

Im pl.
PAULO MARIA FERREIRA DE ARAÚJO ²⁴

ESTUDO IMUNOQUÍMICO DA SÔRO-ALBUMINA BOVINA
DEGRADADA PELA CATEPSINA D DE COELHO

Tese de Mestrado
Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
Orientador: Prof. H. A. RANGEL ²⁴

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo
(1975)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

H O M E N A G E M

"A *João Alexandre de Araújo*, meu pai, que na sua simplicidade e honesta pujança, foi um exemplo de bravura sertaneja".

A minha filha

A minha esposa

A minha mãe e irmãos

"Ao prof. Dr. *Humberto de Araújo Rangel*, mestre e amigo. Sua sabedoria reflete a experiência vivida como fonte de estímulo permanente".

AGRADECIMENTOS

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, o autor 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 .

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 Benedito de Oliveira Filho (Depto. de Microbiologia e Imunologia), Luis Sebastião Prigenzi / (Fac. de Medicina), Dária Repka (Dpto. de Microbiologia e Imunologia) e Julia Franceschi (Depto. de Farmacologia) pela discussão crítica dos resultados.

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

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, o autor foi bolsista da CAPES.

Í N D I C E

	Pags .
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS.....	9
1 - Determinação das condições ótimas de digestão..	9
2 - Fracionamento do digesto.....	15
2.1 - Fração <u>F1</u>	15
2.2 - Fração <u>F2</u>	20
2.2.1 - Fracionamento de <u>F2</u>	24
Análise das sub-frações de <u>F2</u>	26
2.2.2 - Fracionamento de <u>F2-C</u>	29
Análise das sub-frações de <u>F2-C</u>	31
2.3 - Fração <u>F3</u>	34
2.3.1 - Diálise controlada da fração <u>F3</u>	36
2.3.2 - Fracionamento de <u>F3</u>	38
Análise das sub-frações de <u>F3</u>	41
DISCUSSÃO.....	46
RESUMO E CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

INTRODUÇÃO

A proteólise dos antígenos tem sido utilizada como um método geral para estudar a heterogeneidade dos anticorpos anti-proteína e os diferentes grupamentos químicos que determinam a especificidade das interações antígeno-anticorpo.

Dentre as diversas enzimas proteolíticas utilizadas, a catepsina D isolada do baço de coelho tem sido largamente empregada nesse estudo imunoquímico. Responsável por 75% da atividade proteolítica desse órgão (PRESS et al., 1960), a catepsina D é uma endopeptidase ativa em meio ácido, presente nas células fagocitárias (STEFANOVIC et al., 1962), estando localizada nos lisossomos secundários dessas células (JACQUES, 1969). Estes fatos sugerem que esta enzima esteja envolvida no metabolismo de antígenos proteicos.

A especificidade bioquímica da catepsina D, isolada do baço de diferentes animais, foi estudada por RANGEL e LAPRESLE (1966) utilizando a cadeia B da insulina como substrato. Os resultados indicam que essas catepsinas / diferem entre si.

Por outro lado, o estudo comparativo dos produtos de degradação da molécula de Sôro-Albumina Humana (SAH) obtidos pela ação de diferentes enzimas proteolíticas (LAPRESLE, 1959) mostrou que das enzimas estudadas, a catepsina D era a mais apropriada para a investigação da estrutura antigênica desta proteína.

Utilizando a catepsina D como instrumento de trabalho para a investigação da estrutura antigênica da SAH, LAPRESLE (1955) pôde verificar que esta proteína tem múltiplos

tiplos determinantes antigênicos. Desses digestos foi possível isolar um fragmento incapaz de precipitar com vários imune-soros anti-SAH, mas dotado de atividade inibitória / para o sistema precipitante SAH versus anti-SAH. Este produto, denominado de "inibidor" I-(H), foi cindido pela tripsina, resultando num pequeno fragmento "F1" (LAPRESLE and WEBB, 1965), que portava um determinante antigênico. Essas evidências reforçaram os conceitos básicos de determinantes antigênicos e da sua multiplicidade numa mesma molécula de antígeno proteico.

O estudo comparativo entre as Sôro-Albuminas Humana, Bovina e Equina evidenciou a existência de um motivo antigênico comum às três albuminas (RANGEL, 1967). Esse motivo antigênico comum é constituído por vários determinantes antigênicos, e os anticorpos capazes de reagir com esses determinantes são mais ávidos pelo antígeno homólogo / que pelo antígeno heterólogo (RANGEL, 1965). Esses dados sugerem que as estruturas envolvidas nessas reações cruzadas são apenas semelhantes mas não idênticas entre si, favorecendo a hipótese de LANDSTEINER & VAN DER SHEER (1940) segundo a qual os determinantes envolvidos nas reações cruzadas não são idênticos mas apenas estruturalmente similares.

A Sôro-Albumina Bovina, é uma proteína globular constituída por uma única cadeia polipeptídica; contendo cerca de 17 pontes dissulfeto; com um coeficiente de sedimentação 4.41s; de peso molecular em torno de 67.000 (PUTNAM, 1965). A proteólise desta albumina com quimiotripsina permitiu a PORTER (1957) isolar um fragmento de peso molecular 12.000 sendo descrita a sua composição de aminoácidos. Os digestos pepsínicos da SAB (PETERS, 1964) forneceram 2 peptídeos que fôram obtidos por variadas precipita-

ções do digesto com ácido tricloracético a diferentes concentrações.

WEBER e YOUNG (1964), de posse das informações / descritas por PORTER (1957) e PETERS (1964), degradaram a SAB com a pepsina em condições controladas de digestão. Os autores tinham por base o pressuposto de que na digestão enzimática realizada nessas condições, as partes globulares da molécula de albumina seriam provavelmente separadas por repulsão eletrostática, ficando as ligações peptídicas flexíveis, especificamente susceptíveis à ação da protease. Destes experimentos foram obtidas duas frações de diferentes pesos moleculares e diferente composição de aminoácidos, o que permitiu avançar a hipótese de que na molécula original da SAB um segmento globular de peso molecular 30.000 estaria unido por ligações peptídicas com 2 ou mais segmentos de pesos moleculares 13.000. Esses e outros dados têm proporcionado um estudo vasto desta albumina do ponto de vista imunoquímico.

Não se tem informações sobre a importância da degradação intra-celular do antígeno proteico no mecanismo / da produção de anticorpos. A participação na resposta imune de fragmentos que aparecem ao curso da digestão enzimática de antígenos proteicos, foi alvo de discussão durante muitos anos. CAMPBELL and GARVEY (1958) emitiram a hipótese de que estes fragmentos poderiam conter determinantes / antigênicos que não estariam na superfície da molécula nativa, mas que seriam expostos por ocasião do processamento do antígeno "in vivo". Contudo, a possível presença de anticorpos em soros preparados contra proteínas degradadas que não eram encontrados nos soros preparados contra a proteína nativa, foi considerada como um artefato da digestão realizada "in vitro" (LAPRESLE et al., 1959).

A presença desses determinantes internos tem sido sugerida por alguns autores. Utilizando esquemas especiais de imunização, ISHIZAKA et al., (1959), obteve soros anti-SAB que após serem absorvidos com a SAB nativa, deram ring-tests positivos com os digestos pepsínicos da SAB. Reoxidações moleculares espontâneas da SAB reduzida total ou parcialmente, promoveram o aparecimento de monômeros termodinamicamente estáveis que diferiram significativamente da conformação do monômero de albumina nativa, possuindo inclusive maior reatividade antigênica (PETERS and GOETZL, 1959). Anticorpos naturais HR (homoreativos) foram demonstrados por RICHIE and MANDY, (1970), que reagem especificamente com determinantes internos da IgG autóloga ou homóloga, presentes nos fragmentos obtidos da degradação enzimática.

A possibilidade da participação da catepsina D no catabolismo dos antígenos proteicos tem sido discutida (LAPRESLE and WEBB, 1960). Contudo não existem dados que comprovem que esta enzima desempenha um papel importante / neste catabolismo, ou na resposta imunológica a esses antígenos.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de obter informações sobre a atividade proteolítica da catepsina D frente à Sôro-Albumina Bovina, através o estudo imunoquímico dos digestos, visando sobretudo detectar a presença nos soros anti-SAB de anticorpos contra determinantes internos possivelmente existentes nesse antígeno.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTIÍGENOS: As Sôro-Albuminas Humana e Bovina (SAH, SAB) / cristalinas, foram obtidas da "Pentex" Kankakee Illinois Inc. A Sôro-Albumina Equina (SAE) foi cristalizada a partir de sôro de cavalos normais, pelo método de ADAIR e ROBINSON, conforme instruções fornecidas por KABAT & MAYER (1958).

ENZIMAS: A catepsina D foi purificada a partir do pó acetônico de baços de coelhos por precipitação a baixa temperatura, através o uso de solventes apolares (TOLEDO et al., 1972) e posterior cromatografia em DEAE-Celulose (DAWOOD, 1973). As preparações utilizadas nestes experimentos continham 100 U/mg de proteína.

A Pepsina cristalina foi adquirida da Worthington Biochemical Corp.

IMUNE-SOROS: Os imune-soros anti-SAB, anti-SAE, anti-SAH, anti-F1, anti-F2 e anti-F3, foram preparados em coelhos empregando-se o esquema de imunização descrito por RANGEL (1965) para a obtenção dos soros anti-SAB - duas injeções de 5,0 mg do antígeno em 1 ml de adjuvante incompleto de FREUND, foram feitas num intervalo de 15 dias: a primeira/ dividida em duas porções foram aplicadas nos gânglios popliteais; a segunda foi aplicada no dorso. Após 15 dias da segunda inoculação, injeções intravenosas de 2,5 mg dos antígenos precipitados pelo alume de potássio foram feitas em dias alternados durante 15 dias. Os animais foram sangrados após 1 semana da última inoculação intravenosa. Outros coelhos foram imunizados para a obtenção de sôro

anti-SAB, seguindo-se o esquema de ISHIZAKA (1959) - Injeções de 10 mg/ml de SAB, dissolvida em 1 ml de salina fisiológica por via intravenosa, feitas durante 8 semanas em dias alternados. Após 7 dias da última inoculação, os coelhos foram sangrados.

DIGESTÃO DA SAB: Partidas de 2 gramas de SAB dissolvidas em 100 ml de salina fisiológica foram misturadas a 500 U / de catepsina D. A mistura foi ajustada ao pH 3.5 e submetida à temperatura de 45°C durante 1 hora.

A digestão da SAB pela pepsina foi realizada de acordo com as instruções descritas por ISHIZAKA (1959).

OBTENÇÃO DO FRAGMENTO "INIBIDOR" I-(H): O fragmento "inibidor" I-(H) foi obtido a partir dos digestos da SAH pela catepsina D, seguindo-se as instruções fornecidas por LAPRESLE et WEBB (1960).

PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO I-(B): Esta fração foi obtida da SAB digerida pela catepsina D, cromatografada em DEAE-Celulose de acordo com as informações descritas por RANGEL (1970).

CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE: As cromatografias em DEAE-Celulose foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas por SOBER et al., (1956). Os tampões usados nessas cromatografias, consistiam de soluções de fosfatos primário e secundário de potássio, nas proporções exigidas para a obtenção do pH e força iônica requerida pela experiência.

DOSAGEM DE PROTEINAS: O teor de proteínas foi determinado pelo reativo do biureto segundo WEICHSELBAUM (1945) e/ou pela absorbância nos comprimentos de onda de 280 nm e

220 nm de um espectrofotômetro Zeiss PMQ III, utilizando - se cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

ANÁLISE ELETROFORÉTICA: O ensaio eletroforético foi realizado de acordo com as instruções de GRABAR e WILLIAMS / (1955), nas seguintes condições: gelose a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8.4 distribuída em lâminas de vidro de 7,5 x 2,5 cm, resultando numa espessura de 3 mm. Foi utilizada uma diferença de potencial de 10 volts/cm durante 1 hora.

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

PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELIFICADO: As técnicas de imunodifusão foram realizadas em gel de ágar a 1% em meio salino/isotônico de pH 7.2-7.3 segundo OUCHTERLONY (1958). As imunoeletroforeses foram realizadas conforme as indicações de GRABAR e BURTIN (1964) e empregando-se a microtécnica descrita por SCHEIDGER (1955) em placas de vidro 7,5 x 2,5 cm contendo uma camada de 3 mm de gel de ágar a 1% em tampão/veronal 0,05 M pH 8.4, gradiente de potencial 10 volts /cm durante 1 hora.

REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA E INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO: Na reação de hemaglutinação passiva, hemácias/ de carneiro taninizadas segundo BOYDEN (1951), foram sensibilizadas com antígenos de acordo com as instruções de BORDUAS e GRABAR (1953) com soluções das amostras numa concentração de 100 ug de proteína para cada mililitro de uma

suspensão de hemácias a 2,5%. Porções de 0,05 ml dessas hemácias eram misturadas a 0,5 ml dos imune-soros diluídos e incubadas à temperatura ambiente. A leitura era feita após 2 e 24 horas.

A reação de inibição da hemaglutinação foi feita, utilizando-se titulações em bloco onde diferentes diluições dos imune-soros eram tratadas frente a diferentes concentrações do inibidor. Estes inibidores dissolvidos em 0,2 ml de salina fisiológica, foram adicionados a 0,2 ml das diferentes diluições dos imune-soros, e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após esse tempo, hemácias sensibilizadas com o antígeno foram adicionadas. A leitura foi feita após 2 e 24 horas de incubação à temperatura ambiente.

RESULTADOS

1 - Determinação das Condições Ótimas de Digestão

Porções de 2 gramas de SAB dissolvidas em 100 ml de salina fisiológica foram misturadas a 500 U de catepsina D. A mistura foi ajustada a pH 3.5 e submetida a diferentes temperaturas por períodos variados de tempo com o fito de se determinar as condições ótimas de digestão.

Após o período de incubação, o digesto foi fracionado ajustando-se o pH da mistura a pH 4.5. Nessas condições formou-se um precipitado (fração F1) que foi separado do sobrenadante (fração F2) por centrifugação.

A fração F1 foi redissolvida em salina fisiológica e ajustada a pH 7.0 completando-se o volume para 30 ml.

A fração F2 ajustada a pH 7.0 foi concentrada pelo processo da ultrafiltração, utilizando-se membranas "Diaflo" PM 10 (Amicon), de modo a reduzir seu volume a 1/5 do original. Desse tratamento resultou uma fração retida na membrana filtrante (fração F2-C) e uma fração ultrafiltrada (fração F3).

O rendimento em teor proteico das frações obtidas na digestão realizada a 45°C foi praticamente invariável, tanto para a fração F1 como para a fração F2-C. Todavia a fração F3 sofreu variações dependentes do tempo de incubação (tabela 1).

A análise das frações obtidas, por imunodifusão, eletroforese e imunoeletroforese demonstram que essas frações contêm diferentes números de componentes com vários

sistemas precipitantes (figuras 1, 2, 3).

Tabela 1 - Rendimento em teor de proteínas das frações do digesto de SAB pela catepsina D, obtidas nas diferentes condições.

Tratamento	Frações (mg prot./ml)		
	<u>F1</u>	F2-C	<u>F3</u>
37°C, 8 horas	7,5	75,0	0,6
45°C, 1 hora	11,3	47,0	1,2
45°C, 2 horas	12,0	51,0	1,5
45°C, 4 horas	11,0	51,0	2,1
45°C, 8 horas	13,3	49,0	1,8

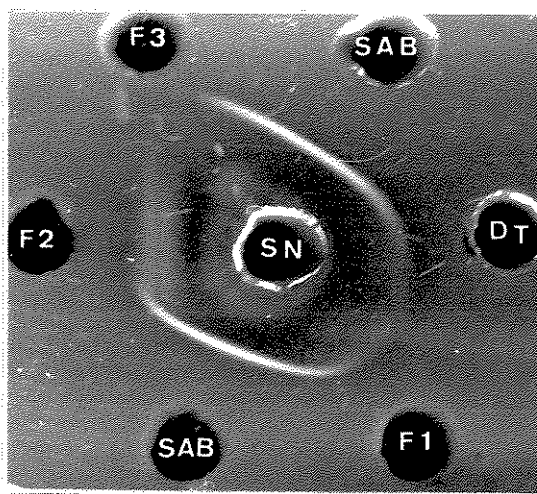


Figura 1 - Análise por imunodifusão das frações F1, F2 e F3 (500 ug/ml de proteína) obtidas do digesto de SAB realizado a 45°C durante 1 hora, frente ao imune-sôro anti-SAB (SN). DT = Digesto Total.

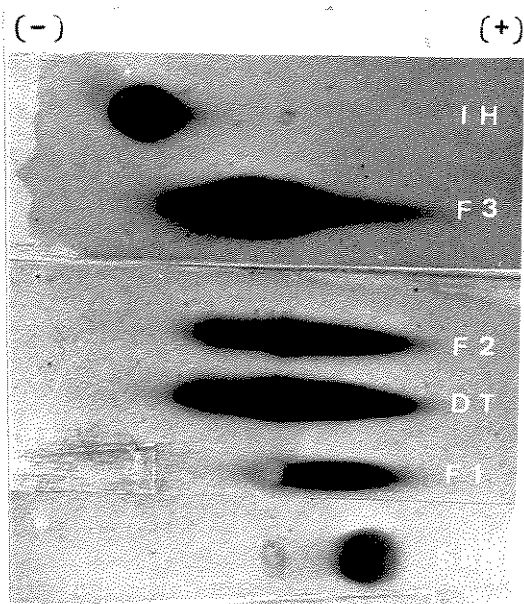


Figura 2 - Análise eletroforética das diversas frações obtidas a partir dos digestos da SAB pela catepsina D. Para comparação, foram incluídas amostras do fragmento I-(H) e da SAB.

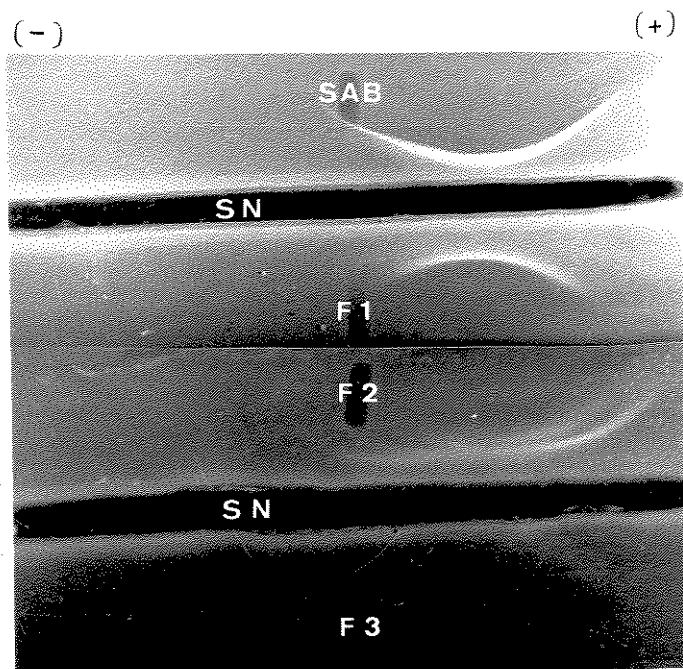


Figura 3 - Análise imunoeletroforética das frações F1, F2 e F3 comparadas com a SAB, frente ao imune-sêro SN (anti-SAB).

Na figura 4 acha-se representada uma análise eletroforética comparativa das diversas frações F3 originadas das variadas condições de digestão da SAB pela catepsina D. Pode-se verificar naquela figura, que a fração F3 obtida / da digestão realizada a 45°C durante 1 hora, apresenta / um componente principal em maior concentração, situado no ponto de aplicação; e vários outros componentes em baixa concentração. Pode-se verificar também que a concentração do componente principal decresce enquanto a dos outros aumenta, a medida que o tempo de digestão aumenta.

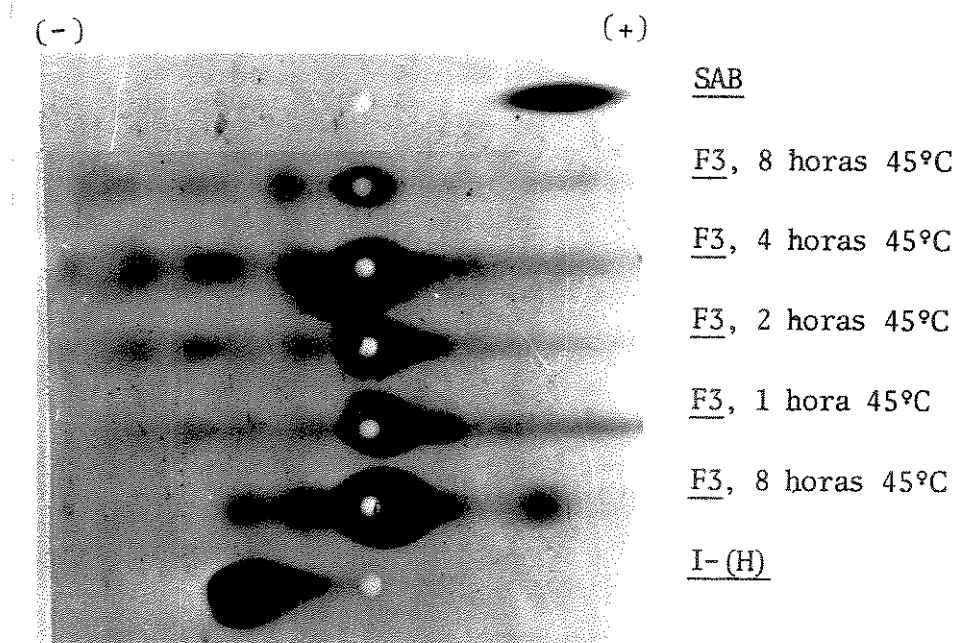


Figura 4 - Análise eletroforética comparativa das frações F3 obtidas / nas diferentes condições de digestão. Para comparação foram incluídas amostras do fragmento I-(H) e da SAB.

As frações F3 obtidas das variadas condições de digestão, não precipitaram frente aos imune-soros anti-SAB. Contudo foram capazes de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema anti-SAB x I-(B) (tabela 2).

Tabela 2 - Inibição da reação de hemaglutinação do sistema anti-SAB x I-(B) pela fração F3 obtida da digestão da SAB pela catepsina D, realizada a 45°C durante 1 hora.

Inibidor	Dose (ug)	Diluições do sôro a 1:							Contrôles*		
		500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	C-1	C-2	C-3
<u>I-(B)</u>	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-
	12	+	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-
<u>F3</u>	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-
	25	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	-	-	-	-	-
	12	+	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluido a 1:500

C-3 = Hemácias + sôro diluido a 1:500

Ademais as frações F3 foram capazes de sensibilizar hemácias taninizadas. Essas hemácias sensibilizadas / testadas com imune-soros anti-SAB, anti-SAE ou anti-SAH, exibiram reações positivas nos testes de hemaglutinação passiva (tabela 3).

Tabela 3 - Reação de hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas e sensibilizadas com 100 ug da fração F3 obtida da digestão / de SAB realizada a 45°C durante 1 hora, frente aos imune-soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH.

Soros	Diluições dos soros a 1:							Contrôles *		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
anti- <u>SAB</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
anti- <u>SAE</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
anti- <u>SAH</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluido a 1:100

C-3 = Hemácias + sôro diluido a 1:100

Tendo em vista que a fração F3 obtida a partir da digestão de SAB pela catepsina D realizada a 45°C durante 1 hora pareceu menos complexa, essas condições foram fixadas como condições padrões para a digestão da SAB e obtenção das diversas frações.

2 - Fracionamento do Digesto

Visando-se obter em larga escala as diversas frações do digesto, várias partidas de 2 gramas de SAB foram digeridas nas condições padronizadas e fracionadas como anteriormente indicado. A representação média do rendimento das diversas frações está exposto na tabela 4.

Tabela 4 - Resultado do fracionamento do digesto da SAB obtido nas condições padronizadas de digestão. Cálculos realizados para 1 grama de proteína.

Frações	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)
<u>SAB</u>	50	20,0
<u>F1</u>	15	16,0
<u>F2</u>	48	14,0
<u>F2-C</u>	8	75,0
<u>F3</u>	40	1,8

2.1 - Fração F1

A fração F1 que representa 25% do digesto total, constitui um componente aparentemente homogêneo quando examinado por eletroforese (figura 2).

Essa fração, obtida de diferentes partidas, foi utilizada para imunizar coelhos seguindo-se o esquema de imunização descrito por RANGEL (1965).

Experiências de imunodifusão foram realizadas utilizando-se estes soros anti-F1 e mais outros 16 soros / anti-SAB dos quais 10 foram obtidos segundo o esquema de RANGEL (1965) e 6 foram obtidos segundo o esquema de ISHIZAKA (1959).

Os dados obtidos por imunoeletroforese (figura 3), mostram um componente principal com mobilidade ligeiramente anódica e outro componente, antigenicamente relacionado com o principal.

Por imunodifusão (figura 5), observa-se a presença de várias faixas de precipitação, formando aparentemente um contínuo de sistemas interrelacionados. Em todas as experiências realizadas, mesmo quando os soros anti-F1 eram utilizados, observou-se sempre uma reação mais intensa com a SAB do que com o F1.

Em concordância com esses dados, as curvas de precipitação (figura 6) e tabelas 5 e 6 não revelam diferenças significativas na quantificação dos dois sistemas.

Os soros anti-SAB e anti-F1 quando absorvidos com a SAB ou F1 não reagem mais com um ou outro antígeno. Esses soros absorvidos foram igualmente testados com a SAB degradada pela pepsina (ISHIZAKA, 1959). Nenhuma reação de precipitação foi observada nessas condições.

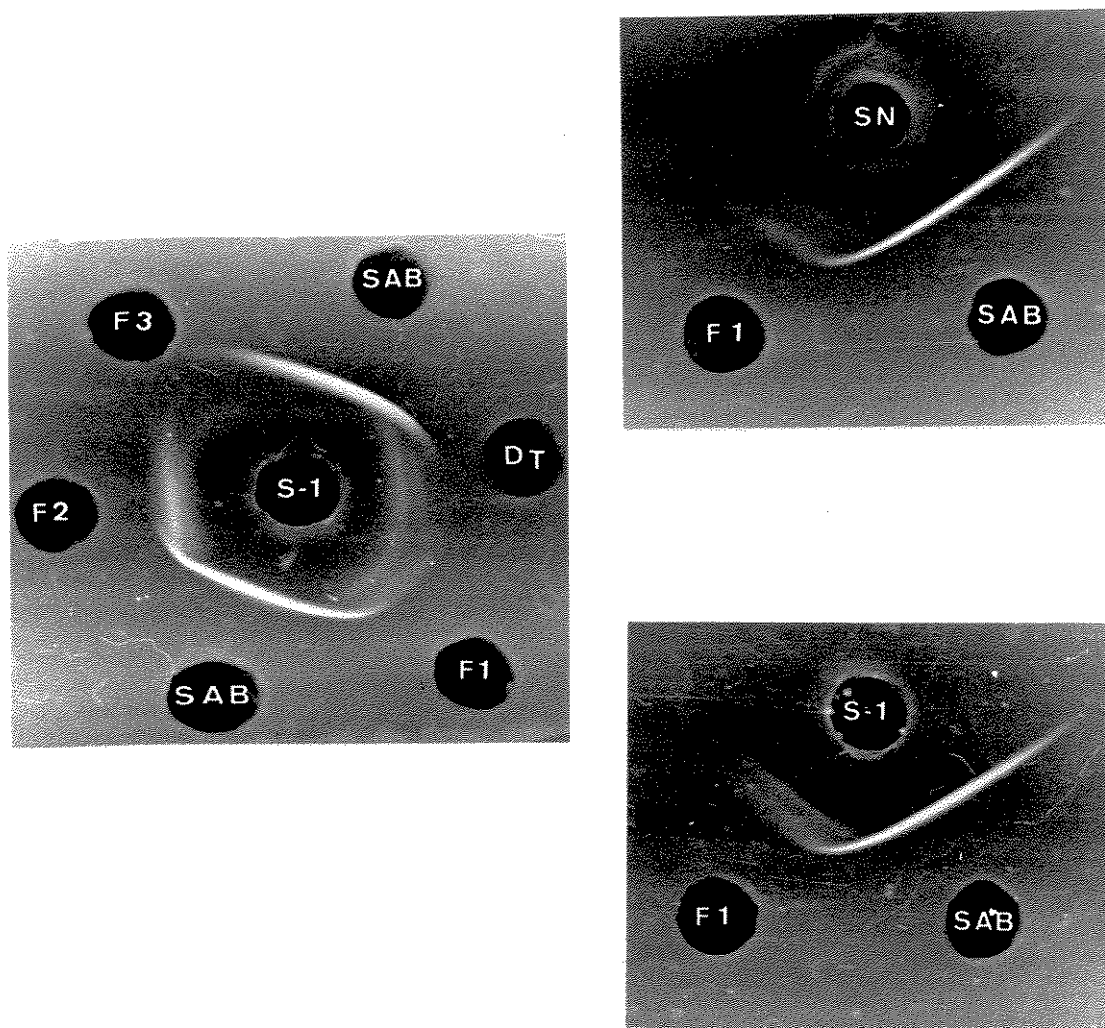


Figura 5 - Imunodifusão comparativa entre a fração F1 e SAB (500 ug / ml de proteína) frente aos soros S1 (anti-F1) e SN (anti - SAB).

Tabela 5 - Dados quantitativos da precipitação específica no sistema F1 x anti-F1. Adição de doses crescentes de F1 a 1 ml do sôro. Valores expressos em mg.

Ag	Precipitado (Ag + Ac)	Ac	Teste dos Sobrenadantes c/		
			<u>F1</u>	anti- <u>F1</u>	<u>SAB</u>
0,025	1,00	0,925	+	-	+
0,05	1,50	1,45	+	-	+
0,10	2,50	2,40	+	-	+
0,15	3,00	2,85	+	-	+
0,20	3,50	3,30	+	-	+
0,25	3,75	3,50	+	-	+
0,30	4,00	3,70	-	-	-
0,40	4,40	4,00	-	-	-
0,50	4,40	-	-	+	-
0,80	3,50	-	-	+	-
1,00	3,00	-	-	+	-

Tabela 6 - Dados quantitativos da precipitação específica no sistema SAB x anti-F1. Adição de doses crescentes de SAB a 1 ml de sôro. Valores expressos em mg.

Ag	Precipitado (Ag + Ac)	Ac	Teste dos Sobrenadantes c/		
			<u>SAB</u>	anti- <u>F1</u>	<u>F1</u>
0,025	1,25	1,225	+	-	+
0,05	2,00	1,95	+	-	+
0,10	2,75	2,65	+	-	+
0,15	3,50	3,35	+	-	+
0,20	4,00	3,80	+	-	+
0,25	4,50	4,25	+	-	+
0,30	4,30	4,00	-	-	-
0,40	4,25	-	-	-	-
0,50	3,70	-	-	+	-
0,80	3,00	-	-	+	-
1,00	2,00	-	-	+	-

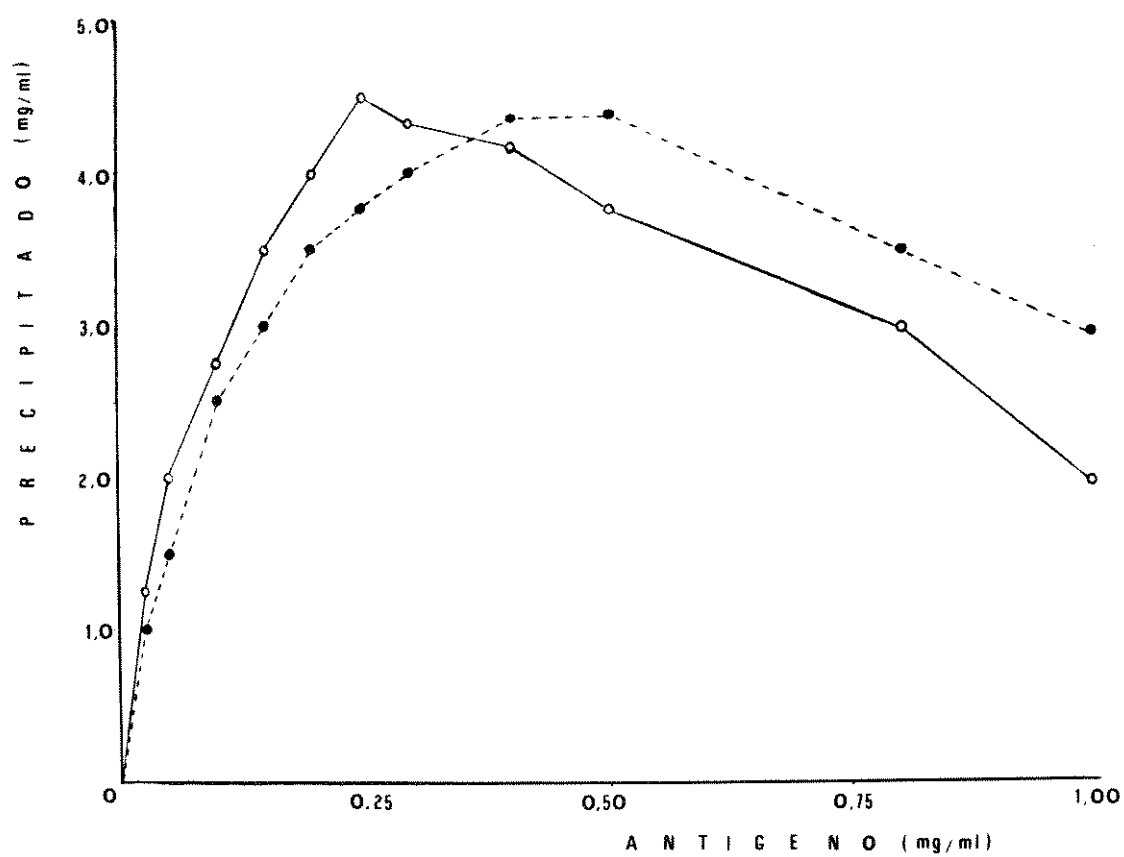


Figura 6 - Curvas de precipitação de um sôro anti-F1 frente a SAB (o—o—o—o) ou F1 (o - - o - - o - -).

2.2 - Fração F2

A fração F2, representando cerca de 65% do digesto total em teor de proteínas, foi analisada por eletroforese (figura 2) onde ficou demonstrado ser bem mais heterogênea que a fração F1. Na imunoeletroforese foram reveladas pelo menos quatro faixas de precipitação (figura 3).

Esta fração foi utilizada para preparar soros anti-F2 em coelhos, seguindo-se o mesmo esquema empregado para a obtenção de soros anti-F1. Conjuntamente com os soros anti-SAB já descritos, estes soros anti-F2 foram utilizados para a análise desta fração.

As experiências de imunodifusão mostraram sempre uma figura de identidade quando a fração F2 foi comparada com a SAB frente aos diversos soros anti-F2 ou anti-SAB. Embora apareçam várias faixas de precipitação a partir de F2; e um constante interrelacionamento dessas faixas com a faixa de precipitação dada pela SAB, a intensidade de reação foi sempre acentuada quando qualquer dos soros era testado com a SAB (figura 7).

Embora a análise por precipitação quantitativa demonstrada nas tabelas 7 e 8 e figura 8 de um soro anti-F2 frente a SAB ou a F2 tenha comprovado a heterogeneidade da fração F2, os experimentos de absorção de soros anti-SAB e anti-F2 com os respectivos antígenos, demonstraram inexistirem anticorpos excedentes para reagirem com um ou outro antígeno. Ademais nenhuma reação de precipitação foi observada quando estes soros absorvidos foram igualmente testados com a SAB degradada pela pepsina (ISHIZAKA, 1959).

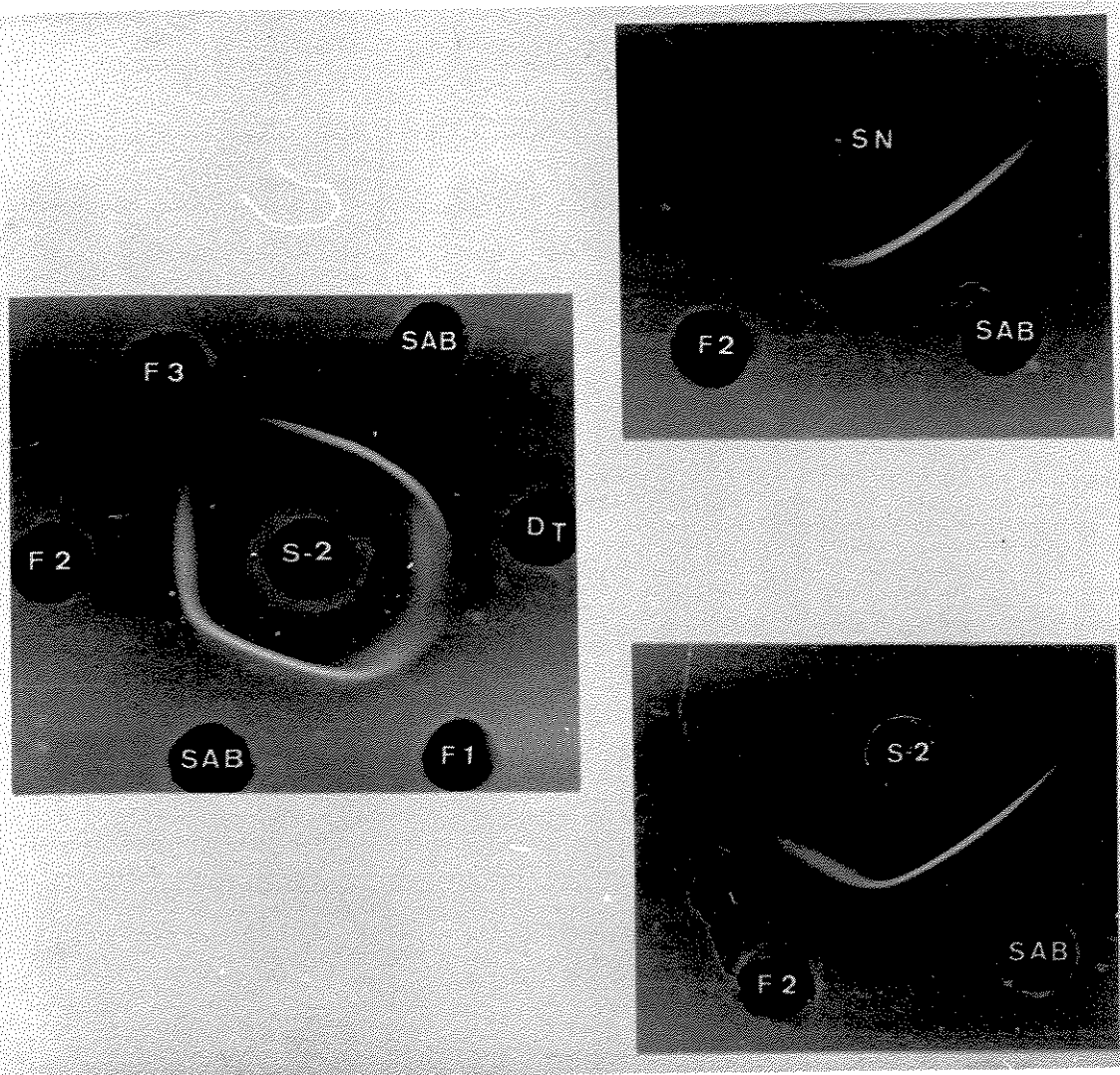


Figura 7 - Imunodifusão comparativa entre a fração F2 e SAB (500 ug / ml de proteína) frente aos soros S2 (anti-F2) e SN (anti - SAB).

Tabela 7 - Dados quantitativos da precipitação específica no sistema F2 x anti-F2. Adição de doses crescentes de F2 a 1 ml de sôro. Valores expressos em mg.

Ag	Precipitado (Ag + Ac)	Ac	Teste dos Sobrenadantes c/		
			<u>F2</u>	anti- <u>F2</u>	<u>SAB</u>
0,05	2,00	1,95	+	-	+
0,10	2,50	2,40	+	-	+
0,20	4,00	3,80	+	-	+
0,40	6,00	5,60	+	+	+
0,80	8,00	7,20	-	+	+
1,20	8,50	-	-	+	-
1,60	6,00	-	-	+	-
1,80	5,00	-	-	+	-
2,00	3,50	-	-	+	-
2,20	3,50	-	-	+	-
2,40	3,00	-	-	+	-

Tabela 8 - Dados quantitativos da precipitação específica no sistema SAB x anti-F2. Adição de doses crescentes de SAB a 1 ml de sôro. Valores expressos em mg.

Ag	Precipitado (Ag + Ac)	Ac	Teste dos Sobrenadantes c/		
			<u>SAB</u>	anti- <u>F2</u>	<u>F2</u>
0,05	2,00	1,95	+	-	+
0,10	3,00	2,90	+	-	+
0,20	5,00	4,80	+	-	+
0,40	7,50	7,10	+	-	+
0,80	9,50	-	-	-	-
1,20	10,00	-	-	+	-
1,60	9,00	-	-	+	-
1,80	9,00	-	-	+	-
2,00	8,70	-	-	+	-
2,20	8,50	-	-	+	-
2,40	8,20	-	-	+	-

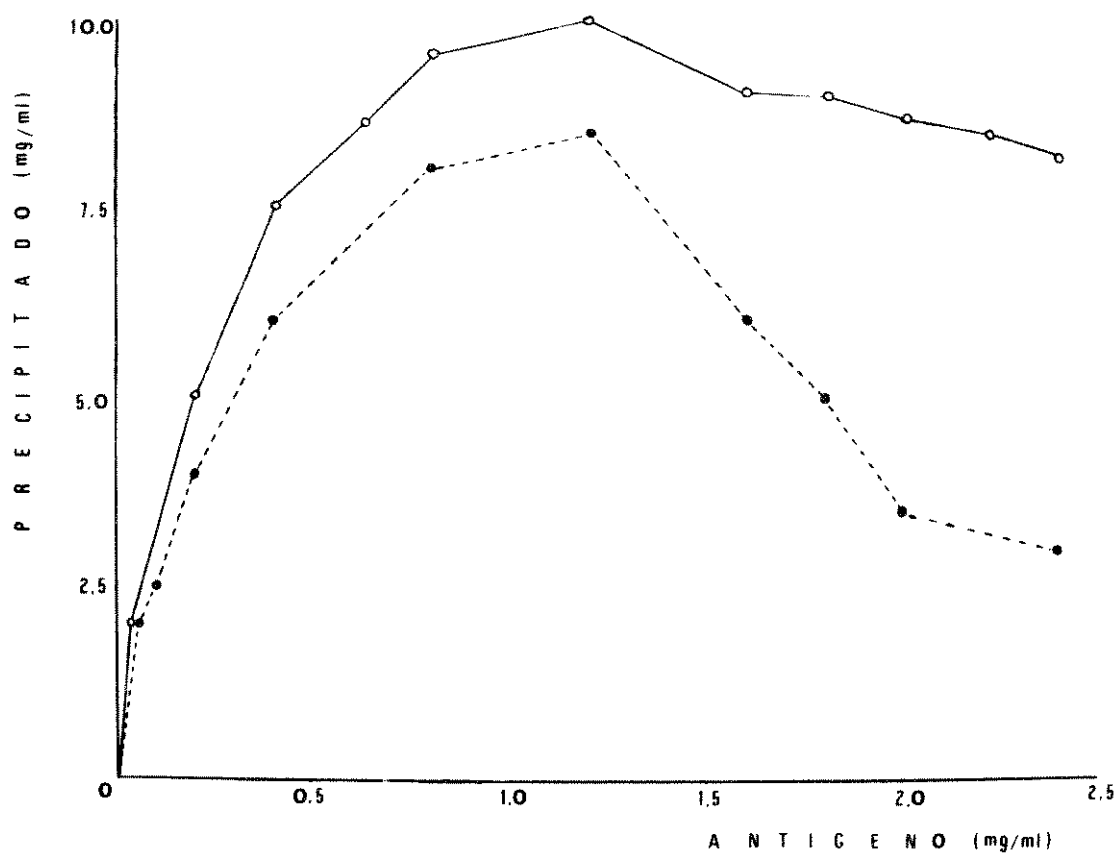


Figura 8 - Curvas de precipitação de um sôro anti-F2 frente a SAB (o—o—o—o) ou a F2 (o - - o - - o - -).

2.2.1 - Fracionamento de F2

Tendo em vista a composição heterogênea da fração F2, contendo provavelmente pequenos fragmentos com atividade imunológica, esta fração foi analisada por cromatografia em DEAE-Celulose, seguindo-se as informações descritas por RANGEL (1970) para a obtenção de I-(B).

Uma amostra de 15 ml de uma solução contendo a fração F2 numa concentração proteica de 24 mg/ml foi cromatografada em uma coluna de DEAE-Celulose de dimensões / 2,5 x 70 cm, equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 8.0. Após aplicação da amostra, a coluna foi inicialmente lavada com o tampão de equilíbrio regulando-se o seu fluxo para 1 ml/min., sendo coletados 5 ml em cada tubo. Após o volume de 550 ml ter sido eluído, foi conectada à coluna uma mistura de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M. A absorbância dos eluatos foi medida nos comprimentos de onda de 280 nm e 220 nm.

O perfil cromatográfico (figura 9) mostra que no comprimento de onda 280 nm foram eluídas apenas duas / sub-frações F2-I e F2-III, tendo sido detectada uma outra sub-fração F2-II no comprimento de onda de 220 nm aparentemente portanto, isenta de tirosina e triptofano. As frações F2-I e F2-II foram eluídas com o tampão inicial, enquanto a fração F2-III foi eluída na lavagem da coluna / com a mistura de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M.

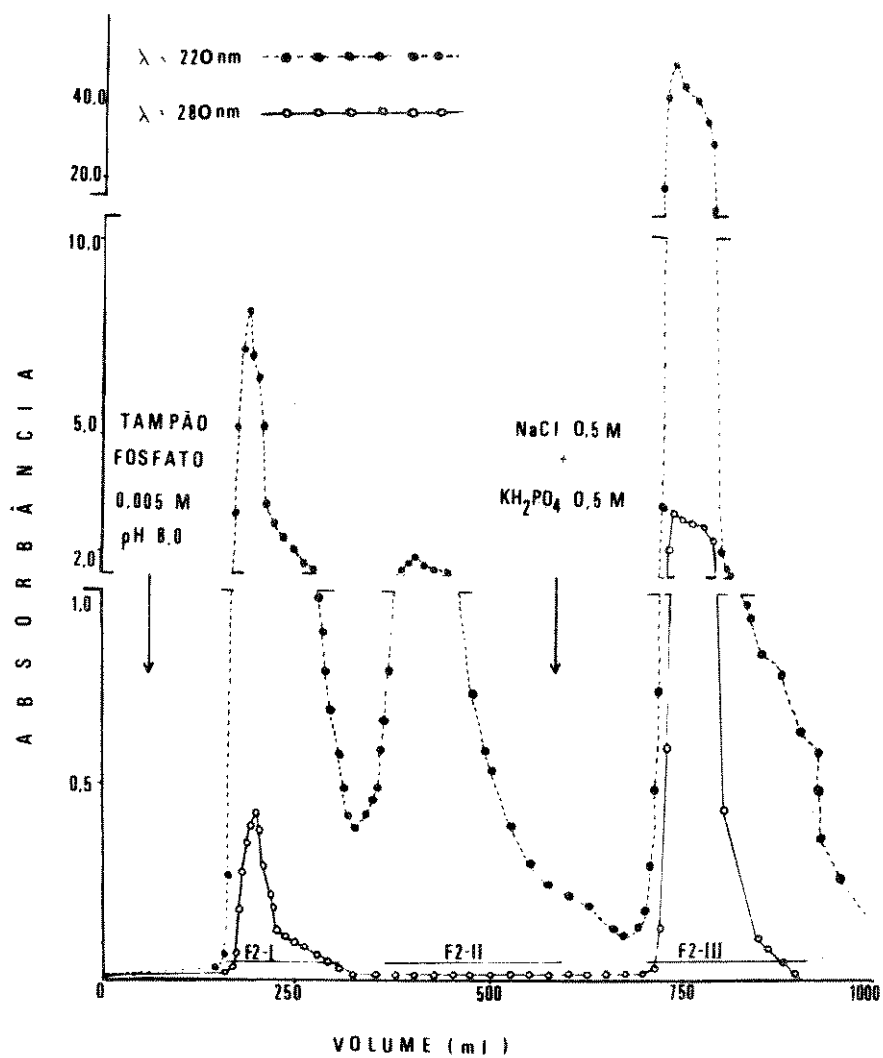


Figura 9 - Cromatografia da fração F2 em coluna de DEAE-Celulose.

Análise das Sub-Frações de F2

Na tabela 9, estão os resultados da determinação do teor de proteínas das sub-frações de F2 e o seu percentual rendimento por cada grama de SAB digerida.

Tabela 9 - Determinação do teor de proteínas das sub-frações F2-I, F2-II e F2-III, e o rendimento percentual por grama de SAB digerida.

Fração	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Rendimento (%) por grama de <u>SAB</u> digerida
<u>F2</u>	15	24,0	+ 65,0
<u>F2-I</u>	6	12,0	7,2
<u>F2-II</u>	6	5,0	3,0
<u>F2-III</u>	6	87,0	52,2

Porções das sub-frações F2-I, F2-II e F2-III foram dialisadas e utilizadas para análise eletroforética ; testes de precipitação e testes de inibição da reação de hemaglutinação passiva.

A eletroforese em gel de ágar (figura 10), demonstra a existência de alguns componentes das sub-frações F2-I e F2-II que apresentam mobilidades eletroforéticas comparáveis àquela de F3. A sub-fração F2-III parece ser constituída por componentes de mobilidades próximas à da molécula de SAB.

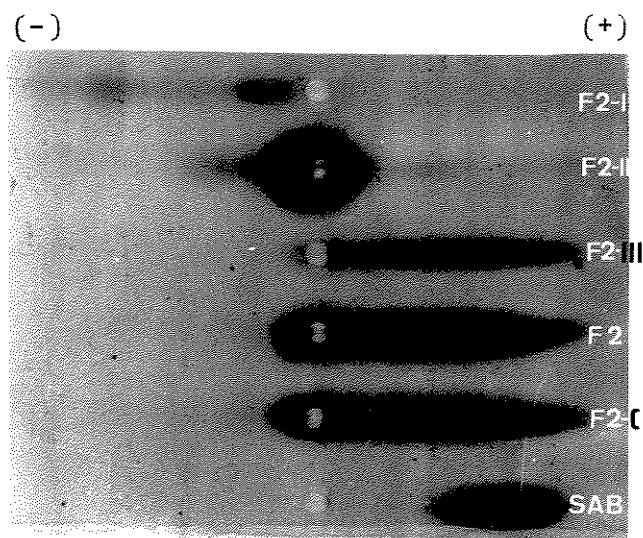


Figura 10 - Análise eletroforética das sub-frações F2-I, F2-II e F2-III (10 mg/ml de proteína). Para comparação foram incluídas amostras de F2, F2-C e SAB.

Nos testes de imunodifusão em gel de ágar (figura 11), apenas a sub-fração F2-III precipitou frente aos imune-soros anti-SAB. Com o imune-soro anti-F3, uma delgada faixa de precipitação é também observada com as sub-frações F2-I e F2-II.

Embora as sub-frações F2-I e F2-II não tenham precipitado frente aos imune-soros anti-SAB, foram capazes de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB (tabela 10).

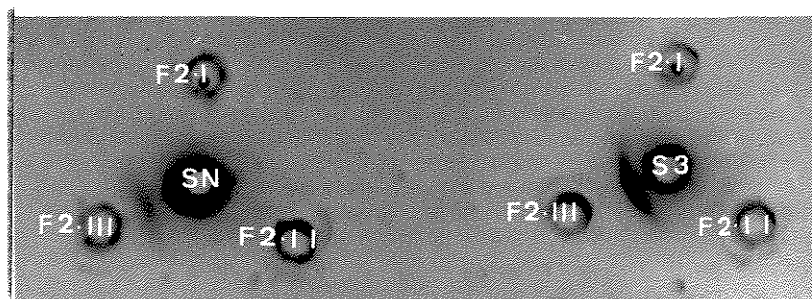


Figura 11 - Análise por imunodifusão das sub-frações F2-I, F2-II e F2-III (500 ug/ml de proteína), frente aos soros anti-SAB e anti-F3.

Tabela 10- Inibição da reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB, com 100 ug das sub-frações F2-I e F2-II.

Frações	Diluições do sôro anti- <u>SAB</u> a 1:							Contrôles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>F3</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F2-I</u>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F2-II</u>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

- * C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina
 C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluido a 1:100
 C-3 = Hemácias + sôro diluido a 1:100

2.2.2 - Fracionamento de F2-C

Tendo em vista os resultados da análise das sub-frações F2-I e F2-II, a fração F2-C foi fracionada em condições idênticas do fracionamento de F2 considerando-se a hipótese de que apenas uma pequena porção dêesses pequenos fragmentos imunologicamente ativos tenham sido ultrafiltrados. Provavelmente por terem pesos moleculares em torno do limite da seletividade da membrana "Diaflo" PM 10 utilizada.

Amostras de 30 ml de uma solução contendo a fração F2-C numa concentração proteica de 70 mg/ml foram cromatografadas em coluna de DEAE-Celulose (2,5 x 80 cm) com tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 8.0, seguido de um gradiente linear de força iônica com tampões fosfato de potássio 0,05 M e 0,5 M no mesmo pH.-Após aplicação de / uma amostra, a coluna era lavada com tampão de equilíbrio até eluição convencional para a obtenção de I-(B) (RAN - GEL, 1970). No volume de 575 ml já eluido, era acoplado à coluna o gradiente mencionado, inicialmente com o tampão fosfato 0,05 M, lavando-se a coluna com 300 ml. Após eluição de 850 ml, era ligado o outro tampão fosfato 0,5 M no mesmo pH, o que permitia eluir o restante de material proteico que ainda estava retido na coluna. O fluxo de eluição era controlado para 1 ml/min., coletando-se amostras de 5 ml por tubo.

Como está demonstrado no perfil cromatográfico da figura 12, na lavagem da coluna onde fôra aplicada a amostra de F2-C com o tampão de equilíbrio, foram eluidas as sub-frações a, b, c, d, e e que são comparáveis com as sub-frações F2-I e F2-II eluidas nas mesmas condições. Por acoplamento do gradiente linear de força iônica com tampões fosfato de potássio no mesmo pH, foram eluidas as sub-frações f e g.

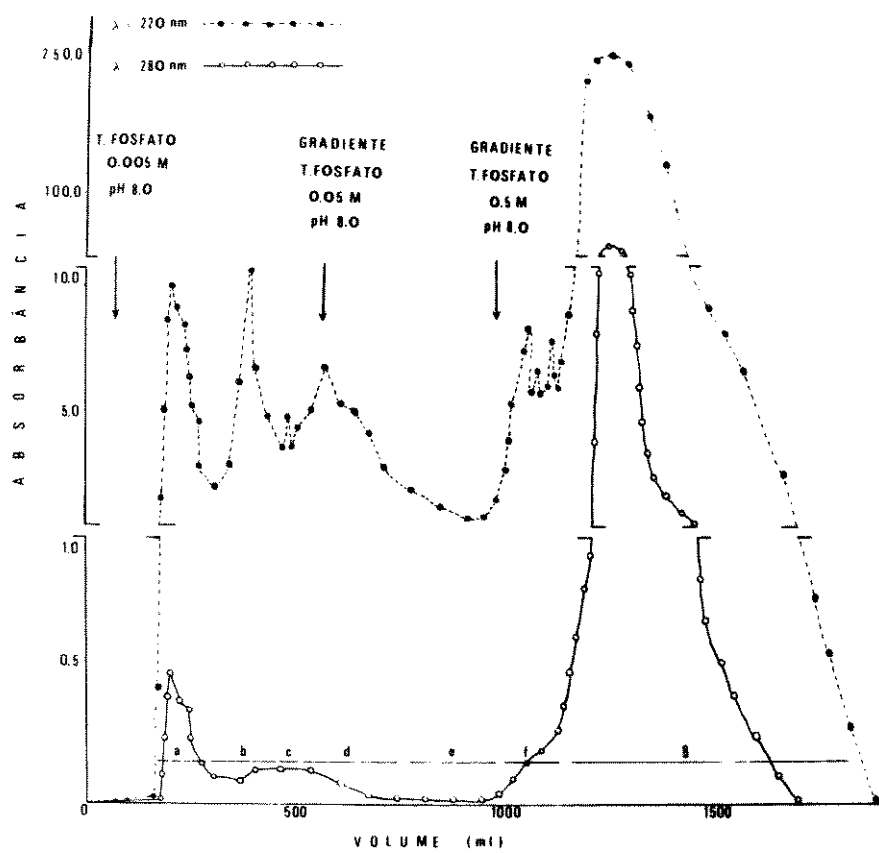


Figura 12 - Cromatografia da fração F2-C em coluna de DEAE-Celulose.

Análise das Sub-Frações de F2-C

Na tabela 11 estão os resultados da determinação do teor de proteínas nas sub-frações a - g, e o rendimento percentual por grama de SAB digerida.

Tabela 11- Resultado da determinação do teor de proteínas nas sub-frações a, b, c, d, e, f, e g, e o rendimento percentual por grama de SAB digerida.

Fração	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Rendimento (%) por grama de <u>SAB</u> digerida
<u>F2</u>	48	14,5	+ 65,00
<u>F3</u>	40	1,8	7,20
<u>F2-C</u>	8	75,0	60,00
<u>a</u>	5	2,2	1,10
<u>b</u>	5	2,7	1,35
<u>c</u>	1	2,1	0,21
<u>d</u>	5	6,4	3,20
<u>e</u>	5	2,6	1,29
<u>f</u>	5	5,7	2,85
<u>g</u>	5	84,0	42,00

A eletroforese em gel de ágar das sub-frações / de F2-C a - g (figura 13), demonstra a existência de componentes nessas sub-frações com mobilidades comparáveis a da fração F3.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

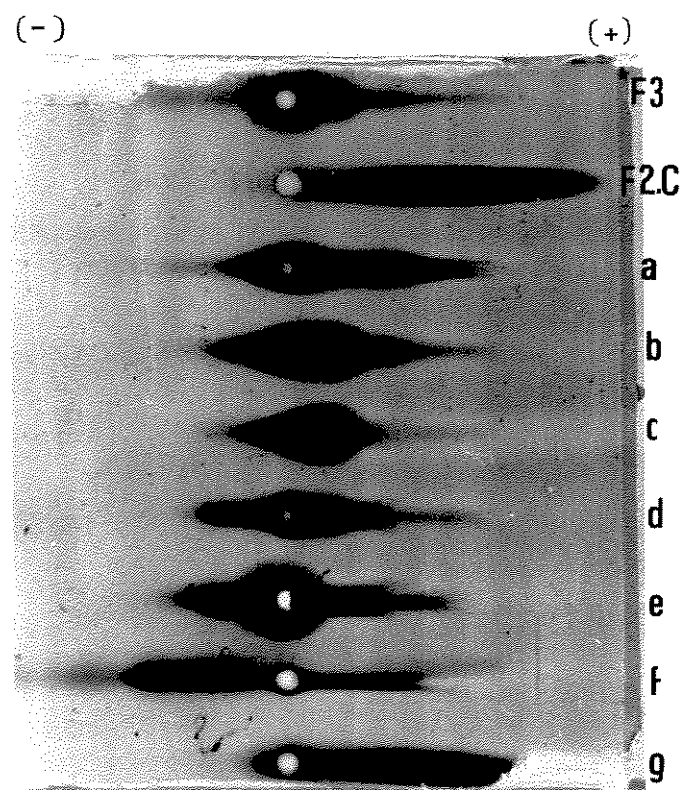


Figura 13 - Análise eletroforética das sub-frações a, b, c, d, e, f, e g obtidas do fracionamento de F2-C (10 mg/ml de proteína). Para comparação foram incluídas amostras de F2-C e de F3.

Nos testes de precipitação por imunodifusão em gel de ágar, apenas a sub-fração g foi capaz de precipitar frente aos imune-soros anti-SAB. Embora as sub-frações a - f não tenham precipitado, elas foram capazes de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB (tabela 12).

Tabela 12- Inibição da reação de hemaglutinação passiva do sistema / F3 x anti-SAB com 100 ug/ml das sub-frações a, b, c, d, e, e f, obtidas do fracionamento de F2-C. Uma inibição comparativa foi feita com a fração F3.

Inibidor	Diluições do sôro anti- <u>SAB</u> a 1:							Controles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>F3</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>a</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>b</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>c</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>d</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>e</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>f</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Salina</u>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluído a 1:100

C-3 = Hemácias + sôro diluído a 1:100

2.3 - Fração F3

A fração F3 obtida da concentração de F2 pelo processo de ultrafiltração, representou 5 - 7% do digesto total. Considerando a seletividade da membrana "Diaflo" PM 10, o peso molecular dos seus componentes foi estimado em 5.000 - 11.000.

Embora não tenha precipitado com os imune-soros anti-SAB, a atividade imunológica desta fração foi demonstrada através da capacidade de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema I-(B) x anti-SAB.

Uma outra propriedade da fração F3 foi a de sensibilizar hemácias taninizadas que eram aglutináveis pelos soros anti-SAB, anti-SAE ou anti-SAH.

A fração F3 obtida de diferentes partidas da SAB digerida nas condições padronizadas, foi utilizada para imunizar coelhos seguindo-se o mesmo esquema descrito para preparar os soros anti-F1 e anti-F2. Desta imunização foi obtido um soro anti-F3 que continha anticorpos precipitantes para esta fração, demonstrando a sua capacidade de induzir a formação de anticorpos, isto é, sua natureza imunogênica.

Este soro anti-F3 como demonstram os testes de imunodifusão (figura 14), precipitou com a fração F3 quando comparada com a SAB ou com as frações F1 ou F2 sem delimitar linhas de precipitação que caracterizassem uma identidade parcial, própria à proposição da existência de determinantes internos.

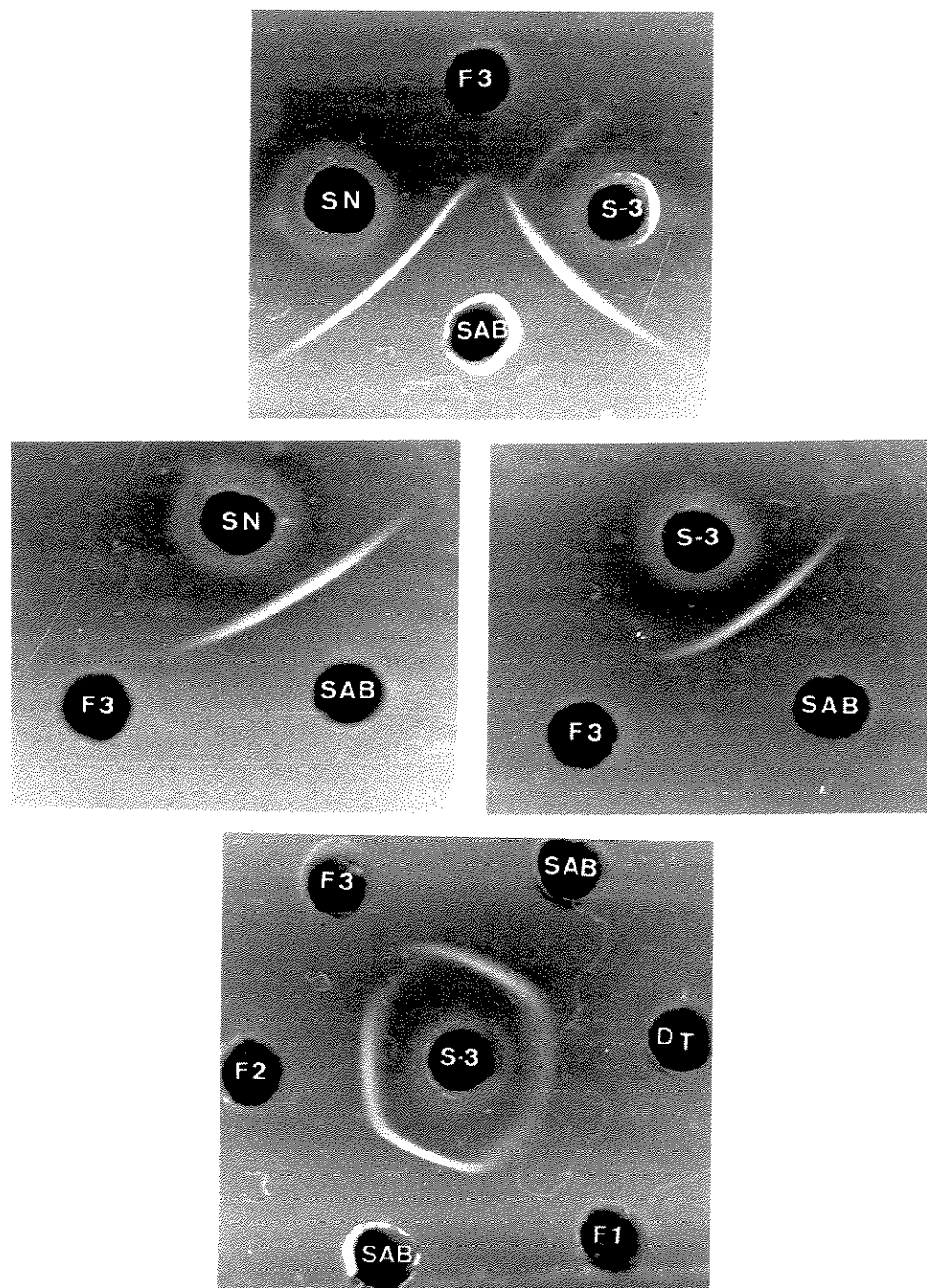


Figura 14 - Análise por imunodifusão da fração F3 comparada com a SAB, DT (Digesto Total), F1 ou F2, (500 ug/ml de proteína), / frente aos soros SN (anti-SAB) e S3 (anti-F3).

2.3.1 - Diálise Controlada da Fração F3

Com o objetivo de esclarecer se os fragmentos / constituintes da fração F3, responsáveis pela atividade imunológica eram dialisáveis ou não, foi realizado o seguinte experimento:

100 mg em teor proteico da fração F3 foram dissolvidos em 10 ml de água deionizada, e acondicionados em um saco de diálise que fôra extensivamente lavado. Utilizando-se um volume de 50 ml de água deionizada num balão, o saco contendo a amostra foi mergulhado no balão e deixado na geladeira com agitação magnética durante 2 horas. Medidas de pH, condutividade, e absorbância nos comprimentos de onda de 280 nm e 220 nm, foram feitas com esta água utilizada antes e após o tempo de diálise.

Na tabela 13, estão os dados referentes a êsse controle antes e após diálise, incluindo-se uma dosagem / de proteínas pelo reativo do biureto. Pelos dados apresentados, podemos verificar uma perda quase insignificante / da fração F3 com êsse tratamento, ao redor de 1/10 da amostra analisada.

Tabela 13 - Resultados da diálise controlada da fração F3.

	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	pH	Condutividade $\text{Koms/cm}^2/0,89 \text{ cm}^{-1}$	Absorbância	
					280nm	220nm
Água antes da diálise	50	0,0		700,00	0,00	0,00
Água após diálise	50	0,2		000,12	0,14	1,70

A atividade imunológica da fração F3 antes e após diálise foi analisada através da sua capacidade de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema I-(B) x anti-SAB (tabela 14). Na tabela 15, está demonstrada a propriedade dessa fração de sensibilizar hemácias taninizadas, usando-se uma solução contendo 100 ug/ml de F3 em teor proteico para cada mililitro da suspensão de hemácias de carneiro a 2,5%. Essas hemácias sensibilizadas com F3 foram aglutinadas com os soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH.

Tabela 14 - Resultado da inibição da reação de hemaglutinação do sistema I-(B) x anti-SAB com 100 ug da fração F3 antes e após diálise.

Inibidor	Dose (ug)	Diluições do sôro anti- <u>SAB</u> a 1:							Controles*		
		100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>I-(B)</u>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3</u> s/diálise	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3</u> diálisada	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina 0,15 M		+	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluído a 1:100

C-3 = Hemácias + sôro diluído a 1:100

Tabela 1 5- Reação de hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas e sensibilizadas com 100 ug da fração F3 antes e após diálise controlada, frente aos soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH. - O resultado foi idêntico para ambos experimentos.

Soros	Diluições dos soros a 1:							Contrôles *		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
anti- <u>SAB</u>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
anti- <u>SAE</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
anti- <u>SAH</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sêro diluido a 1:100

C-3 = Hemácias + sêro diluido a 1:100

2.3.2 - Fracionamento de F3

A fração F3 foi submetida a um fracionamento em coluna de DEAE-Celulose (2,5 x 70 cm) equilibrada com solução de fosfato dipotássico 0,005 M pH 8.4.

Uma amostra de 15 ml de uma solução contendo a fração F3 dialisada, numa concentração proteica de 12 mg/ml, foi aplicada e a coluna foi lavada com a solução de fosfato dipototássico 0,005 M pH 8.4, regulando-se o fluxo desta para eluir um volume de 1 ml/min. Foram coletadas amostras de 5 ml por tubo.

Após a eluição de 300 ml, foi acoplado à coluna um gradiente linear com tampão fosfato de potássio de mesma força iônica, mas no pH 8.0. Eluido um volume total de 675 ml, conectou-se à coluna uma solução da mistura de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M.

Como mostra o perfil cromatográfico da figura 15, duas sub-frações de F3 foram eluidas pela lavagem da coluna com a solução inicial de fosfato dipotássico 0,005 M pH 8.4, denominadas respectivamente de F3-I e F3-II. A lavagem da coluna com a solução contendo a mistura de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M permitiu a eluição de uma outra sub-fração, F3-III.

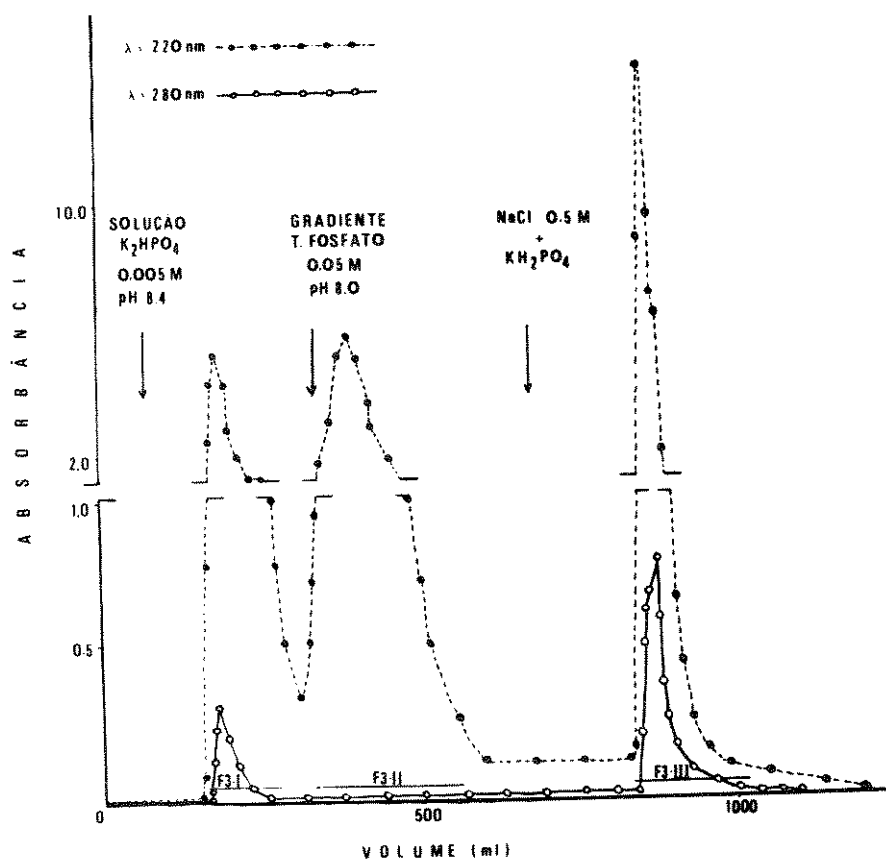


Figura 15 - Cromatografia da fração F3 em coluna de DEAE-Celulose.

Análise das Sub-Frações de F3

As três sub-frações de F3 foram concentradas / por liofilização, e amostras destas foram dialisadas e utilizadas para testes de eletroforese; precipitação em gel de ágar; inibição da reação de hemaglutinação passiva dos sistemas F3 x anti-SAB, F3 x anti-SAE e F3 x anti-SAH; e da propriedade de sensibilizarem hemácias taninizadas.

Na tabela 16 acha-se representada a dosagem de proteínas das sub-frações de F3 e o rendimento percentual de cada uma. É perceptível a predominância das sub-frações F3-II e F3-III sobre a F3-I. A sub-fração F3-II como mostrou o perfil cromatográfico, não absorveu no comprimento de onda de 280 nm, mas sim no de 220 nm, sendo provavelmente isenta de tirosina e triptofano.

Tabela 16 - Determinação do teor de proteína nas diversas sub-frações de F3, e o rendimento percentual em relação à amostra de F3 fracionada.

Frações	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Rendimento (%)
<u>F3</u>	15	12	100
<u>F3-I</u>	6	3	10
<u>F3-II</u>	6	5	20
<u>F3-III</u>	6	5	20

Na análise por imunodifusão das sub-frações / F3-I, F3-II e F3-III frente ao imune-sôro anti-F3, apenas a sub-fração F3-III deu reação de precipitação (figura 16).

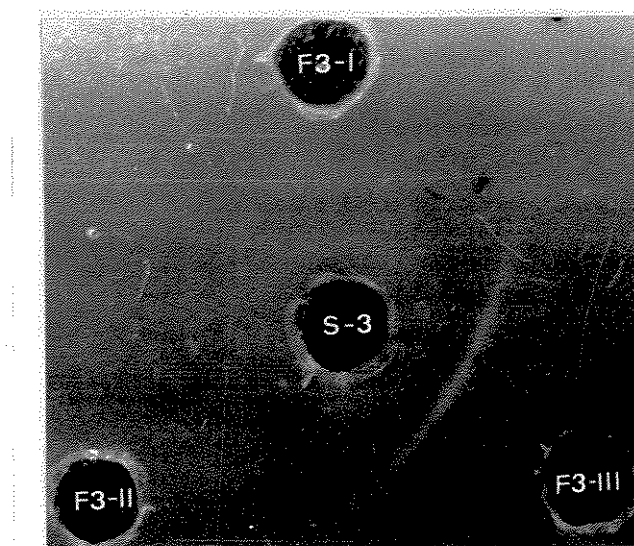


Figura 16 - Análise por imunodifusão das sub-frações F3-I, F3-II e F3-III (500 ug/ml de proteína), frente ao imune-sôro S3 (anti-F3).

Testes de inibição da reação de hemaglutinação passiva utilizando-se hemácias sensibilizadas com a fração F3 versus anti-SAB, anti-SAE, foram realizados com as sub-frações F3-I, F3-II e F3-III, em quantidades comparáveis / de F3 e inibidor. Como mostram os resultados desses testes (tabelas 17, 18 e 19), apenas com a sub-fração F3-III foi demonstrado ter havido inibição.

Tabela 17 - Inibição da reação de hemaglutinação passiva do sistema / F3 x anti-SAB, com 100 ug/ml das sub-frações F3-I, F3-II e F3-III.

Frações	Diluições do sôro anti- <u>SAB</u> a 1:							Contrôles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>F3</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-I</u>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>F3-II</u>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>F3-III</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

*Contrôles realizados nos experimentos das tabela 17, 18 e 19.

C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluido a 1:100

C-3 = Hemácias + sôro diluido a 1:100

Tabela 18 - Inibição da reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAE, com 100 ug/ml das sub-frações F3-I, F3-II e F3-III.

Inibidor	Diluições do sêro anti- <u>SAE</u> a 1:							Contrôles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>F3</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-I</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-II</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-III</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* Contrôles assinalados na tabela 17.

Tabela 19 - Inibição da reação de hemaglutinação passeva do sistema F3 x anti-SAH, com 100 ug/ml das sub-frações F3-I, F3-II e F3-III.

Inibidor	Diluições do sêro anti- <u>SAH</u> a 1:							Contrôles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
<u>F3</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-I</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-II</u>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>F3-III</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*Contrôles assinalados na tabela 17.

Tentativas de sensibilização de hemácias taninizadas com as sub-frações F3-I, F3-II e F3-III foram realizadas utilizando-se concentrações de 100 ug/ml para sensibilizar 1 ml da suspensão de hemácias a 2,5%. Apenas a sub-fração F3-III era portadora dessa propriedade. As hemácias sensibilizadas pela sub-fração F3-III foram aglutinadas pelos soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH como demonstrado na tabela 20. Desses resultados, podemos concluir / que os constituintes de F3 que possuem atividade imunológica estão concentrados na sub-fração F3-III.

Tabela 20 - Reação de hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas e sensibilizadas com 100 ug/ml da sub-fração F3-III, frente aos soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH.

Soros	Diluições dos soros a 1:							Contrôles*		
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000	C-1	C-2	C-3
anti- <u>SAB</u>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
anti- <u>SAE</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
anti- <u>SAH</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* C-1 = Hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C-2 = Hemácias taninizadas não sensibilizadas + sôro diluído a 1:100

C-3 = Hemácias + sôro diluído a 1:100

DISCUSSÃO

As várias condições testadas para digerir a SAB com a catepsina D de coelho, delimitaram certa homogeneidade na especificidade da ação desta enzima frente a este substrato. Notável similaridade foi revelada entre a degradação da SAB e a degradação da SAH na dinâmica proteolítica da catepsina D, aparecendo ao curso dessas proteólises vários componentes com especificidades antigênicas diferentes.

Considerando a natureza do digesto de SAB, inicialmente tão complexo quanto os digestos de SAH demonstrados nos trabalhos pioneiros de LAPRESLE (1955), um manuseio preliminar foi realizado com a finalidade de reduzir a heterogeneidade deste material. Esse manuseio previa a supressão da parte do digesto que contivesse grandes componentes moleculares, e consequentemente concentrasse os pequenos fragmentos.

Um fracionamento prévio do digesto foi obtido / por um ajuste no pH 4.5. Nessas condições foi precipitada a fração F1 que representou cerca de 25% do digesto total, ficando o restante no sobrenadante, a fração F2. A concentração de F2 pelo processo de ultrafiltração, permitiu isolar a fração F3 presente no ultrafiltrado, sendo constituída por fragmentos de baixos pesos moleculares. A análise comparativa entre as frações F1, F2 e F3 pelos testes de imunodifusão, eletroforese e imuno-eletroforese, demonstrou que essas frações eram diferentes entre si.

Aparentemente, os componentes das frações F1 e F2 nessas análises, foram os mesmos em quaisquer das condições de digestão testadas. Ambas precipitaram frente aos

ímune-soros anti-SAB, não ocorrendo o mesmo com a fração F3.

Embora não precipitassem com os soros anti-SAB, as frações F3 demonstraram atividade imunológica através da capacidade de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema I-(B) x anti-SAB. Outra propriedade característica/dessas frações foi a de sensibilizar hemácias taninizadas. Essas hemácias assim tratadas, foram aglutinadas pelos soros anti-SAB, anti-SAE ou anti-SAH, sugerindo a existência de determinantes antigênicos comuns, idênticos ou similares nas três albuminas.

A análise eletroforética das frações F3, demonstrou uma grande heterogeneidade destas, em dependência das condições de digestão de que foram originadas, havendo mesmo uma proporcionalidade entre o tempo de digestão e o aumento dessa heterogeneidade dado pelo aparecimento de novos componentes de mobilidades diferentes. Com base, pois, nesse aumento de heterogeneidade, e nos rendimentos em teor de proteína, as condições de digestão realizadas a 45°C com um período de incubação de 1 hora, foram consideradas as mais adequadas.

A partir de várias digestões da SAB pela catepsi na D realizadas nas condições padronizadas, as frações F1, F2 e F3 foram obtidas em larga escala e analisadas separadamente.

-A fração F1, segundo referências de estudos com digestos de SAB de várias enzimas (RANGEL, 1961), parece conter uma porção do digesto que estaria incluído naquela categoria de moléculas que sofreram leves modificações com a ação enzimática, possuindo pesos moleculares iguais ou próximos ao da molécula nativa. A análise eletroforética de F1 está de acordo com essa hipótese, pois, não demonstrou

grande modificação de mobilidade em comparação à molécula/de SAB, parecendo conter um componente relativamente homogêneo. Em vista dessa característica, não se fracionou F1 como as outras frações para pesquisa de pequenos fragmentos.

Capaz de precipitar com os soros anti-SAB em proporções comparáveis com a molécula nativa, a imunoeletroforese da fração F1 revelou dois sistemas precipitantes, isto é, existem pelo menos duas populações de moléculas com antigenicidades diferentes. Nenhuma reação que evidenciasse a existência de determinantes internos nesta fração apresentou resultado positivo.

Os soros anti-F1 preparados em coelhos, foram igualmente reativos com a SAB e com a fração F2.

- A fração F2, conforme análise eletroforética e imunoeletroforética, representou uma porção do digesto bem mais heterogênea, sendo constituída por um grande número de componentes e vários sistemas precipitantes.

Esta fração precipitou com os soros anti-SAB em proporções pouco variáveis em comparação com a molécula nativa. Nas análises realizadas desta fração, também não se demonstrou a existência de determinantes internos.

Os soros anti-F2 preparados em coelhos foram igualmente reativos com SAB e com a fração F1.

A fração F2 foi analisada diretamente por cromatografia em DEAE-Celulose, seguindo-se as informações descritas por RANGEL (1970) para a obtenção de I-(B). Nessas condições foram separadas três sub-frações: F2-I, F2-II e F2-III.

A sub-fração F2-I representando 10% de F2, está constituída por mais de um componente, com mobilidades eletroforéticas próximas entre si. Não precipitou com os soros

anti-SAB ou anti-F2, mas formou um leve precipitado com o soro anti-F3. A atividade imunológica dessa sub-fração, também foi demonstrada através da capacidade de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB.

A sub-fração F2-II, também demonstrando certa heterogeneidade na análise eletroforética, representou 4% de F2. Não absorveu no comprimento de onda de 280 nm, sendo provavelmente isenta de tirosina e triptofano. Apresentou atividade imunológica comparável à da sub-fração F2-I. Essas sub-frações F2-I e F2-II correspondem à fração I-(B) isolada inicialmente por RANGEL (1970).

A sub-fração F2-III que representou 72% de F2, continha toda a porção dessa fração que ficara retida na coluna de DEAE-Celulose segundo as condições de cromatografia. De grande heterogeneidade como demonstrado na análise eletroforética, F2-III precipitou frente aos soros anti-SAB, anti-F2 e anti-F3, o que sugere a presença de grandes fragmentos da molécula nativa.

Da concentração de F2 pela ultrafiltração, foram obtidas duas frações: uma fração concentrada (F2-C) que ficou retida na membrana filtrante, e uma fração ultrafiltrada (F3) dotada de várias propriedades já mencionadas, demonstrando inclusive ser comparável com as sub-frações F2-I e F2-II - ou I-(B). Da observação desses resultados, ficou definida a hipótese de que apenas uma pequena parte desses fragmentos imunologicamente ativos tenha ultrapassado a membrana "Diaflo" PM 10, estando pois, no limite da seletividade de dessa membrana. Portanto, os componentes de F3 e de I-(B), constituem provavelmente o mesmo material, embora tenham sido obtidos em condições distintas.

A análise cromatográfica da fração F2-C foi compatível com a hipótese acima mencionada. De fato, várias sub-

frações puderam ser obtidas (sub-frações a, b, c, d, e, f, e g), eluidas em posição comparável ao I-(B). A análise eletroforética dessas sub-frações demonstrou grande similaridade de suas mobilidades com aquelas das frações I-(B) e F3.

Apenas a sub-fração g, deu reação de precipitação positiva com os soros anti-SAB na análise por "ring test" e por imunodifusão. Embora as sub-frações a - f não tenham precipitado nesses testes, foram capazes de inibir a reação de hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB.

Do perfil cromatográfico de F2-C ainda podemos observar a posição de eluição da sub-fração a idêntica à da sub-fração F2-I. A sub-fração b, parece conter um fragmento até então não evidenciado, que foi concentrado no processo da ultrafiltração. As sub-frações c, d e e são comparáveis com a sub-fração F2-II na posição de eluição; pelas mobilidades eletroforéticas e através da atividade imunológica. A sub-fração f, embora não tenha precipitado com os soros anti-SAB, parece ter sido comprometida com o gradiente de força iônica utilizado, sendo eluida quase conjuntamente com a sub-fração g. Provavelmente está constituída de grandes fragmentos que ainda se relacionam com F3.

- A fração F3 obtida em larga escala nas condições eleitas de digestão, foram analisadas por diálise controlada. Os resultados dessa análise demonstraram que os fragmentos presentes em F3 não são dialisáveis, não alterando inclusive as propriedades imunológicas.

Considerando a seletividade da membrana "Diaflo" PM 10 utilizada na ultrafiltração, e a comprovação de que os fragmentos de F3 não são dialisáveis, podemos fazer uma estimativa dos pesos moleculares desses fragmentos entre 5.000 e 11.000.

A fração F3 foi imunogênica quando inoculada em coelhos, obtendo-se dessa maneira um sôro anti-F3 que continha anticorpos precipitantes. Este sôro foi analisado frente a todas as frações do digesto, precipitando com todas elas. Não se detectou entretanto através desses testes, nenhuma evidência da presença de determinantes antigênicos internos.

A análise cromatográfica de F3 em DEAE-Celulose, permitiu separar três sub-frações: F3-I, F3-II e F3-III. Como mostra o perfil cromatográfico dessa análise, pareceu desnecessário o uso do gradiente linear de pH, podendo-se eluir as sub-frações F3-I e F3-II com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna.

A sub-fração F3-I, representando 10% de F3, definiu-se na eletroforese como mais de um componente, não apresentando entretanto, atividade imunológica nos testes a que foi submetida; A sub-fração F3-II, eluída quase sem contaminantes, não absorveu no comprimento de onda de 280 nm, sugerindo a inexistência de tirosina e triptofano. Este resultado fez lembrar o fragmento "F1" de LAPRESLE (1965) oriundo do I-(H). Sua mobilidade eletroforética contudo, diferiu ao daquele fragmento. Constituindo 20% de F3, a sub-fração F3-II entretanto, não apresentou atividade imunológica.

A sub-fração F3-III representando 20% de F3, é constituída por um componente mais heterogêneo, exibindo alguns contaminantes segundo análise eletroforética. Essa sub-fração apresentou atividade imunológica nos testes de inibição da hemaglutinação passiva do sistema F3 x anti-SAB. Também foi capaz de sensibilizar hemácias taninizadas que aglutinaram frente aos soros anti-SAB, anti-SAE e anti-SAH.

Nos testes das sub-frações F3-I, F3-II e F3-III frente ao sôro anti-F3, apenas a sub-fração F3-III apresentou reação

de precipitação positiva. Pela análise desses dados podemos concluir que 80% de F3 constitui um material sem atividade/imunológica, não representando uma maneira adequada o fracionamento de F2 pelo processo da ultrafiltração, para a obtenção desses pequenos fragmentos de SAB dotados de atividade imunológica.

- A metodologia aplicada na análise das sub - frações de F2-C, e o rendimento percentual de cada uma delas, reforçam a idéia de que estão constituídas dos mesmos determinantes antigênicos de F3 e I-(B).

- No fracionamento de F2 diretamente por cromatografia em DEAE-Celulose podemos obter esses fragmentos de baixo peso molecular com atividade imunológica num rendimento relativamente bom. Porquanto o fracionamento de F2-C, além de constituir um trabalho adicional, fornece várias subfrações que provavelmente foram concentradas na ultrafiltração, dificultando dessa maneira o isolamento e caracterização de um desses fragmentos em termos analíticos definidos.

Com base, pois, nessas evidências, a continuidade dos nossos trabalhos mediante a utilização de uma metodologia apropriada, estará voltada para:

- 1) A caracterização de um ou mais desses pequenos fragmentos imunologicamente ativos, que aparecem ao curso da digestão de SAB pela catepsina D de coelho.
- 2) Determinação da composição e arranjos de aminoácidos desses fragmentos, para análise das possíveis conformações existentes na molécula nativa.
- 3) Confronto dessas estruturas com motivos antigênicos de outras albuminas intimamente relacionadas (SAH e SAE) para determinação do grau de homologia entre elas.
- 4) Preparação de anticorpos mono-específicos para estudar / mudanças de afinidade ou grau de heterogeneidade desses anticorpos.

- 5) E, paralelamente à esta investigação, experimentos mais adequados deverão ser realizados para elucidar o problema referente à existência de "determinantes internos". Deva-se considerar, que neste trabalho, os experimentos que demonstrariam a existência desses determinantes na molécula de SAB, não apresentaram resultados comprobatórios da afirmativa de ISHIZAKA (1959); não se conseguindo inclusive, repetir os resultados por êle obtido, quando se empregou a mesma metodologia assinalada.

RESUMO E CONCLUSÕES

A Sôro-Albumina Bovina (SAB) degradada pela catepsina D de coelho foi submetida a uma análise imunoquímica.

Misturas de 2 gramas da SAB foram submetidas à proteólise com 500 U desta enzima, em condições variáveis de temperatura e tempo de digestão.

O digesto foi estudado do ponto de vista imunoquímico com vistas ao isolamento de fragmentos que pudessem / contribuir para elucidar a estrutura antigênica desta albumina.

Do fracionamento prévio do digesto, obteve-se duas frações: fração F1 precipitada no pH 4.5, e fração F2 sobrenadante restante. Esta fração F2 concentrada por ultra-filtração, originou uma terceira fração - F3 presente no ultrafiltrado.

- A fração F1 representando cerca de 25% do digesto, é constituído por moléculas de SAB pouco alteradas com a proteólise. A análise imunoeletroforética demonstrou existir pelo menos dois sistemas precipitantes nesta fração.

- A fração F2 representando cerca de 65% do digesto, é bastante heterogênea, contendo vários sistemas precipitantes, podendo ser fracionada em condições adequadas para a obtenção de pequenos fragmentos imunologicamente ativos.

- A fração F3 obtida da concentração de F2 por ultrafiltração, representa 5 - 7% do digesto. Contém pequenos fragmentos com atividade imunológica de pesos moleculares / estimados entre 5.000 e 11.000. Estes fragmentos são os mesmos contidos nas sub-frações oriundas das frações F2 ou F2-C obtidas diretamente por cromatografia.

- Foi realizada uma comparação entre alguns dos

motivos antigênicos da SAB e o de outras albuminas relacionadas que reagem entre si. Os fragmentos imunologicamente/ativos da fração F3 estão relacionados com determinantes de SAH e da SAE.

Embora não se tenha feito nenhuma caracterização de algum desses fragmentos com atividade imunológica, os resultados observados neste trabalho, dão-nos perspectivas para estudos futuros que possam vir contribuir na elucidação da base molecular da especificidade imunológica dos antígenos proteicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDUAS, A. G. et GRABAR, P. - L'Hemagglutination passives dans la recherche des anticorps antiproteïniques. - Ann . Inst. Pasteur, 84 : 903-910, 1953.

BOYDEN, S. V. - The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein. - J. Exp. Med., 93 : 107, 1951.

CAMPBELL, DAN H. and GARVEY, J. S. - The fate of labeled foreign antigens in the livers of normal and immunized rabbits. - Int. Arch Allergy, 12 (1-2): 70-88, 1958.

DAWOOD, F. A. M. - Estudo sobre a catepsina D de coelho , purificação e preparação de anti-soro monoespecífico. - Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1973.

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

GRABAR, P. et WILLIAMS, C. A. - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application on sérum sanguin. - Biochim. Biophys. Acta, 10 : 193, 1953.

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, T.; CAMPBELL, DAN H. and ISHIZAKA, K. - Internal determinants in protein molecules. - Proc. Soc. Exp. Med., 103 : 5-9, 1960.

JACQUES, P.J. - In lysosomes in biology and pathology. - J.T. Dingle and H.B. Fell, editors, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 2 : 395, 1969.

KABAT, E.A. and MAYER, M.M. - Experimental Immunochemistry - 1st ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 1964.

LANDSTEINER, K. and VAN DER SHEER - On cross reactions of egg albumin sera. - J. Exp. Med., 71 : 445-454, 1940.

LAPRESLE, C. - Étude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. II- Mise en évidence de trois groupements spécifiques différents dans le motif antigenique de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants dans le serum de lapin anti- albumine humaine. - Ann. Inst. Pasteur, 89 : 654, 1955.

LAPRESLE, C.; KAMINSKI, M. and TANNER, C.E. - Immunochemical study of the enzymatic degradation of human serum albumin : An analysis of the antigenic structure of a protein molecule. - J. Immunology, 82 (2): 94-102, 1959.

LAPRESLE, C. and WEBB, T. - Study a proteolytic enzyme from rabbit spleen. - Biochem. J., 76 : 538, 1960.

LAPRESLE, C. et WEBB, T. - Étude de la dégradation de la / sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. VII- Isolement et propriétés d'un fragment d'albumine. - Ann. Inst. Pasteur, 99 : 523-532, 3463, 1960.

LAPRESLE, C. and WEBB, T. - Isolation and study of a fragment of human serum albumin containing one of the antigenic sites of the whole molecule. - Biochem. J., 95 : 245 - 251, 1965.

OUCHTERLONY, O. - Immunodifusion and Immuno-electrophoresis. - In: B.M. Weir (ed.) - Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 665 - 705, 1967.

PETERS, Jr. T. - Isolation and amino acid composition of two peptide fragments from bovine serum albumin. - J. Biol. Chem., 240 : 4, 1964.

PETERS, J.H. and GOETZL, E. - Recovery of greater antigenic reactivity in conformationally altered albumin. - J. Biol. Chem., 244 (8): 2068-2074, 1969.

PORTER, R.R. - The isolation and properties of a fragment of bovine-serum albumin which retains the ability to combine with rabbit antiserum. - Biochem. J., 66 (4): 677-686, 1957.

PUTNAM, F.W. - Structure and function of the plasma proteins. - In: The Proteins, 2nd ed., edited by Hans Neurath - v. II, Academic Press, New York and London, 1965.

PRESS, E.M.; PORTER, R.R. and CEBRA, J. - The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D from bovine spleen. - Biochem. J., 74 (3): 501-514, 1960.

RANGEL, H.A. - Estudo da reação cruzada entre as soroalbuminas bovina e equina. - Anais de Microbiologia, vol. IX - suplemento, 39-53, 1961.

RANGEL, H.A. - Study of the cross-reaction between rabbit anti-bovine serum albumin antibodies and equine serum albumin. - Immunology, 8 : 88, 1965.

RANGEL, H.A. et LAPRESLE, C. - Étude de la spécificité sur la chaîne B de l'insuline des cathepsines D et E de lapin. - Biochim. Biophys. Acta, 128 : 372-379, 1966.

RANGEL, H.A. - Contribuição ao estudo imunoquímico das reações cruzadas entre as soroalbuminas humana, bovina e equina. - Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1967.

RANGEL, H.A. - Isolamento e purificação de um fragmento de sôro-albumina bovina capaz de reagir com soros anti-sôro / albumina humana. - Resumos da XXII Reunião Anual da SBPC, Seção Q-16, 413-414, 1970.

RICHIE, E.R. and MANDY, W.J. - Sequential exposure of buried determinants of rabbit IgG. - Fed. Proc., 29 (2): 774, abs. 2984, 1970.

SCHEIDEGGER, J.J. - Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. - Int. Arch. Allergy, 7 : 103-110, 1955.

SOBER, H.A. and PETERSON, E.A. - Protein chromatography on ion exchange cellulose. - Fed. Proc., 17 : 1116-1126, 1958.

STEFANOVIC, J.; WEBB, T. et LAPRESLE, C. - Étude des cathepsines D et dans des preparations de polynucleaires, de macroph et de lymphocytes de lapin. - Ann. Inst. Pasteur, / 103 : 276-284, 3893, 1962.

TOLEDO, R.R.F.; DAWOOD, F.A.M. e RANGEL, H.A. - Solubilidade da catepsina D de coelho em misturas água-acetona. - / Rev. Bras. Tec., 3 : 161-167, 1972.

WEBER, G. and YOUNG, L.B. - Fragmentation of bovine serum albumin by pepsin. II- Isolation, amino acid composition , and physical properties of the fragments. - J. Biol. Chem., 239 : 1415-1424, 1964.

WEICHSELBAUM, T. E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. - Amer. J. Clin. Path. Tech., 10 : 40, 1946.