenômeno de fixação do sistema complemento, indicando também que a integridade da estrutura tridimensional é importante para essa atividade.

— Para que C1 passe da forma inativa para a forma ativada C1 parece que no mínimo dois processos estão implicados: a ligação do C1 às imunoglobulinas IgG e IgM através do C1q (ISLIKER, H. et al., 1973; REID, K.B.M. and PORTER, R.R.,

1975), e subsequente ativação do C1s. A ligação do Clq à imunoglobulina por um mecanismo desconhecido desencadeia a mudança conformacional de Clq e induz uma alteração não enzimática que desencadeia a ativação do Clr (NAFF, G.B and RATNOFF, O.D., 1968; VALET, G. and COOPER, N.R., 1974; ZICARDI, R.H. and COOPER, N.R., 1976), o que resulta na clivagem de ligações peptídicas no Clr, e uma vez ativado através de clivagem proteolítica ativa o C1s (VALET, G. and COOPER, N.R., 1974a; SAKAI, K. and STROUD, R.M., 1974; ZICARDI, R.H. and COOPER, N.R., 1976). O Clr não tem função apenas de ativador do C1s, mas servetambém como elemento de ligação entre os componentes Clq e C1s na macromolécula C1. Uma vez o C1s ativado, adquire a capacidade de ativar C2 e C4 e assim se desencadeia a via clássica do sistema complemento (KINSKY, S.C., 1972; RUDDY, S., 1972; MÜLLER-EBERHARD, H.J., 1975). Recentemente, GOERS et al.(1977) estudando o mecanismo de ativação do C1 com o sistema hapteno-anticorpo, sugeriram que o Clq participa apenas como suporte para ligar C1 ao imuno complexo, não estando diretamente envolvido no processo de ativação do C1. Sugerem ainda os autores, que a ativação pode ocorrer quando o complexo hapteno-anticorpo se combina com o ponto de junção central de Clq,Clr,C1s.

— A maior parte das informações sôbre a biologia molecular do sistema complemento tem como base os estudos de inibição. Com o sentido de elucidar o mecanismo de ligação do Clq à molécula do anticorpo, compostos químicos simples e substân-

cias biológicas tem-se comportado como potentes inibidores da interação de Clq com moléculas de IgG e IgM. SLEDGE, C.R. and BING, D.H. (1973), demonstraram que compostos diamino (aromáticos e alquilas) são capazes de inibir a interação de IgM e IgG com Clq. DOLL, M.H. and BAKER, B.R. (1976), também apresentaram os derivados por quaternização de piridinas substituídas por haletos de benzila, como potentes inibidores do complemento de cobaia. BERNARD, A. et al. (1976), demonstraram que os eritrócitos de carneiro quando tratados com sobrenadantes de células de baço e timo de camundongos, tornavam-se resistentes à lise por complemento de cobaia. O eritrócito tratado dessa maneira era portanto, capaz de fixar o Cl, mas não de ativá-lo tornando o Cl fixado, irreversivelmente inibido. SUBA, E.A. and CSAKO, G. (1976), apresentaram evidências de que o colágeno e o Clq são capazes de se ligarem aos mesmos sítios tanto na hemácia de carneiro, como nas plaquetas humanas: quando Clq ou colágeno bovino era incubado com EA antes da adição do complemento, ocorria inibição da imuno hemólise. LANGONE, J.J. et al. (1977), demonstraram que a lise de eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos anti-Forssman, frente ao complemento de cobaia, era inibida pela ação da concanavalina A (Con A). LOOS, M. and KONIG, W. (1977), trabalhando com hapteno-proteína (DNP-HSA), verificaram que o complexo DNP-HSA interage com Clq e que DNP-HSA tem efeito inibitório sobre o Cl ativado; e esta inibição depende da concentração do HSA. É

É sugerido, uma vez que o DNP-HSA se liga diretamente ao Clq como o faz o complexo antígeno-anticorpo, que tal modelo poderia ser muito proveitoso no estudo dessa função biológica.

Os trabalhos mencionados acima sobre inibição da imuno hemólise utilizaram como efetores dessa inibição, ou compostos químicos definidos, ou moléculas de proteínas alteradas estruturalmente. Entretanto, vários autores já haviam demonstrado anteriormente que os próprios imunesoros anti-hemolisina eram capazes de inibir a imuno hemólise (LA PORTE, R. et al. 1950 ; ROMEYN, J.A. and ONYSCO, E., 1964; KIMURA, I. et al., 1970), ou de reforçar tal atividade hemolítica (STERZL, J. and RIHA, I., 1965; DRESSER, D.W. and WORTIS, H.H., 1965; and HUMPHREY, J.H., 1967). RANGEL, H.A. (1968), trabalhando com soros de cobaias anti-IgG de coelho, verificou que tais imunesoros eram capazes de inibir ou de reforçar a imuno hemólise, dependendo das propriedades hemolíticas dos soros usados. A diferença nesses soros, estava relacionada com a proporção relativa de anticorpos tipo γ_1 e γ_2 .

SAKURADA, J.K. (1974), empregando o modelo proposto por RANGEL, H.A. (1968), observou que o soro de carneiro anti-IgG de coelho, através a técnica de hemólise passiva indireta, possui a capacidade de inibir a lise do complexo Hem.SAB.anti-SAB ou de reforçá-la em dependência da concentração utilizada na experiência. Foi possível demonstrar, que estas atividades eram independentes e estavam ligadas aos dois tipos de moléculas de

imunoglobulinas, IgS e IgF. A primeira inibindo; e a segunda, reforçando a lise. Esta nomenclatura de IgS e IgF, foi sugerida por ESTEVES, M.B. et al., (1974).

Trabalhos mais recentes realizados neste laboratório (CAMARGO, N.F., 1977), também voltados para o estudo da inibição da imuno hemólise por anticorpos anti-IgG, demonstraram que existe uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de IgS-anticorpo e o logaritmo da função $Y/1-Y$, sugerindo que a IgS e o complemento competem pelos mesmos sítios de ligação, ou que estes são muito próximos. E, que por outro lado, a IgS foi capaz de impedir a lise do complexo EA, mas não foi capaz de impedir a lise do complexo EAC1, indicando que a IgS impede a fixação de Cl.

Tais informações obtidas neste laboratório, possibilitaram o questionamento dessa inibição da imuno hemólise pela molécula de IgS, sugerindo a possibilidade de um efeito competitivo deste anticorpo sobre o sítio de fixação do Cl. — O presente trabalho foi então realizado, no sentido de se verificar essa influência da IgS anticorpo na fixação de Cl através da sua liberação do complexo EAC1.

ANTÍGENOS E IMUNE-SOROS:

Soro normal de coelho - O soro normal de coelho foi obtido a partir de sangue coletado no matadouro da Granja Selecta, Ilus São Paulo. Este soro era armazenado a - 20°C até o momento de uso.

IgG de coelho - Obtida do fracionamento do soro normal de coelho inicialmente por precipitação a 50 % de saturação com solução saturada de Sulfato de Amônia, segundo indicações de KABAT & MAYER (1964); e posterior cromatografia em DEAE-Celulose segundo instruções fornecidas por SOBER et al., (1956). Aliquotas da fração precipitada contendo 12 g de proteínas totais eram cromatografadas em coluna de DEAE-Celulose (38 x 2.5 cm) equilibrada com tampão Fosfato de Sódio 0.01 M pH 8.0, controlando se o fluxo de eluição para 60 ml/hora, coletando-se amostras de 6 ml/tubo. Nessas condições de pH e força iônica, a maior parte da IgG passa livremente pela coluna. O controle imunoeletroforético dessa fração IgG, frente a um soro de carneiro anti-soro normal de coelho, apresentou apenas um arco de precipitação.

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

IgS do soro normal de carneiro - A IgS do soro normal de carnei

ro foi obtida através da cromatografia em DEAE-Celulose (DE 52) em coluna (42 x 2.0 cm) a partir de porções de 18 ml do soro contendo um total de 1.98 g de proteínas. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Fosfato de Sódio 0.005 M pH 8.0 e a proteína foi eluída com o mesmo tampão, a um ritmo de 60 ml/hora, coletando-se 5 ml/tubo. As frações eluídas num volume de 40 a 90 ml eram reunidas, dialisadas contra água destilada a 49C durante 2 horas e liofilizadas. O controle imunoeletroforético dessa fração IgS frente a um soro de coelho anti-soro normal de carneiro, apresentou apenas um arco de precipitação.

Soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro (Hemolisina)-
Cedido pelo Dr. H.A. RANGEL, continha um título de anticorpos hemolíticos de 1:1000.

IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro - A fração IgG da hemolisina, foi obtida através da cromatografia em coluna de DEAE-Celulose, (41 x 2.0 cm) a partir de porções de 25 ml do imune-soro, contendo um total de 1.4 g de proteínas. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Fosfato de Sódio 0.02 M pH 8.0, e nessas condições a IgG passou livremente a um ritmo de 60 ml/hora, coletando-se amostras de 5 ml/tubo. O controle imunoeletroforético dessa IgG frente a um soro de carneiro anti-soro normal de coelho, apresentou apenas um arco de precipitação. Tal fração foi chamada de F1 ou hemolisina A.

Soro de cobaia anti-estroma de hemácias de carneiro (Hemolisi-

na A_{cb}) - Cobaias foram imunizadas com estroma de hemácias de carneiro seguindo-se as indicações do esquema proposto por KIMURA et al., (1970).

Soro de coelho anti-soro normal de carneiro - Os coelhos foram imunizados por inoculação nos linfonodos, de 0.5 ml 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 soro era então separado, inativado a 56°C durante 30 minutos, e acondicionado a - 20°C até o momento de uso.

Soro de carneiro anti-soro normal de coelho - 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 0.15 M com intervalos de sete dias entre cada inoculação. Após uma semana da última inoculação, os carneiros foram sangrados, separado o soro, inativado a 56°C durante 30 minutos, e armazenado a - 20°C até o uso.

Soro de carneiro anti-IgG de coelho - Carneiros foram imunizados com a IgG de coelho, seguindo-se o esquema preconizado por

ESTEVES et al., (1974).

IgS e IgF do soro de carneiro anti-IgG de coelho - Para obtenção de IgS e IgF anticorpos, 30 ml do soro de carneiro anti-IgG de coelho numa concentração proteica total de 2.3 g, foram cromatografados em coluna de DEAE-Celulose (DE 52) com dimensões de 55 x 1.0 cm. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Fosfato de Sódio 0.005 M pH 8.0, e nessas condições passa livremente um primeiro pico de proteína, a IgS, controlando-se o fluxo para 60 ml/hora, e coletando-se amostras de 6 ml. Em seguida foram empregados para eluição vários tampões de Fosfato de Sódio: 0.01 M pH 6.3; 0.04 M pH 6.0 e 0.1 M pH 5.8. Nessa variação da força iônica até 0.04 M e do pH até 6.0, uma outra fração proteica é eluída, tratando-se da IgF. A caracterização imunoeletroforética dessas imunoglobulinas IgS e IgF pôde ser comprovada, quando testadas frente a um soro de coelho anti-soro normal de carneiro.

SOLUÇÕES TAMPÕES - As soluções tampões de Fosfato de Sódio empregadas nesses experimentos, consistiam de soluções de Fosfatos primário e secundário de Sódio, nas proporções exigidas para a obtenção do pH e força iônica requerida pela experiência. O tampão veronal sódico, contendo quantidades ótimas de Ca^{++} e Mg^{++} , foi preparado segundo MAYER et al., (1948) com a adição de gelatina 0.1 % como indicado por STEIN & VAN NGU (1950). O tampão veronal sódico contendo EDTA 0.01 M a pH 7.4

foi preparado de maneira similar, com excessão da ausência de Ca^{++} , Mg^{++} e gelatina.

COMPLEMENTO - Como fonte de complemento, foi utilizada a mistura do soro de 20 a 30 cobaias normais. Esta mistura de soros era liofilizada e armazenada a -20°C até o momento de uso. O título de complemento, determinado de acordo com as instruções fornecidas em MAYER et al. (1946, 1948), era expresso em CH 50 unid./ml. Os reagentes CI e RI foram preparados a partir do soro normal de cobaias pelo método da diluição, segundo as indicações de KABAT & MAYER (1961).

HEMÁCIAS DE CARNEIRO - Como fonte de hemácias, o sangue de carneiros normais, coletado assépticamente por punção venosa, em igual volume de solução de Alsever estéril, KABAT & MAYER (1961), foi armazenado a 4°C e utilizado nesses experimentos. Estas hemácias foram utilizadas entre o 7^o e o 40^o dia após obtenção.

PADRONIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS DE CARNEIRO - As hemácias eram lavadas em tampão veronal isotônico, e padronizadas de modo que a diluição 1:10 em água destilada, fornecesse uma absorbância de 0.42 a $\lambda = 550 \text{ nm}$. Esta suspensão contém 5×10^9 hemácias /ml aproximadamente.

PREPARO DO SISTEMA HEMOLÍTICO - O sistema hemolítico era preparado, misturando-se volumes iguais de suspensão de hemácias de carneiro padronizadas + hemolisina A diluída a 1:50 em tampão veronal isotônico, ou hemolisina A_{cb} diluída a 1:40 em tam

pão veronal contendo EDTA na concentração de 0.01 M. Em seguida as misturas eram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após o período de incubação, o sistema hemolítico em dependência da hemolisina utilizada, era lavado três vezes com tampão veronal isotônico (hemolisina A); ou tampão veronal EDTA uma vez, seguida de duas lavagens com tampão veronal isotônico (hemolisina A_{cb}). As suspensões de hemácias de ambos sistemas hemolíticos eram repadronizadas de modo que uma diluição a 1:5 em água destilada desse uma absorbância de 0.420 a $\lambda = 550$ nm.

DOSAGEM DOS REAGENTES C1 e R1 - Na dosagem de C1 e R1, 0.5 ml de diluições seriadas de C1 eram misturadas a 0.5 ml do sistema hemolítico EA_{cb} e incubados a 0°C por 30 minutos. Após esse tempo, 0.5 ml de diluições seriadas de R1 era adicionado àqueles tubos perfazendo uma titulação em bloco + 1.0 ml de tampão veronal isotônico, e incubação a 37°C durante 45 minutos. Decorrido o tempo de incubação, os tubos eram centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos, e o grau de lise era determinado pela absorbância dos sobrenadantes a $\lambda = 550$ nm. Os controles individuais de C1 e R1 quando incubados com o sistema hemolítico não apresentavam lise.

PREPARO DO COMPLEXO CONSTITUIDO PELO SISTEMA HEMOLÍTICO E C1 PARCIALMENTE PURIFICADO - O complexo EAC1 foi preparado, misturando-se partes iguais do sistema hemolítico a concentrações variadas de C1 diluído em tampão veronal isotônico. A mistura

era incubada a 0°C durante 30 minutos, e após esse tempo, lavada com tampão veronal isotônico e repadronizada, de modo que a diluição a 1:5 desta suspensão em água destilada, fornecesse uma absorbância de 0.42 a $\lambda = 550$ nm.

DETERMINAÇÃO DA UNIDADE CH_{50} - Para determinar uma unidade de CH_{50} , 0.5 ml de várias diluições de CI foram adicionadas a 0.5 ml do sistema hemolítico EA_{cb} e incubadas a 0°C durante 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se a cada tubo 1.0 ml de tampão veronal isotônico + 0.5 ml de RI diluído a 1:4 em tampão veronal isotônico, e novamente se incubou a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada a $\lambda = 550$ nm. A unidade CH_{50} determinadas nessas condições corresponde a diluição 1:3000 do CI utilizado.

AÇÃO DA IgS SOBRE O SISTEMA HEMOLÍTICO EA - A influência da IgS anticorpo na inibição da lise do sistema hemolítico, foi verificada através a mistura deste sistema com variadas concentrações de IgS (N de Ac/ml) seguida de incubação a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, as diferentes misturas foram lavadas duas vezes com tampão veronal isotônico. O sedimento das misturas foi então ressuspenso em 2.0 ml do tampão, adicionado de 0.5 ml de complemento na concentração de 8 CH_{50} /ml e reincubado a 37°C durante 45 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados e as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a $\lambda = 550$ nm. Verificou-se que 2 μ g de N Ac/ml

era suficiente para se obter inibição total da lise de EA.

DOSAGEM DE PROTEINAS - O teor de proteínas foi determinado pelo reativo do Biureto segundo WEICHSELBAUM (1946), ou pela absorção da luz ultravioleta no $\lambda = 280$ nm, em um espectrofotômetro Zeiss PMQ II, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

IMUNOELETROFORESE - Os experimentos de imunoelectroforese foram realizados conforme as indicações de GRABAR & BURTIN (1964), empregando-se placas de vidro 12 x 9 cm contendo uma camada de 1.5 mm de ágar a 1 % em tampão veronal 0.05 M pH 8.4, e um gradiente de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora.

PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO - Foi empregado o método de HEIDELBERGER & KENDALL (1935), segundo instruções fornecidas por KABAT & MAYER (1968). A quantidade de proteínas dos precipitados foi determinada pela técnica espectrofotométrica utilizando-se o reagente do Biureto.

RESULTADOS

1 - QUANTIFICAÇÃO DE Cl FIXADO AO COMPLEXO EACl:

O presente experimento foi realizado com o objetivo de se determinar uma concentração de Cl que estivesse em ligeiro excesso com relação à capacidade ligante do sistema hemolítico - EA em uso. Para tal foi empregado um reagente Cl recentemente preparado, contendo 3000 $\text{ClH}_{50}/\text{ml}$, como mencionado em material e métodos.

Para se determinar a capacidade de Cl se fixar ao EA e formar o complexo EACl, várias unidades de Cl em um volume definido, foram adicionadas a igual volume de EA e incubadas a 0°C durante 30 minutos. Passado esse período, as misturas foram centrifugadas a 1000 rpm, e o Cl presente nos sobrenadantes foi dosado. Porções de 0.5 ml de diluições seriadas dos sobrenadantes, foram adicionadas a 0.5 ml do sistema hemolítico EA_{cb}, misturadas e incubadas a 0°C durante 30 minutos. Após essa incubação, foram adicionadas a cada tubo 1.0 ml de tampão veronal isotônico + 0.5 ml do reagente R1 diluído a 1:4 e as misturas foram reincubadas a 37°C por um período de 45 minutos. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm, e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada em espectrofotômetro Coleman Jr. a um comprimento de onda $\lambda = 550 \text{ nm}$. As leituras obtidas desses sobrenadantes permitiram a determinação de uma medida relativa das unidades de Cl não fixadas ao complexo EA,

e por subtração do número de unidades de Cl adicionadas, tinha-se o número de unidades fixadas.

Na tabela 1 estão representados os resultados desta experiência como unidades de Cl adicionadas, fixadas e não fixadas por ml. Como pode-se verificar, a quantidade de Cl fixada ao complexo tende a valores assintóticos, sendo que a partir de 15 unidades adicionadas, parece existir já um excesso de Cl para a formação do EACl, não havendo grande aumento na quantidade de Cl fixado.

Tabela 1 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Cl NO COMPLEXO EACl.

Unidades de Cl/ml		
Adicionadas	Fixadas	Não Fixadas
1.2	1.1	0.1
2.5	2.3	0.1
5.0	4.5	0.5
10.0	8.4	1.5
15.0	10.5	4.4
20.0	14.6	5.4
40.0	17.5	22.5

2 - INFLUÊNCIA DA IgS-ANTICORPO NA LIBERAÇÃO DE Cl DO COMPLEXO EACl :

Como mencionado em Material e Métodos, foi demonstrado que a IgS-anticorpo na concentração de 2 ug de N de Ac/ml era suficiente para inibir 100 % da lise de EA. O presente experimento foi realizado com vistas a se verificar a capacidade da IgS-anticorpo em liberar Cl do complexo EACl, que foi preparado na presença de 10, 15, 20 e 40 unidades de Cl. Ao complexo EACl, contendo diferentes concentrações de unidades de Cl, adicionou-se a IgS-anticorpo na concentração de 2 ug de N de Ac/ml e as misturas ficaram a 0°C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes foram empregados para a dosagem de Cl. O Cl não fixado ao sistema hemolítico, presente nos sobrenadantes da primeira etapa desse experimento, foi dosado, e desses dados pode-se quantificar o número de unidades fixadas ao sistema hemolítico EA. Como controle da liberação de Cl das diferentes misturas, ao invés de IgS-anticorpo, adicionou-se tampão veronal isotônico nas mesmas proporções de volume.

Na tabela 2 acham-se representados os números de unidades de Cl fixadas ao EA e as liberadas pela influência da IgS-anticorpo, e, como controle dessa liberação foi utilizado o tampão veronal isotônico. Esses dados mostram que a IgS-anticorpo foi capaz de liberar concentrações variadas de unida-

des de Cl do complexo EACl, o que não aconteceu de maneira significativa com o tampão veronal isotônico empregado como controle.

Tabela 2 - INFLUÊNCIA DA IgS-ANTICORPO NA LIBERAÇÃO DE Cl DO COMPLEXO EACl.

Unidades de Cl fixadas ao EA	Unidades de Cl liberadas pela ação de :	
	Tampão	IgS-Ac
8.0	0.1	1.6
10.5	0.3	3.0
14.0	0.3	2.8
17.0	0.5	2.9

Com a finalidade de verificar se a IgS normal era capaz de liberar Cl do complexo EACl, o presente experimento foi realizado, misturando-se volumes iguais de EA e Cl numa concentração de 15 U/ml. Obtido o complexo EACl, trabalhou-se em paralelo com IgS normal, IgS-anticorpo e tampão veronal isotôni-

co, empregando-se a mesma metodologia da experiência anterior.

Os resultados apresentados na tabela 3 demonstram que apenas a IgS-anticorpo foi capaz de liberar Cl do complexo EACl, o que não ocorreu com a IgS normal que se comportou como o tampão. Esses dados fornecem subsídios que permitem justificar a capacidade da IgS-anticorpo em liberar Cl do complexo EACl já formado, como uma ação ligada à propriedade biológica do anticorpo, mais explicitamente, do comprometimento de sítios de fixação do Cl relacionados à interação antígeno-anticorpo.

Tabela 3 - INFLUÊNCIA DA IgS NORMAL NA LIBERAÇÃO DE Cl DO COMPLEXO EACl.

Unidades de Cl fixadas ao EA	Unidades de Cl liberadas pela ação de :		
	Tampão	IgS-N	IgS-Ac
13.5	0.1	0.1	2.8

3 - INFLUÊNCIA DA FÔRÇA IÔNICA NA LIBERAÇÃO DE Cl DO COMPLEXO EACI PELA AÇÃO DA IgS-ANTICORPO :

Vários autores têm demonstrado a importância da força iônica no mecanismo de fixação do complemento: variação da atividade hemolítica decorrente da força iônica do tampão diluente (KABAT, E.A & MAYER, M.M., 1961), e posteriormente determinada como ótima para minimizar a dissociação de Cl do complexo antígeno-anticorpo, a força iônica 0.065 μ (RAPP, H. J. & BORSOS, T., 1963); e ainda, evidência de que o Cl seja eluído do complexo EAC'1a pelo aumento da força iônica (BORSOS, T. & RAPP, H.J., 1965; COLTEN; H.R. et al., 1968), sendo demonstrado inclusive a dependência de uma força iônica de 0.115 μ para a transferência de Cl entre complexos de EAC'1a e EAC' 4 (BORSOS, T. & RAPP, H.J., 1965; LINSOTT, W.D., 1969).

De posse dos resultados anteriores que comprovam a liberação de Cl do complexo EACI pela ação da IgS-anticorpo, o presente experimento foi realizado com vistas a se verificar a influência da força iônica do sistema diluente nessa liberação de Cl. O experimento de liberação de Cl pela ação da IgS-anticorpo foi feito, empregando-se como diluentes do meio tampão veronal isotônico 0.15 μ , ou tampão veronal sacarose 0.065 μ .

O gráfico da figura 1 mostra o resultado da dosagem de Cl liberado neste experimento, incluindo os controles dos

tampões mencionados sem a presença da IgS-anticorpo. Pode-se verificar portanto, que não houve influência da força iônica na liberação de C1 do complexo EAC1 pela ação da IgS-anticorpo.

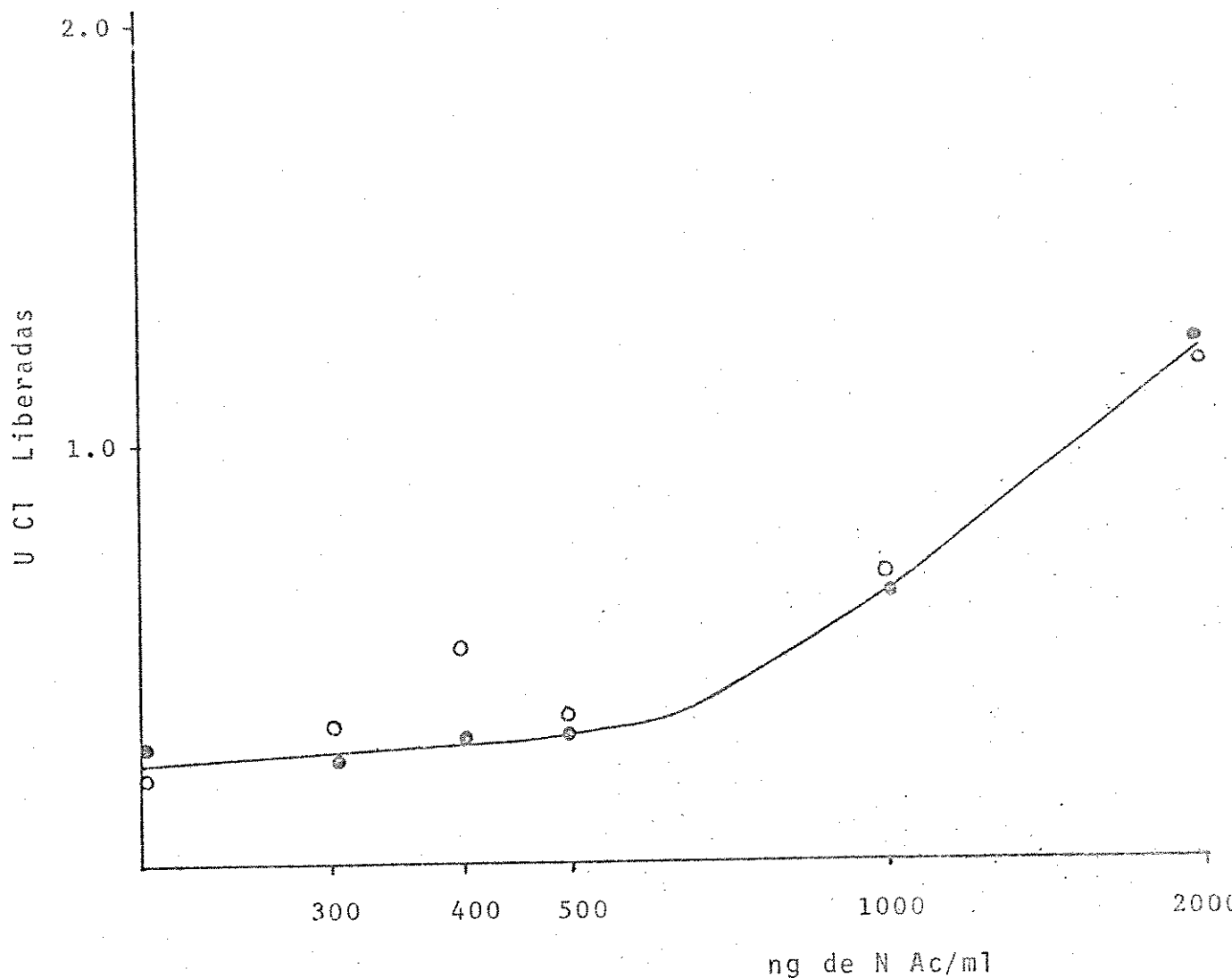


FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DA FÔRÇA IÔNICA NA LIBERAÇÃO DE C1 do COMPLEXO EAC1. TVI o---o, TVS ●---●.

DISCUSSÃO

Experiências anteriores tinham salientado a importância da integridade estrutural da molécula de anticorpo para a ativação do sistema complemento. De fato a capacidade de fixar complemento sempre era reduzida quando a estrutura tridimensional da molécula do anticorpo era alterada seja através de tratamento químico ou enzimático (SCHUR, P. H. & CHRISTIAN, G.D., 1964; COLOMB, M. & PORTER, R.R., 1975; PRESS, E.M., 1975).

Algumas investigações foram feitas com o sentido de verificar se era possível estudar a fixação de C1 ao EA sem introduzir alterações estruturais na molécula do anticorpo. O fenômeno da inibição da imuno hemólise por soros anti-IgG vem sendo explorado com essa finalidade por alguns autores :

RANGEL, H.A. (1968) estudando a ação dos soros de cobaias anti-IgG de coelho, sobre as hemácias sensibilizadas com o complexo SAB.anti-SAB, verificou que a lise nesse sistema era estritadamente dependente da natureza dos soros de cobaias anti-IgG de coelho e não das imunoglobulinas do complexo SAB.anti-SAB utilizado na sensibilização das hemácias.

Observações paralelas foram feitas por SAKURADA, J.K. (1974) empregando soros de carneiro anti-IgG de coelho. A autora demonstrou que estes soros eram capazes de inibir ou de reforçar a

lise do sistema Hem.SAB.anti-SAB, dependendo da concentração utilizada e que estas propriedades estavam relacionadas com a presença de imunoglobulinas dos tipos IgS e IgF, aquela capaz de inibir e esta de reforçar o grau de lise das hemácias sensibilizadas. Como a IgS não é capaz de fixar complemento pela via clássica (ESTEVES, M.B. et al., 1974), a sua presença no ensaio representa um inibidor em potencial da ativação do complemento. Demonstrou ainda que ocorria inibição total da imunohemólise, quando se adicionava ao sistema a IgS específica para determinantes antigênicos tanto das regiões Fab quanto da Fc da molécula de IgG de coelho. Tal inibição, sugere a importância de ambas as regiões Fab e Fc da molécula de IgG de coelho.

CAMARGO, N.F. (1977), trabalhando com hemácias sensibilizadas com a fração IgG do soro de coelho anti-estroma de hemácias de carneiro, observou uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de IgS e o logaritmo da função $Y/1-Y$. Tal relação sugere que a IgS e o complemento competem pelos mesmos determinantes, ou determinantes próximos na molécula de IgG. Observou ainda, que a IgS era capaz de impedir a lise do complexo EA, mas não a do EAC1. Este fato indica que a IgS, uma vez combinada à IgG, impede a fixação do C1 ao complexo EA. No entanto experiências de absorção, revelaram que a quantidade de IgS absorvida por EA ou por EAC1 foi praticamente a mesma e os sobrenadantes dessas absorções se comportavam de maneira simi-

lar em relação à inibição da imuno hemólise, sugerindo desta maneira que o C1 era liberado do complexo EAC1 pela ação da IgS.

Os dados disponíveis até o momento não permitem esclarecer o mecanismo de inibição da imuno hemólise pela IgS, não se sabendo se esta inibição ocorre devido a um impedimento estérico do sitio de ativação da molécula do anticorpo ou a modificações alostéricas na molécula de imunoglobulina.

A hipótese, ocorrência de modificações alostéricas na molécula de imunoglobulina pela ação da IgS foi investigada no presente trabalho procurando-se verificar inicialmente se a IgS era capaz de liberar C1 do complexo EAC1.

O estudo da quantidade de C1 fixada ao complexo EA mostrou que o complexo EA está praticamente saturado de C1 quando se utiliza 15 (quinze) ou mais unidades de complemento na sua preparação. Na verdade, a partir de quinze unidades de complemento a quantidade de C1 fixada ao complexo tende a valores assintóticos.

Foi observado que 2 ug de N de anticorpo/ml de IgS inibem totalmente a lise do EA. Com hemácias EAC1 contendo quinze ou mais unidades de complemento se obtém uma liberação do C1 que é significativamente maior do que aquela observada quando se adiciona tampão ou IgS normal

Quando foram utilizadas hemácias EAC1 preparadas com diferentes quantidades de C1 fixadas, verificou-se que uma mesma dose de anticorpo liberava praticamente a mesma quantidade de C1 desde que o complexo EAC1 contivesse dez ou mais unidades

de C1 fixadas.

Esses dados são concordantes com as observações de ROMEYN, J. A. & ONYSKO, E. (1964) os quais verificaram que existe uma relação direta entre a proporção da quantidade de complemento e de hemolisina com o grau de inibição da imuno hemólise, ou seja, aumentando a concentração de complemento ocorria uma diminuição no grau de inibição da lise para uma mesma dose do anticorpo anti-IgG. O aumento no período de incubação também foi um fator limitante para a inibição da lise.

Os nossos dados e os de ROMEYN, J.A. & ONYSKO, E. podem ser interpretados com base no equilíbrio dinâmico entre duas reações independentes que competem por sítios idênticos ou próximos: uma reação entre IgS e IgG e a outra entre C1 e IgG.

Como demonstrado no trabalho de BORSOS, T. & RAPP, H.J. (1963) a fixação do C1 ao complexo EA é reversível, isto é, a manutenção da forma macromolecular de C1a é dependente de condições ótimas de força iônica. Desta maneira a IgS-anticorpo , tem a chance de ocupar o lugar do C1, se considerarmos que complemento e anticorpo competem pelos mesmos sítios. A capacidade da IgS-anticorpo em liberar C1 do complexo EAC1, parece portanto estar relacionada com a sua afinidade pela molécula de IgG, provavelmente muito maior que aquela do C1.

Resultados igualmente compatíveis com os nossos foram obtidos por KIMURA, T. et al.(1970) que utilizando soros de cão e de carneiro anti-IgG não purificada de coelho, demonstraram que

estes imunesoros eram capazes de determinar a liberação do C1 do complexo EAC142. A quantificação do C1 liberado foi realizada por nós e por aqueles autores com técnicas similares, contudo os dados quantitativos devem ser tomados apenas como medidas relativas pelas seguintes razões:

1 - O C1 utilizado nos experimentos não estava livre de contaminantes, não se tendo assim uma idéia de quais os componentes do complemento além do C1 estavam realmente fixados ao complexo EA.

2 - A quantificação do C1 forneceu medidas relativas em virtude da labilidade deste componente (BORSOS, T. & RAPP, H.J., (1965). Uma vez liberado do complexo EA, parte do C1 poderia ter-se desnaturado e a dosagem então realizada pode não ser representativa de todo o C1 liberado pela ação da IgS-anticorpo. Dados mais exatos somente seriam obtidos através do estudo da cinética da reação com a molécula previamente marcada com isótopos radioativos.

A atividade hemolítica do complemento varia com a força iônica do tampão diluente KABAT, E.A. & MAYER, M.M. (1961). Essa atividade é máxima em uma força iônica de 0.065 μ RAPP, H. J. & BORSOS, T.(1963), ou seja, nessas condições, o complemento de cobaia está otimamente ligado ao complexo antígeno-anticorpo.

COLTEN, H.R. et al. (1968) apresentaram evidências de que o C'1a é eluído do complexo EAC'1a pelo aumento da força iônica, levan

tando a hipótese de que C'1a estaria ligado ao complexo antígeno-anticorpo por ligações iônicas.

LINSCOTT, W.D. (1969) estudando os efeitos da força iônica, temperatura, classe de anticorpo e avidéz sobre a fixação e transferência de C'1a, verificou maior transferência de C'1a do EAC'1a para EAC'4, empregando anticorpos das classes IgG ou IgM, quando o tampão diluente apresentava uma força iônica de 0.15μ ; e que o C'1a não se dissociava imediatamente do EAC'1a como no EAC'4, porque o C'4 ligado à célula contribuía para a ligação entre C'1a e seus sítios de união à superfície da célula. A transferência de C'1a de células sensibilizadas com IgG, foi melhor a 30°C do que a 0°C , ocorrendo o inverso com a IgM; e que essa transferência ocorreu no período de quinze minutos.

De posse dessas informações sobre o efeito da força iônica, investigamos a possibilidade da IgS-anticorpo liberar menor quantidade de C1 do complexo EAC1, empregando-se um tampão diluente em que a força iônica era de 0.065μ . Como mostra o gráfico da figura 1, não houve diferença significativa na liberação do C1 do complexo EAC1 pela ação da IgS-anticorpo, quando se utilizou tampão na força iônica de 0.065μ ou de 0.15μ . Este fato sugere que a afinidade da IgS pelo anticorpo é bem maior que a do complemento pelo complexo e seu sítio mesmo quando essa reação é realizada em condições ótimas.

O conjunto de dados apresentados no presente trabalho em concordância com aqueles apresentados na literatura são favoráveis à hipótese segundo a qual a inibição da imuno hemólise por anticorpos anti-IgG se deve a um impedimento estérico do sítio de combinação do CI ou de determinantes próximos a ele.

Contudo, os dados disponíveis não permitem ainda afastar a hipótese de que ocorram modificações alostéricas na molécula de IgG em consequência da combinação com anticorpos anti-IgG.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de se verificar a influência da IgS anti-IgG de coelho na liberação de C1 do complexo EAC1.

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- 1 - A adição de IgS-anticorpo a complexos EAC1, contendo diferentes quantidades de unidades de C1, sempre provocou a liberação de C1, ao passo que a adição de IgS normal não produziu o mesmo efeito.
- 2 - O emprego de tampão com baixa força iônica não reduziu a quantidade de C1 liberada pela ação do anticorpo, sugerindo que a afinidade da IgS pela IgG é maior do que a afinidade de C1 pelo imune complexo.
- 3 - O conjunto de dados sugere que a inibição da imuno hemólise pela IgS deve-se provavelmente ao impedimento estérico do sítio de combinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIN, B.; BOUMSELL, L.; BORSOS, T.; GOOD, R.A. and DAY, N.K. - I- Pretreatment of sheep erythrocytes with supernatants of mouse spleen and thymus cell; inhibit whole complement activity and C2 utilization. J.Immunol. 115 (4): 1087, 1975.

ALLAN, R. and ISLIKER, H. - Studies on the complement binding site of rabbit immunoglobulin G. II. The reaction of rabbit IgG and its fragments with C1q. Immunochemistry, 11:243, 1974.

AMIRAIAM, K. and LEIKHIM, E.J. - Interaction of fragment III of rabbit gamma globulin and guinea pig complement. Proc.Soc. Exp.Biol. and Med., 108: 454, 1961.

AREND, W.P. and WEBSTER, D.E. - Catabolism and biologic properties of two species of rat IgG2a Fc fragments. J. Immunol., 118 (2): 395, 1977.

AUGENER, W.; GREY, H.M.; COOPER, N.R. and MÜLLER-EBERHARD, H. J. - The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulin with C1. Immunochemistry, 8: 1011, 1971.

BERNARD, A.; WILLIAN, W.; HIDEKI, T.; BOUMSELL, L.; GOOD, R.A. and NOORBIBI, K.D. - Leukocyte-derived complement inhibitor : IV. The functional properties of C1 bound to erythrocytes pre treated with leukocyte culture supernatant. J. Immunol. 117 (4): 1117, 1976.

BORSOS, T. and RAPP, H.J. - Hemolysin titration based on fixation of the activated first component of complement: Evidence

that one molecule of hemolysin suffices to sensitize an erythrocyte. J.Immunol., 95: 559, 1965.

BORSOS, T. and RAPP, H.J. - Chromatographic separation of the first component of complement and its assay on molecular basis. J. Immunol., 91: 851, 1963.

BORSOS, T.; COLTEN, H.R.; SPALTER, J.S.; ROGENTINI, N. and RAPP, H.J. - The C'1a fixation and transfer test: examples of its applicability to the detection and enumeration of antigens and antibodies at cell surfaces. J.Immunol., 101 (3): 392, 1968.

CAMARGO, N.F. - Contribuição ao estudo da inibição da imunohemólise por anticorpos anti-imunoglobulinas. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1977.

CEBRA, J.J. - In: Conceptual Advances in Immunology and Oncology. CUMLEY, R.W.; ALDRIGE, J.; HADROZ, J. and MAC CAY, J., ed. Haper & Row, New york, p. 220, 1963.

COLOMB, M. and PORTER, R.R. - Characterization of a plasmin-digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that binds antigen and complement. Biochem.J., 145: 177, 1975.

COLTEN, H.R.; BORSOS, T. and RAPP, H.J. - Reversible loss of activity of the first component of complement (C'1) as a function of ionic strength. J.Immunol., 100: 799, 1968.

DOLL, M.H. and BACKER, B.R. - Irreversible enzyme inhibitors: inhibitors of guinea pig complement derived by quaternization of substituted pyridines with benzyl halides. J.Med.Chem., 19 (9): 1079, 1976.

DRESSER, D.W. and WORTIS, H.H. - A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency. *Nature*, 208: 859, 1965.

ELLERSON, J.R., YASMEEN, D., PAINTER, R.H. and DORRINGTON, K. J. - A fragment corresponding to CH₂ region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity. *FEBSS.LETT.*, 24: 318, 1972.

ESTEVEZ, M.B.; SANT'ANNA, O.A.B.; ANNES, V.C.S. and BINAGHI, R.A. - Characterization and properties of an anaphylactic 7 S antibody in sheep. *J.Immunol.*, 112: 722, 1974.

GOMORI, G. - Preparation of buffers for use in enzyme studies In: COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O., *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1: 138, 1955.

GÖTZE, O. and MÜLLER-EBERHARD, H.J. - Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. *J.Exp.Med.*, 132: 898, 1970.

GRABAR, P. & BURTIN, P. - *Immuno-electrophoretic Analysis*. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company, 1964.

GOERS, J.W.; ZICCARDI, R.J.; SCHUMAKER, V.N. and GLOVSKY, M.M. - The mechanism of activation of the first component of complement by a univalent hapten-IgG antibody complex. *J.Immunol.*, 118 (6): 2182, 1977.

HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F.E. - 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, 1935.

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

ISLIKER, H.; ALLAN, R., DOEGMAN, M., HEUSSER, C. and KNOBEL, H. - Schring Symposium on Immunopathology, cautat Yugoslavia, Ado, Biosci., 12: 270, 1973.

KABAT, E.A. and MAYER, M.M. - Experimental Immunochemistry. - 1st ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 1968.

KEHOE, J.M. and FOUFEREAU, M. - Immunoglobulin peptide with complement fixing activity. *Nature*, 224: 1212, 1970.

KIERSZENBAUM, F. and WEINMAN, D. - Antibody-independent activation of the alternative complement pathway in human serum by parasitic cells. *Immunology*, 32: 245, 1977.

KIMURA, I.; EULITZ, M. and THIERFELDER, S. - Effect of anti-rabbit IgG antisera on imune haemolysis. *Immunology*, 19: 689, 1970.

KINSKY, S.C. - Antibody-complement interation with lipid model membranes. *Biochim.Biophys.Acta*, 265: 1-23, 1972.

LANGONE, J.J.; BOYLE, M.D.P and BORSOS, T. - Effect of concanavalin A on the classical complement pathway. *J.Immunol.*, 118 (5): 1622, 1977.

LA PORTE, R.; HARDRE DE LOOZE, L. et ROULIER, P. - Immunsérums antihémolytiques. *Ann.Inst.Pasteur*, 79: 381, 1950.

LEPOW, I.H.; NAFF, G.B.; TODD, E.W.; PENSKY, J. and HINZ, C.F. Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. J.Exp.Med., 117: 983, 1963.

LINSCOTT, W.D. - The effects of ionic strength, temperature and antibody class and avidity on fixation and transfer of the first component of complement. J.Immunol., 102 (4): 993, 1969.

LOOS, M. and KONIG, W. - Interaction of DNP-antigens with the first component of complement ($\overline{C1}$). J.Immunol., 118 (1):223, 1977.

MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O. and HEIDELBERGER, M. - The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J.Exp.Med., 48: 538, 1946.

MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O. and HEIDELBERGER, M. - Quantitative studies of complement fixation. I.A method. J.Immunol., 59 (2): 195, 1948.

MÜLLER-EBERHARD, H.J. - Complement. Ann.Rev.Biochem., 44 : 697, 1975.

NAFF, G.B.; PENSKY, J. and LEPOW, I.H. - The macromolecular nature of the first component of human complement. J.Exp.Med., 119: 593, 1964.

NAFF, G.B. and RATNOFF, O.D. - The enzymatic nature of C1r. Conversion of C1s to C1s-esterase and digestion of amino acid esteres by C1r. J.Exp.Med., 128: 571, 1968

OVARY, Z.; SALUK, P.H.; QUIJADA, L. and LAMM, M.E. - Biologic activities of rabbit immunoglobulin G in relation to domains of the Fc region. J.Immunol., 116 (5): 1265, 1976.

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I.H.; ROSS, O.A.; TODD, E.W. and WARDLAW, A.C. - The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120: 279, 1954.

PRESS, E.M. - Fixation of the first component of complement by immune complexes: effect of reduction and fragmentation of antibody. *Biochem.J.*, 149: 285, 1975.

RANGEL, H.A. - Studies on passive haemolysis mediated by anti serum globulin antibodies. *Immunology*, 14 (2): 197, 1968.

RAPP, H.J. and BORSOS, T. - Effects of low ionic strength on immune haemolysis. *J.Immunol.*, 91: 826, 1963.

REID, K.B.M. - Complement fixation by the F(ab')₂ fragment of pepsin treated rabbit antibody. *Immunology*, 20: 649, 1971.

REID, K.B.M. and PORTER, R.R. - The structure and mechanism of activation of the first component of complement. *Contemp.Top. Mol.Immunol.*, 4: 1, 1975.

REISS, A.M. and PLESCIA, O.J. - Fixation of complement to fragments of antibodies. *Science*, 141: 812, 1963.

ROMEYN, J.A. and ONYSKO, E. - The effects of "anti-antibody" on immune haemolysis. *Immunology*, 7: 217, 1964.

RUDDY, S.; GIGLI, I. and AUSTEN, K.F. - Immuno haemolysis. *N. Engl.J.Med.*, 287, 489, 545, 592, 642, 1972.

SAKAI, K. and STROUD, R.M. - The activation of C1s with purified C1r. *Immunochemistry*, 11: 191-196, 1974.

SCHUR, P.H. and BECKER, E.L. - Pepsin digestion of rabbit and sheep antibodies. The effect on complement fixation. J.Exp.Med., 118: 891, 1963.

SCHUR, P.H. and CHRISTIAN, G.D. - The role of disulfide bonds in the complement-fixing and precipitating properties of 7 S rabbit and sheep antibodies. J.Exp.Med., 120 (4): 531, 1964.

SLEDGE, C.R. and BING, D.H. - Binding properties of the human complement protein Clq. J.Biol.Chem., 248: 2818, 1973.

SAKURADA, J.K. - Estudo sôbre a localização do sitio 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, 1974.

SOBER, H.A.; GUTTER, F.J.; WICKOF, M.M. and PETERSON, E.A. - Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange adsorbents. J.Am.Chem.Soc., 78: 751, 1956.

STEIN, G.J. and VAN NGU, D. - A quantitative complement fixation test titration of litic sera the unit of 50 % haemolysis. J.Immunol., 65 (1): 17, 1950.

STERZL, J. and RIHA, I. - A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. Nature, 208: 858, 1965.

SUBA, E.A. and CSAKO, G. - Clq (C1) receptor on human platelets: Inhibition of collagen induced platelet aggregation by Clq (C1) molecules. J.Immunol., 117 (1): 304, 1976.

- TARANTA, A. and FRANKLIN, E.C. - Complement fixation by antibody fragments. *Science*, 134: 1981, 1961.
- UTSUMI, S. - Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments. *Biochem.J.*, 112: 343, 1969.
- VALET, G. and COOPER, N.R. - Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1s of the first complement component. *J.Immunol.*, 112: 339, 1974a.
- VALET, G. and COOPER, N.R. - Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1r subunit of the first complement component. *J.Immunol.*, 112: 1167, 1974b.
- VUAGNAT, P. - Further studies on the biological properties of guinea-pig IgG1 antibodies. III. Haemolytic efficiency in vitro, *Immunology*, 32 (1): 103, 1977.
- WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood plasma. *Amer.J. Clin.Path.Tech.*, 10 : 40, 1946.
- YASMEEN, D.; ELLERSON, J.R.; DORRINGTON, K.J. and PAINTER, R.H. - The structure and function of immunoglobulin domains. IV. The distribution of some effector functions among the C γ 2 and C γ 3 homology regions of human immunoglobulin G. *J.Immunol.*, 116: 518, 1976.
- ZICCARDI, R.J. and COOPER, N.R. - Activation of C1r by proteolytic cleavage. *J.Immunol.*, 116: 504, 1976.
- ZICCARDI, R.J. and COOPER, N.R. - The physicochemical and functional characterization of the C1r subunit of the first complement component. *J.Immunol.*, 116: 496, 1976.