

BEATRIZ MARIA RAMALHO MACHADO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE SORO
DE MACACO *CEBUS* sp. E OBTENÇÃO DE SOROS MONOESPECÍFICOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Cam
pinas, para obtenção do grau de Mestre em
Biologia (Imunologia).

Orientador: Prof. Dr. H.A.RANGEL

Departamento de Microbiologia e Imunologia

CAMPINAS - SP.

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Humberto de Araújo Rangel*, pela orientação científica, apoio e estímulo constantes.

À Prof.^a Dr.^a *Maria Aparecida Pourchet Campos*, pela oportunidade de formação científica.

Aos Prof. Dr. *Paulo de Araújo* e Dr. *Luís A. Magalhães*, pela discussão do trabalho e valiosas sugestões.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, em especial *Dária Repka*, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de laboratório, *Júlia, Ajax, Othon*, pela colaboração.

Ao pessoal técnico do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos auxílios recebidos na execução deste trabalho.

Ao *Luís Antonio Rocatelli*, pelo trabalho de fotografia.

À Srt.^a *Aida Maria Lepre Vaz*, pelo trabalho de datilografia.

A todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho,

Nossos sinceros agradecimentos.

Às instituições abaixo relacionadas, agradecemos os recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia:

Universidade Estadual de Campinas.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Conselho Nacional de Pesquisa.

Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior ().*

Organização Mundial de Saúde (Divisão de Imunologia).

Biblioteca Regional de Medicina.

(*)- A autora recebeu Bolsa de Estudos através da CAPES-PICD, durante a realização do Curso de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

	página
1- INTRODUÇÃO	1
2- MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1- Antígenos	4
2.2- Anti-Soros	5
2.3- Dosagem de Proteínas	6
2.4- Imunodifusão	7
2.5- Eletroforese e imunoeletroforese	7
2.6- Cromatografia em Sephadex G-200	8
3- RESULTADOS	10
3.1- Especificidade do soro de coelho anti-soro de macaco <i>Cebus</i> sp.	10
3.2- Estudo da fração 7S	13
3.3- Estudo da fração 19S	20
4- DISCUSSÃO	30
5- CONCLUSÃO	35
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1- INTRODUÇÃO

Os investigadores empenhados em pesquisas biomédicas desde muito tempo vêm se preocupando com a utilização de animais de experimentação adequados para as suas pesquisas.

Os animais mais utilizados com esta finalidade são mamíferos de pequeno porte, de fácil manutenção em laboratório, como coelhos, cobaias e camundongos.

Ultimamente tem crescido o interesse na utilização de animais de maior porte que, eventualmente, reproduzam a doença humana e possam ser acompanhados durante longo tempo.

Neste sentido têm aumentado as investigações sobre primatas não humanos. Estes animais proporcionam um modelo valioso para o estudo de muitas doenças humanas, uma vez que a sua anatomia e fisiologia são bastante semelhantes às do homem^{17, 42}.

Os primatas não humanos têm sido utilizados em estudos de transplantes de órgãos e tecidos, em pesquisas imunogenéticas^{3, 40}, em investigações sobre a imunidade contra doenças infecciosas e cárie dentária^{11, 25, 26}.

No campo da investigação sobre a imunidade contra doenças infecciosas, principalmente doenças parasitárias, o macaco rhesus (*Macaca mullatta*) tem sido um dos animais de laboratório mais utilizados.

Podemos citá-lo como modelo experimental no estudo da esquistossomose^{20, 29, 30, 41}, da malária^{13, 49} e da Doença de Chagas⁴⁷.

No início da década de 60, as espécies africanas e asiáticas foram as mais utilizadas, porém, desde que medidas concernentes à proteção de espécies como o rhesus, o orangotango e os chimpanzês foram adotadas em vários países daqueles

continentes, as atenções se voltaram para as espécies neotropicais. Nesta mesma década, a utilização de calitricídeos e de cebídeos começou a aumentar.

No Continente Americano estão presentes a família Cebidae com 12 gêneros e cerca de 30 espécies e a família Callithricidae, com 4 gêneros e 35 espécies (*).

Atualmente as espécies mais utilizadas em pesquisas biomédicas pertencem aos gêneros *Cebus*, *Saimiri* e *Callithrix*.

As espécies de *Cebus* e *Saimiri* são numerosas e aceitam bem o cativeiro. *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* apresentam igualmente elevado grau de adaptabilidade podendo ser utilizados como animais de laboratório.

Os macacos americanos do gênero *Cebus* são macacos comuns da região amazônica, onde são conhecidos como "macaco prego" e são bons modelos para o estudo das infecções por *Schistosoma mansoni*⁴¹ e por *S. haematobium*^{10, 24}.

No Brasil, estes animais já foram utilizados como modelos para o estudo das infecções por *S. mansoni*^{9, 12} e na Doença de Chagas (**).

No estudo da imunidade provocada pelos agentes causadores das doenças infecciosas utilizando primatas não humanos como modelos experimentais, deparamo-nos com o problema da falta de conhecimentos precisos sobre as imunoglobulinas destes animais.

(*) - Prof. F.D.Ávila-Pires. Problemas sobre los primates. Museu Nacional, Rio de Janeiro, comunicação pessoal, 1979.

(**)- Dr. G.Chaia, Instituto de Pesquisa em Doenças Endêmicas, Johnson & Johnson, Campinas - SP., informação pessoal, 1978.

Enquanto houve um progresso considerável no estudo das proteínas plasmáticas humanas, nos últimos anos, o mesmo não se pode dizer com respeito às proteínas plasmáticas de outros primatas.

Imunoglobulinas do macaco rhesus, foram caracterizadas pela primeira vez por KABAT²¹ e TISELIUS e KABAT⁴⁸. A partir daí foram feitos estudos e frações do soro de rhesus foram examinadas por métodos químicos e eletroforéticos e comparadas com frações humanas^{32, 34, 35}.

Não temos informações a respeito de estudos semelhantes com soro de macaco *Cebus*, e por esse motivo, propuzemo-nos isolar e caracterizar imunoglobulinas destes animais, e tentar produzir, em coelhos, anti-soros monoespecíficos para essas imunoglobulinas. Estes anti-soros possibilitar-nos-ão estudar a evolução de imunoglobulinas de macacos na resposta imune a antígenos protéicos ou de parasitas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- ANTÍGENOS

Os antígenos utilizados foram:

a) Soro normal de macaco *Cebus* (SM)*, constituindo uma mistura de soros obtidos de macacos adultos não experimentalmente infectados, capturados em seu habitat natural e mantidos em cativeiro.

b) Soro humano normal (SH), obtido de adultos que não apresentavam-se infectados.

c) Soro normal de macaco rhesus (SR)**.

d) Imunoglobulinas de macaco *Cebus* da classe IgG (IgG), obtidas por fracionamento de soro normal de macaco *Cebus*, através de precipitação com sulfato de amônio a 50%, conforme as indicações de LIMA²⁷, seguida por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 segundo FLODIN¹⁶ e eletroforese preparativa em bloco de amido da fração 7S, segundo KUNKEL e SLATER²⁵.

e) IgG humana (IgGH), isolada de soro humano normal segundo as indicações de LIMA²⁷.

f) IgM humana (IgMH), isolada de soro humano segundo MICHELI e ISLIKER³².

g) IgA humana (IgAH), isolada de colostro humano segundo as indicações de NEWCOMB³⁶.

(*) - Gentilmente cedido pelo Instituto de Pesquisas em Doenças Endêmicas da Johnson & Johnson (Campinas - SP), na pessoa do Dr. G. Chaia, a quem apresentamos nossos agradecimentos.

(**)- Gentilmente cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), na pessoa do Dr. Herman Shartzmair, a quem apresentamos nossos agradecimentos.

h) Cadeias k e λ humanas (k, λ), isoladas a partir de urina de pacientes com mieloma, as quais continham proteínas de Bence-Jones, que foram precipitadas 3 vezes com sulfato de amônio a 50%.

Todos os antígenos preparados, foram testados através de imunoeletroforese em gel de agar, utilizando-se imunossoros pluriespecíficos, apresentando uma única linha de precipitação.

2.2- ANTI-SOROS

Os anti-soros utilizados foram:

a) Soro de coelho anti-soro normal de macaco *Cebus* (a-SM), obtido de coelhos imunizados de acordo com o seguinte esquema: os animais foram inoculados sub-cutaneamente em vários pontos do dorso com 1 ml da mistura em partes iguais de soro de macaco *Cebus* (10 mg/ml de proteína) e adjuvante completo de Freund.

Uma segunda dose foi feita após trinta dias.

Os animais foram sangrados vinte dias após a última dose; o soro obtido, analisado através de imunodifusão (OUCHTERLONY³⁸), apresentou título de 1/4 frente a 500 γ de antígeno.

b) Soro de coelho anti-7S de macaco *Cebus* (a-7S), obtido através da imunização de coelhos com 1 ml de uma solução de 7S de macaco, contendo 100 γ de proteína/ml, emulsionada com igual volume de adjuvante completo de Freund, injetados intradermicamente em vários pontos no dorso do animal.

Uma segunda dose foi feita após trinta dias, quando os coelhos foram inoculados com 1 ml de uma solução de

7S de macaco contendo 200 γ proteína/ml, através de uma injeção intramuscular.

Os animais foram sangrados sete dias após a última dose, e o soro obtido, analisado por imunodifusão, apresentou título de 1/32 frente a 500 γ de antígeno.

c) Soro de coelho anti-19S de macaco *Cebus* (a-19S), obtido utilizando-se o mesmo esquema para a obtenção de soro anti-7S, e que apresentou título de 1/16 frente a 500 γ do antígeno.

d) Soro de cavalo anti-soro humano normal (a-SH) (Instituto Pasteur - Paris).

e) Soro de carneiro anti-IgG humana (a-IgGH), obtido através da imunização de carneiros com esta imunoglobulina purificada.

f) Soro de coelho anti-IgM humana (a-IgMH) (Behringwerke).

g) Soro de coelho anti- α_2 macroglobulina humana (a- α_2 M), (Behringwerke).

Todos os soros eram mantidos a -20°C até o momento de uso.

2.3- DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações protéicas das várias proteínas em estudo foram determinadas através dos seguintes métodos:

a) Dosagem pelo Biureto, segundo a técnica de WIECHSELBAUM modificada por DITTEMBRANDT²⁷; b) Dosagem pelo Folin-Ciocalteu, segundo LOWRY e col.²⁸; c) Determinação espectrofotométrica em $\lambda = 280 \text{ nm}$ em Espectrofotômetro Zeiss PMQ III, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

2.4- IMUNODIFUSÃO

Os experimentos de imunodifusão foram realizados em gel de agar a 1% em solução salina 0,15 M, segundo indicações de OUCHTERLONY³⁸.

2.5- ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE

a) Eletroforese preparativa em bloco de amido

A eletroforese preparativa em bloco de amido foi realizada segundo as indicações de KUNKEL & SLATER²³.

Para o preparo do bloco de amido foi empregado amido hidrolisado, suspenso em solução tampão veronal (0,05M; pH 8,6). O amido foi derramado numa cuba de plástico medindo 35 x 10 x 1 cm.

A amostra protéica contendo 25 mg de proteínas totais, num volume de 5 ml, foi aplicada numa fenda de 7 x 1cm a 17 cm do polo negativo.

A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 250 volts, durante 24 horas. Após este período, o bloco foi congelado e descongelado parcialmente, quando foram cortadas secções de 1 cm.

O mesmo tampão veronal foi utilizado para a eluição das proteínas resultantes da separação.

Os eluatos, após determinação da concentração protéica por absorbância em $\lambda = 280$ nm, foram analisados por imunoeletroforese do tipo "Rocket" e por imunoeletroforese unidimensional.

b) Eletroforese e imunoeletroforese unidimensionais

As técnicas de eletroforese e imunoeletroforese unidimensionais foram realizadas segundo as indicações de GRA

BAR & BURTIN¹⁸, em lâminas de vidro de 9 x 12 cm, utilizando-se como suporte gel de agarose a 1% em solução tampão veronal (0,05M; pH 8,6) e um gradiente de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora e 20 minutos.

c) Imunoeletroforese do tipo "Rocket"

A imunoeletroforese do tipo "Rocket", foi realizada conforme descrição de AXELSEN², em gel de agarose a 1% em solução tampão veronal (0,05M; pH 8,6) e um gradiente de potencial de 6 volts/cm durante 3 horas. Nesta imunoeletroforese, o soro de coelho anti-soro normal de macaco *Cebus* foi misturado à agarose numa diluição final de 1/20.

d) Imunoeletroforese Cruzada

A imunoeletroforese cruzada de LAURELL e a imunoeletroforese cruzada com absorção de antígenos no gel intermediário, foi realizada segundo as indicações de AXELSEN², em placas de vidro de 9 x 11 cm cobertas com 15 ml de agarose a 1% em tampão veronal-tris-glicina (0,02μ; pH 8,6).

A eletroforese na primeira dimensão foi realizada com um gradiente de potencial de 6 volts/cm, durante 1 hora e meia, e na segunda dimensão, 1 volt/cm, durante 16 horas.

e) Imunoeletroforese Linear

A imunoeletroforese linear foi realizada segundo as indicações de AXELSEN², com um gradiente de potencial de 1 volt/cm, durante 16 horas.

2.6- CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-200

As cromatografias em Sephadex G-200 foram realizadas de acordo com FLODIN¹⁶.

Aliquotas de 3 ml de soro de macaco *Cebus* (80 mg

proteína/ml) ou fração globulínica de soro de macaco (76 mg proteína/ml) eram aplicadas a colunas de 65 x 2 cm de Sephadex G-200, empregando-se uma mistura de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M; pH 8,0) e cloreto de sódio, com um fluxo médio de 0,7 ml/minuto.

Frações de 4 ml foram coletadas e suas absorbâncias determinadas em $\lambda = 280$ nm, em espectrofotômetro Zeiss PMQ III, utilizando-se cubas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

3- RESULTADOS

3.1- ESPECIFICIDADE DO SORO DE COELHO ANTI-SORO DE MACACO Cebus sp.

O soro de coelho anti-soro de macaco *Cebus* reagiu com as proteínas homólogas do soro de macaco *Cebus*, apresentando, na análise imunoeletroforética, várias linhas de precipitação (Fig. 1).

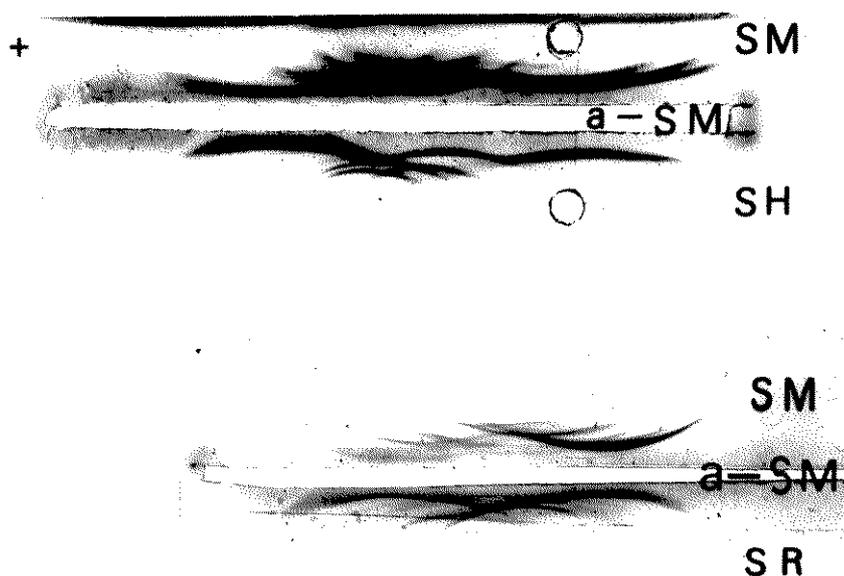


Fig. 1- Imunoeletroforese de soro de macaco *Cebus* (SM, 5 mg/ml), soro humano (SH, 5 mg/ml) e soro de macaco rhesus (SR, 5 mg/ml) frente a soro de coelho anti-soro de macaco *Cebus* (a-SM).

Este soro também reagiu cruzadamente com as proteínas do soro humano e do soro de macaco rhesus, como demonstrado através de imunoeletroforese destes soros (Fig. 1).

Por outro lado, o soro de cavalo anti-soro humano apresenta reações cruzadas com componentes do soro de macaco *Cebus*, quando analisado por imunoeletroforese.

Estes experimentos sugerem a existência de semelhanças antigênicas entre as proteínas do soro de macaco *Cebus*, soro humano e soro de macaco rhesus.

O soro de coelho a-SM, testado com a fração da região γ isolada de soro de macaco *Cebus* através de eletroforese simples em gel de agar e com a fração da região γ , isolada de soro humano, mostrou, em experimentos de imunodifusão, a existência de reações cruzadas entre as proteínas.

Igualmente, o soro de cavalo a-SH, testado com estas frações isoladas de soro de macaco *Cebus* e de soro humano, confirmou estes resultados.

As globulinas do soro de macaco *Cebus* obtidas por precipitação com sulfato de amônio a 50%, foram cromatografadas em Sephadex G-200.

Os resultados apresentados na Fig. 2, mostram que foram obtidas 3 frações principais de proteínas (F.1, F.2 e F.3), à semelhança do que ocorre quando soros de outros mamíferos são submetidos a este mesmo processo.

As frações F.1, F.2 e F.3 devem corresponder a componentes com coeficientes de sedimentação de 19S, 7S e 5S, respectivamente.

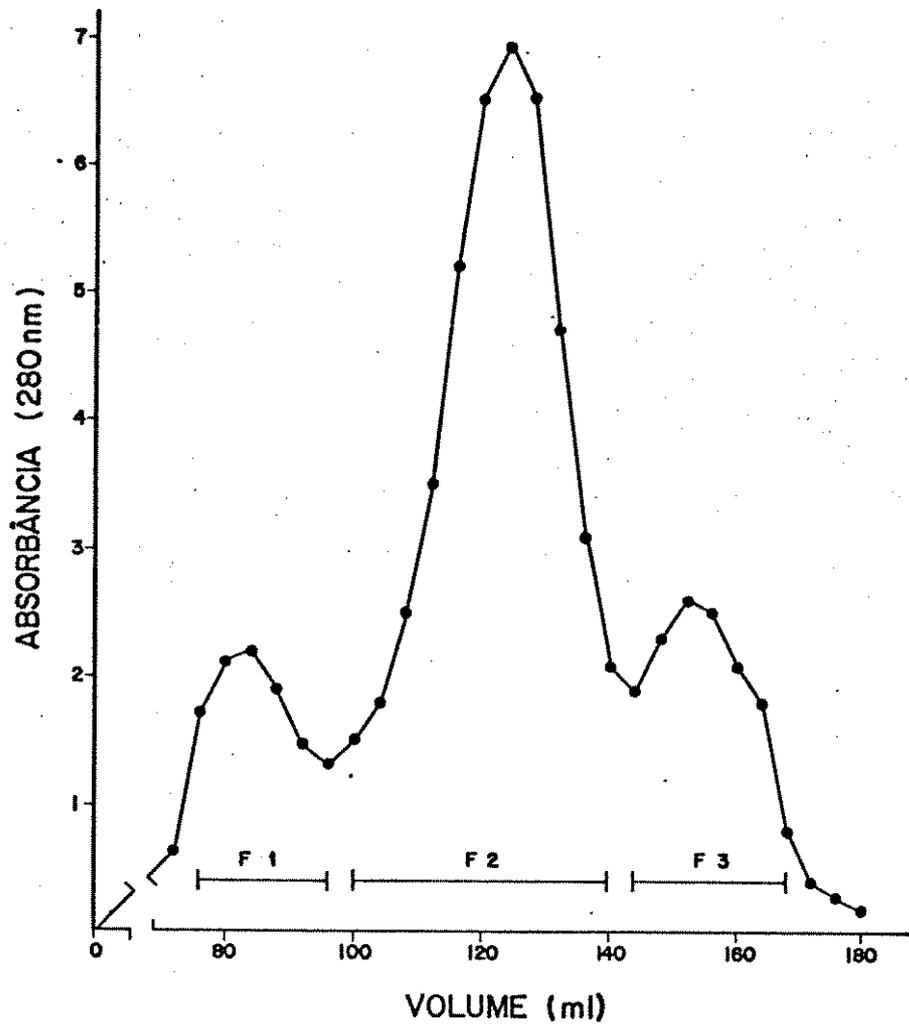


Fig. 2- Cromatografia em Sephadex G-200 de fração globulínica de soro de macaco *Cebus*.

3.2- ESTUDO DA FRAÇÃO 7S

A fração F.2 (7S) foi concentrada por ultrafiltração e em seguida submetida à eletroforese preparativa em bloco de amido, tendo sido coletadas 5 frações (F.2.A-F.2.E), como indicado na Fig. 3.

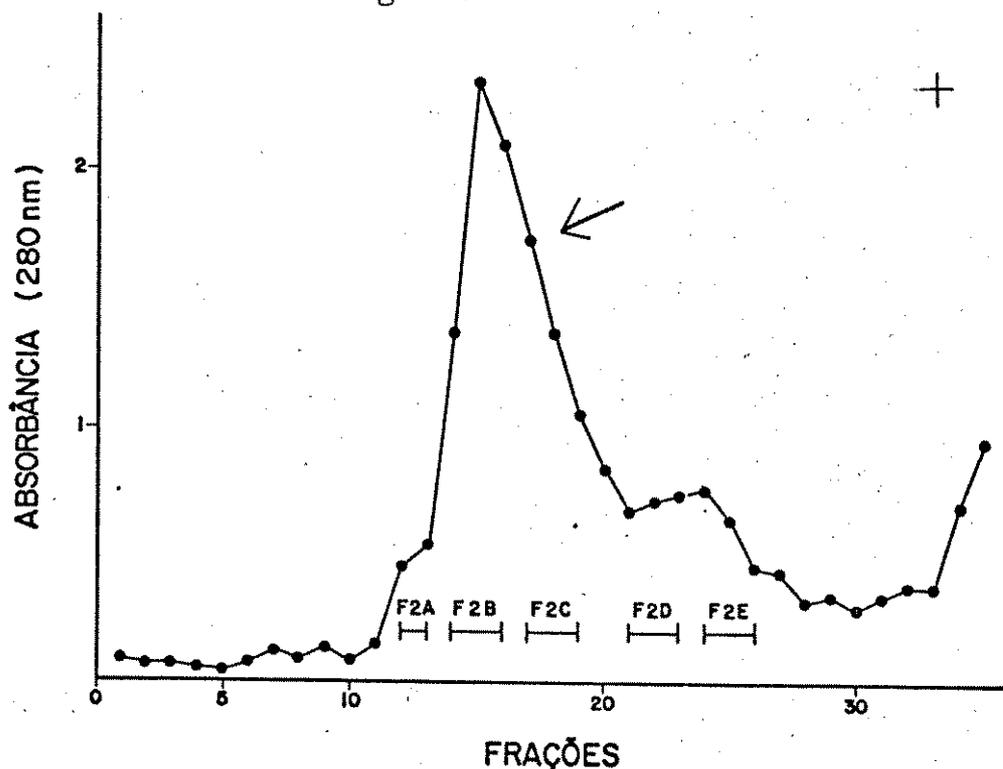


Fig. 3- Eletroforese preparativa em bloco de amido da fração F.2 (7S). A seta indica o local de aplicação da amostra.

Estas frações foram testadas por imunoeletroforese frente a soro de coelho a-SM e soro de cavalo a-SH.

As frações F.2.A e F.2.C, pela sua mobilidade eletroforética, foram consideradas como sendo constituídas por globulinas da classe IgG. Estas frações foram reunidas e utilizadas para a imunização de coelhos, com a finalidade de se obter um soro monoespecífico anti-IgG de macaco *Cebus*.

Os soros obtidos de coelhos imunizados com a fração 7S (soro a-7S de macaco *Cebus*), analisados por imunodifusão, apresentaram título de 1/32 frente a 500 γ do antígeno homogêneo.

A especificidade deste anti-soro foi analisada através de experimentos de imunodifusão e imunoeletroforese.

O soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* reagiu com as proteínas homólogas do soro de macaco *Cebus*, apresentando, na análise imunoeletroforética, 3 linhas de precipitação (Fig. 4).

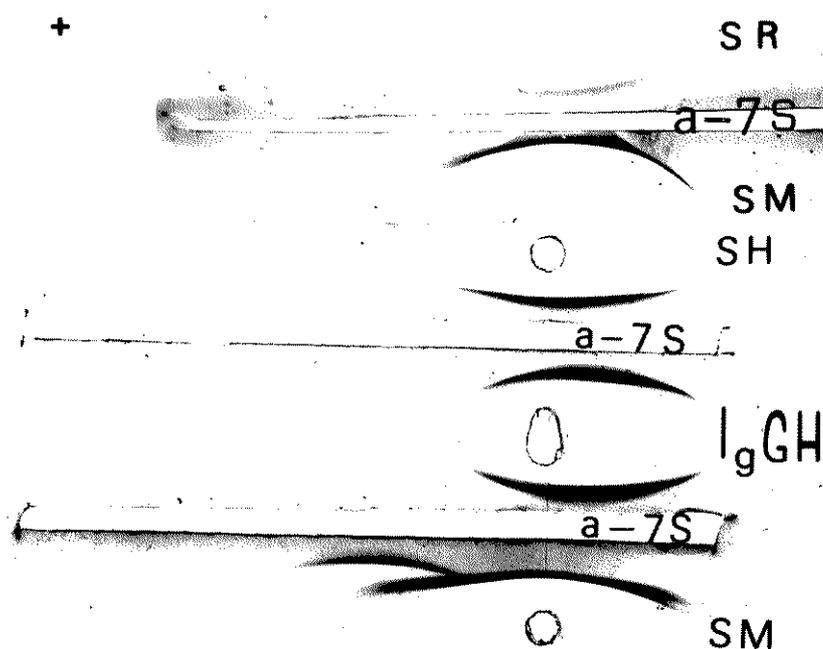


Fig. 4- Imunoeletroforese de soro de macaco *Cebus* (SM, 5 mg/ml), soro de macaco rhesus (SR, 5 mg/ml), soro humano (SH, 5 mg/ml), IgG humana (IgGH, 1 mg/ml), frente a soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* (a-7S).

Pelo menos duas destas linhas, pela sua mobilidade eletroforética, parecem corresponder a imunoglobulinas da classe IgG.

O soro a-7S reagiu cruzadamente com proteínas do soro humano e do soro de macaco rhesus, que muito provavelmente pertencem à classe IgG. Este soro reagiu com a fração IgG isolada de soro humano (Fig. 4).

O soro a-7S, na imunoeletroforese cruzada de LAURELL, frente a soro de macaco *Cebus*, reconheceu três componentes antigenicamente relacionados (Fig. 5).

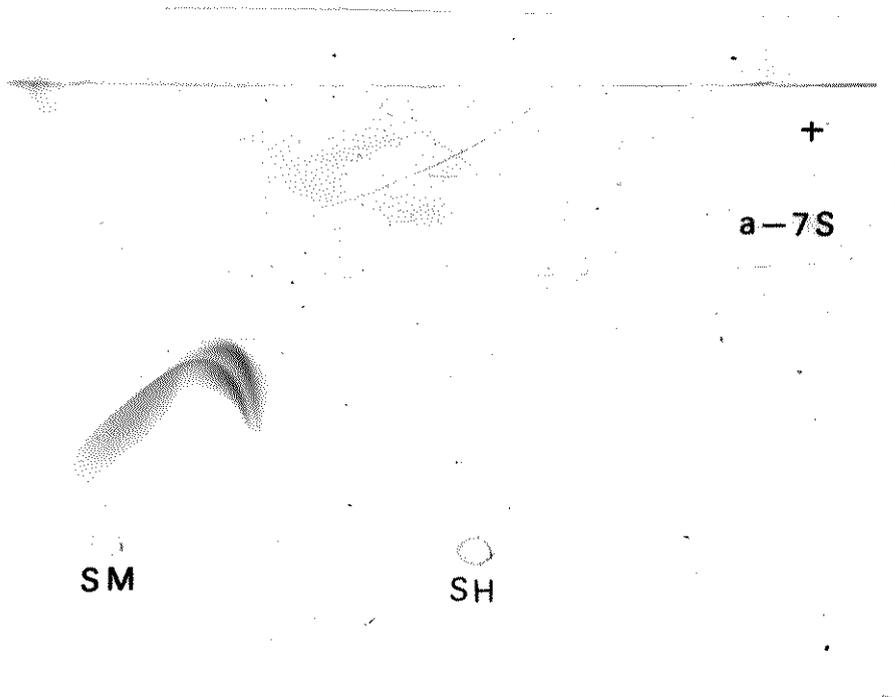


Fig. 5- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro de macaco *Cebus* (SM, 10 μ l) e soro humano (SH, 10 μ l) frente a soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* (a-7S) diluído a 1/30.

Este anti-soro reagiu cruzadamente com uma proteína do soro humano, apresentando, na imunoeletroforese cruzada, um único arco de precipitação (Fig. 5).

Experimentos de imunodifusão revelaram que o soro a-7S reagiu cruzadamente com IgG humana, mas não reagiu com IgM e nem com IgA humana (Fig. 6).

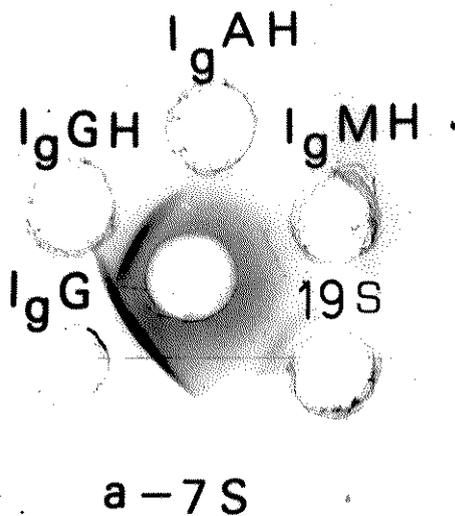


Fig. 6- Imunodifusão (OUCHTERLONY) de IgG de macaco *Cebus* (IgG, 1 mg/ml), IgG, IgM e IgA humanas (IgGH, IgMH, IgAH, 1 mg/ml) e fração F.1 (19S, 500 γ /ml) frente a soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* (a-7S).

Em concordância com os achados referidos, este soro não reagiu com as cadeias leves k e λ isoladas de IgG humana, como demonstrado na Fig. 7.

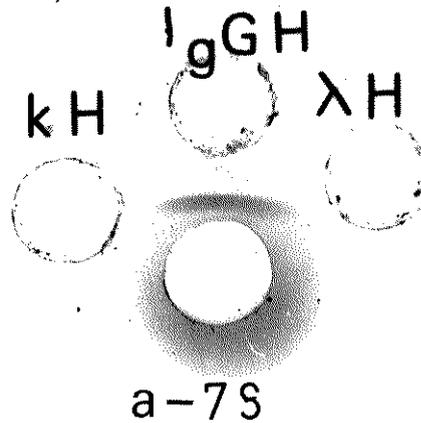


Fig. 7- Imunodifusão (OUCHTERLONY) de IgG humana (IgGH, 1 mg/ml) e cadeias k e λ (500 γ /ml) isoladas de IgG humana frente a soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* (a-7S).

Quando os soros humano, de macaco rhesus e de macaco *Cebus* foram comparados em experimentos de imunodifusão, frente ao soro a-7S, verificou-se a existência de reação de identidade parcial entre soro de macaco *Cebus* e os soros humano e de macaco rhesus e reação de identidade entre soro humano e de macaco rhesus (Fig. 8).

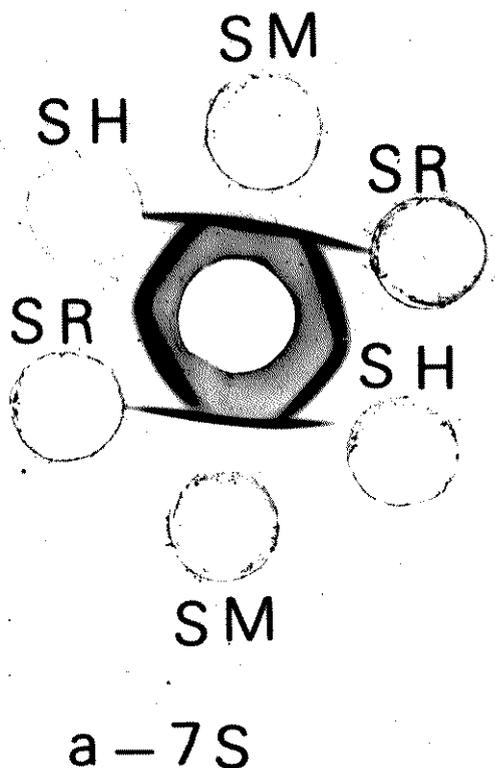


Fig. 8- Imunodifusão (OUCHTERLONY) de soro humano (SH, 5 mg/ml), soro de macaco rhesus (SR, 5mg/ml) e de soro de macaco *Cebus* (SM, 5 mg/ml) contra soro de coelho a-7S de macaco *Cebus* (a-7S).

Para comprovar que os componentes antigenicamente relacionados detectados pelo soro a-7S correspondiam a imunoglobulinas da classe IgG (Fig. 5), utilizamos a imunoeletro

forese cruzada com absorção de antígenos no gel intermediário.

Na imunoeletroforese cruzada de soro de macaco *Cebus* frente ao soro a-7S, incorporamos um soro de carneiro anti-IgG humana ao gel intermediário, antes da corrida na segunda dimensão.

O soro a-IgG humana reagiu com a IgG presente no soro de macaco, alterando a reação homóloga com o soro a-7S.

Por outro lado, na imunoeletroforese cruzada de soro humano frente a soro a-7S, o soro a-IgG humana absorveu a IgG homóloga, alterando a reação heteróloga com o soro a-7S.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos experimentos de imunodifusão, donde concluímos que os anticorpos presentes no soro a-7S estão dirigidos contra os determinantes da IgG, e que provavelmente são específicos para os determinantes presentes na cadeia pesada desta imunoglobulina.

3.3- ESTUDO DA FRAÇÃO 19S

A fração F.1 (19S) foi concentrada através de ultratrafiltração e submetida à eletroforese preparativa em bloco de amido, tendo sido coletadas 3 frações (F.1.A, F.1.B e F.1.C), como apresentado na Fig. 9.

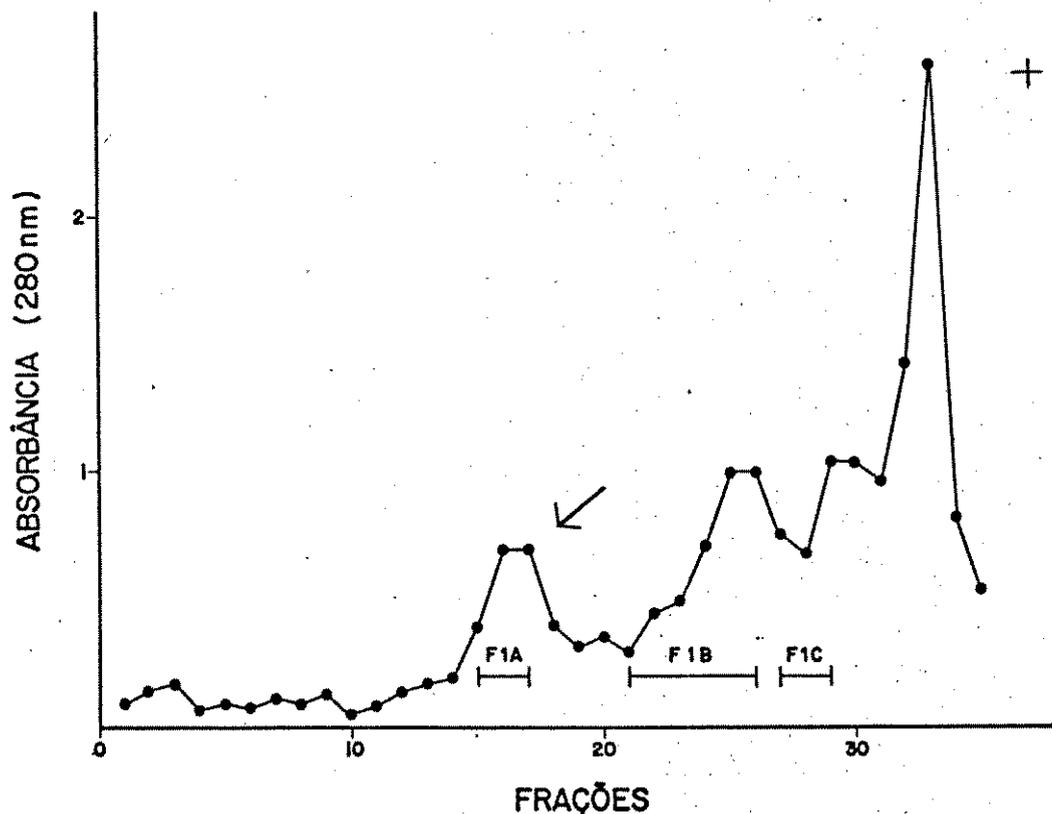


Fig. 9- Eletroforese preparativa em bloco de amido da fração F.1 (19S). A seta indica o local de aplicação da amostra.

As frações foram testadas por imunoeletroforese frente a soro de coelho a-SM e soro de cavalo a-SH.

A fração F.1.B foi escolhida para a imunização de coelhos, com vistas à obtenção de um soro monoespecífico contra IgM de macaco *Cebus*.

Os soros obtidos de coelhos imunizados com a fração F.1.B (Soro anti-19S de macaco *Cebus*), analisados por imu

nodifusão, apresentaram título de 1/16 frente a 500 γ de antígeno homólogo.

A especificidade do soro anti-19S de macaco *Cebus* foi analisada através de experimentos de imunoeletroforese e imunodifusão.

O soro anti-19S de macaco *Cebus* reagiu, na imuno eletroforese, com uma proteína do soro de macaco *Cebus*, apresentando somente uma linha de precipitação (Fig. 10). No entanto, a mobilidade eletroforética desta proteína não é característica de IgM¹⁸.

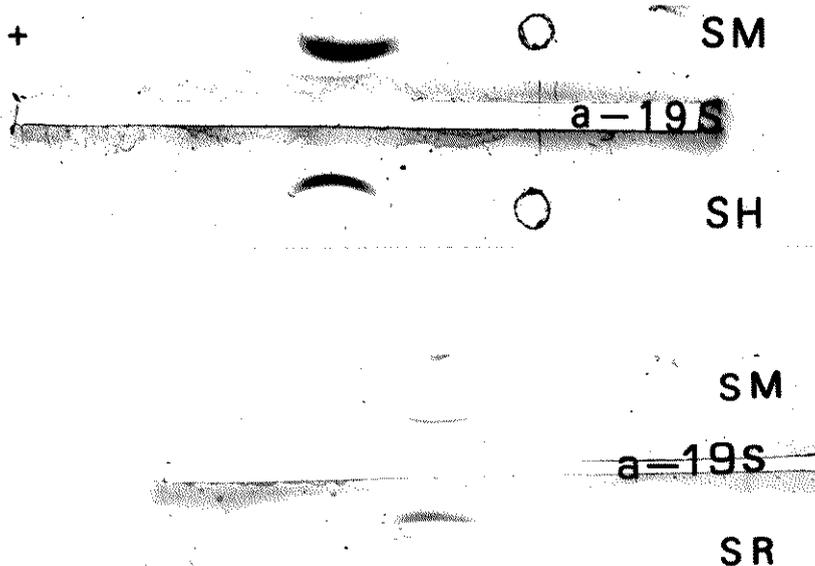


Fig. 10- Imunoeletroforese de soro de macaco *Cebus* (SM, 5 mg/ml), soro de macaco rhesus (SR, 5 mg/ml) e soro humano (SH, 5 mg/ml), frente a soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S).

O soro a-19S reagiu cruzadamente com proteínas do soro humano e do soro de macaco rhesus (Fig. 10). O padrão eletroforético da reação heteróloga foi muito semelhante ao obtido para a reação homóloga.

Na imunoeletroforese cruzada de LAURELL, o soro a-19S de macaco *Cebus* reagiu com três componentes do soro de macaco *Cebus*. Este anti-soro reagiu cruzadamente com uma proteína do soro humano, apresentando apenas um arco de precipitação (Fig. 11).

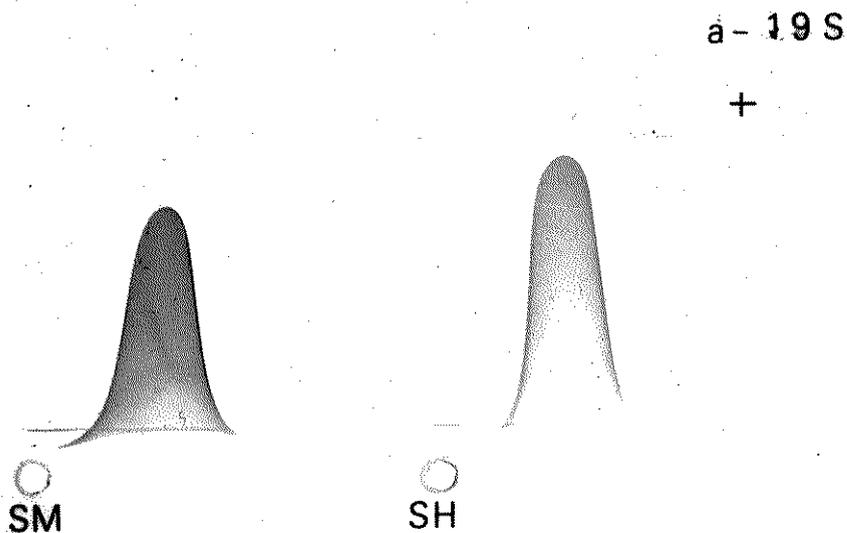


Fig. 11- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL do soro de macaco *Cebus* (SM, 10 μ l) e do soro humano (SH, 10 μ l), frente a soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S), diluído a 1/30.

A fim de verificar se algum dos componentes detectados pelo soro a-19S corresponderia à IgM de macaco, utilizamos a imunoeletroforese cruzada de LAURELL com absorção de antígenos no gel intermediário.

Um soro de coelho a-IgM humana foi incorporado ao gel intermediário antes da corrida na segunda dimensão. Como demonstrado na Fig. 12, o soro padrão a-IgM humana reagiu com a IgM presente no soro de macaco *Cebus*, mas não alterou a reação homóloga do soro a-19S.

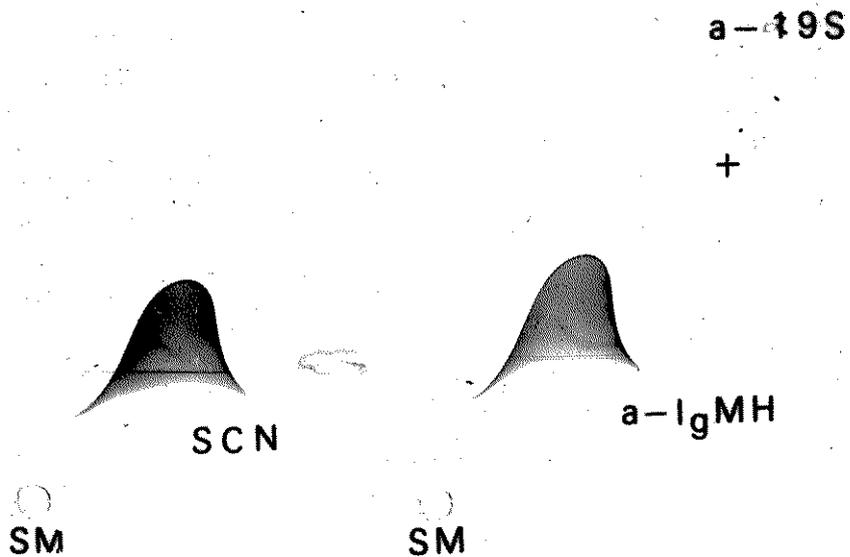


Fig. 12- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro de macaco *Cebus* (SM, 10 μ l), frente a soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S) diluído a 1/30. À esquerda, 40 μ l de soro de coelho normal (SCN) foram incorporados ao gel intermediário, como controle; à direita, foram incorporados ao gel intermediário 40 μ l de soro de coelho a-IgM humana (soro padrão).

Do mesmo modo, o soro a-IgM humana não alterou a reação do soro a-19S com as proteínas do soro humano (Fig.13).

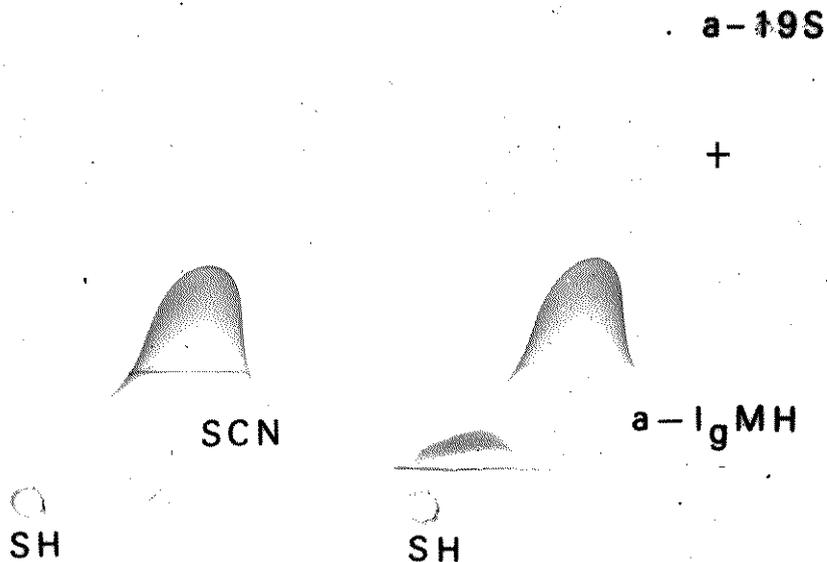


Fig. 13- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro humano (SH, 10 μ l) frente a soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S) diluído a 1/30. À esquerda, foram adicionados 40 μ l de soro de coelho normal (SCN) ao gel intermediário, como controle; à direita, foram incorporados 40 μ l de soro de coelho a-IgM humana (a-IgMH).

Continuando a análise deste anti-soro, realizamos uma imunoeletroforese cruzada do soro humano contra um soro de cavalo anti-soro humano total, utilizando o soro de coelho anti-19S de macaco *Cebus* no gel intermediário. Como demonstrado na Fig. 14, o soro a-19S reagiu com uma proteína do soro humano que, pela sua mobilidade eletroforética, parecia corresponder a α_2 -macroglobulina¹⁸.

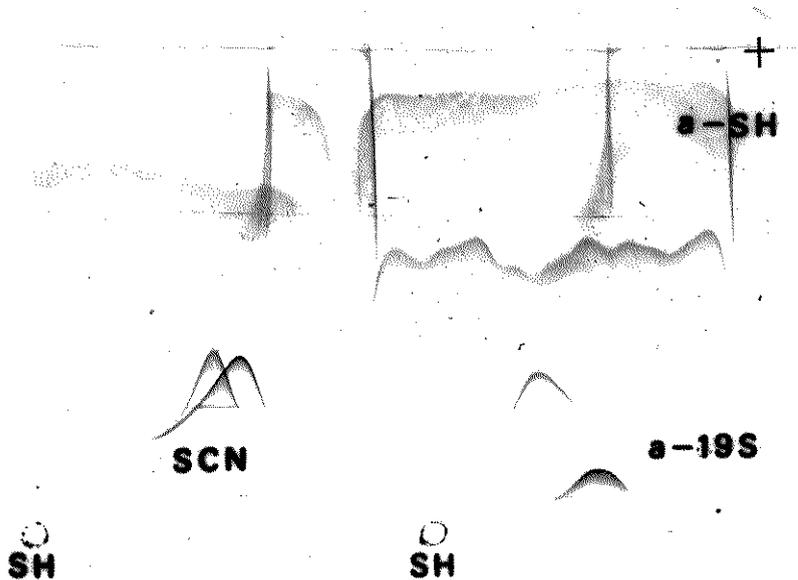


Fig. 14- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro humano (SH, 10 μ l) frente a soro de cavalo anti-soro humano total (a-SH) diluído a 1/90. À esquerda, 40 μ l de soro de coelho normal (SCN) foram incorporados ao gel intermediário, como controle; à direita, 40 μ l de soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* foram incorporados ao gel intermediário.

Esta hipótese foi confirmada quando realizamos uma imunoeletroforese cruzada do soro humano frente a soro a-19S de macaco *Cebus*, utilizando um soro de coelho anti- α_2 macroglobulina humana, no gel intermediário (Fig. 15).

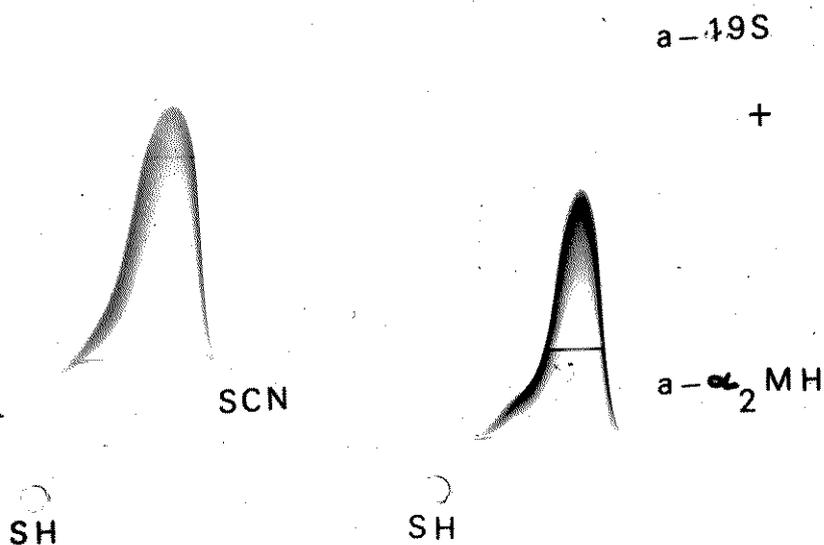


Fig. 15- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro humano (SH, 10 μ l), contra soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S), diluído a 1/30. À esquerda, 40 μ l de soro de coelho normal (SCN) foram adicionados ao gel intermediário, como controle; à direita, 40 μ l de soro de coelho a- α_2 macroglobulina humana (a- α_2 MH) foram incorporados ao gel intermediário.

O soro a- α_2 macroglobulina humana absorve uma parte da α_2 macroglobulina presente no soro humano e altera a reação heteróloga com o soro a-19S de macaco *Cebus*.

O soro a- α_2 M humana também absorve a α_2 M presente no soro de macaco e altera a reação homóloga com o soro a-19S (Fig. 16).

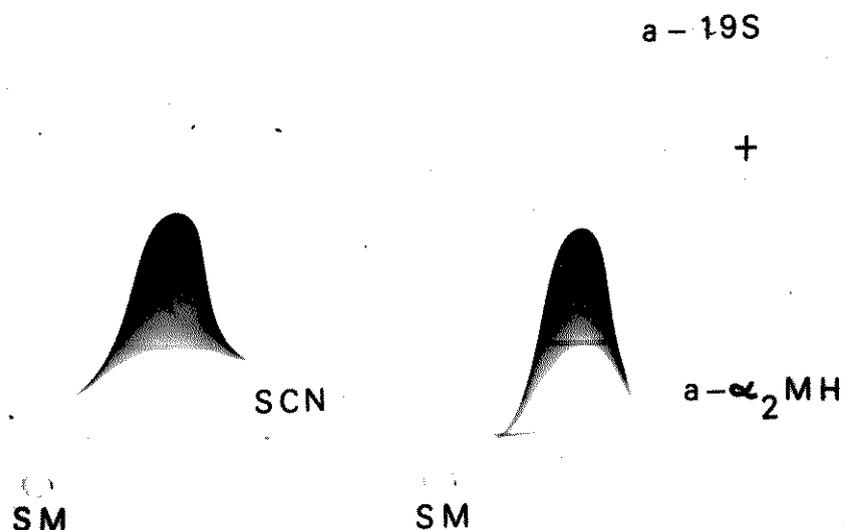


Fig. 16- Imunoeletroforese cruzada de LAURELL de soro de macaco *Cebus* (SM, 10 μ l), frente a soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* diluído a 1/30. À direita, 40 μ l de soro padrão a- α_2 M humana (a- α_2 MH) foram incorporados ao gel intermediário; à esquerda, 40 μ l de soro de coelho normal (SCN) foram incorporados ao gel intermediário, como controle.

Com base nestes testes foi possível concluir que o soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* reagiu especificamente com a α_2 -M e foi denominado soro anti- α_2 macroglobulina

Quando os soros humano, de macaco rhesus e de macaco *Cebus* foram comparados, em experimentos de imunodifusão, frente ao soro a-19S, verificou-se a existência de reação de identidade parcial entre soro de macaco *Cebus* e os soros humano e de macaco rhesus e reação de identidade entre soro humano e de macaco rhesus (Fig. 17).

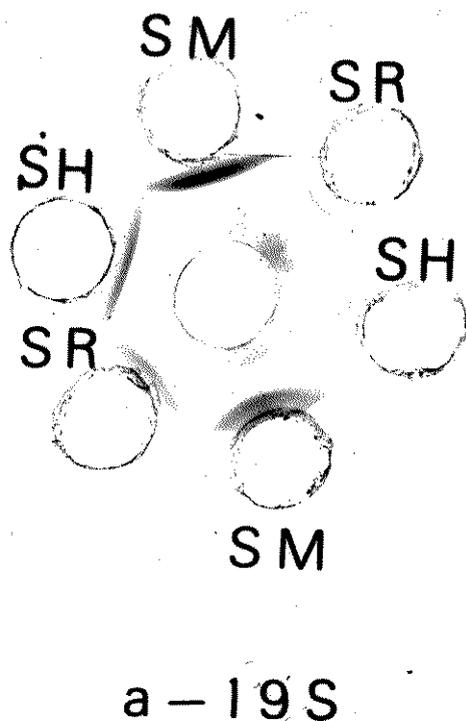


Fig. 17- Imunodifusão (OUCHTERLONY) de soro humano (SH, 5 mg/ml), soro de macaco rhesus (SR, 5 mg/ml) e soro de macaco *Cebus* (SM, 5 mg/ml) contra soro de coelho a-19S de macaco *Cebus* (a-19S).

O soro a- α_2 M de macaco *Cebus* foi comparado com o soro padrão a- α_2 M humana através de uma imunoeletroforese linear de soro humano (Fig. 18).

Podemos observar que a reação heteróloga é muito semelhante à reação homóloga, o que sugere uma íntima relação antigênica entre α_2 -M humana e α_2 -M de macaco *Cebus*.

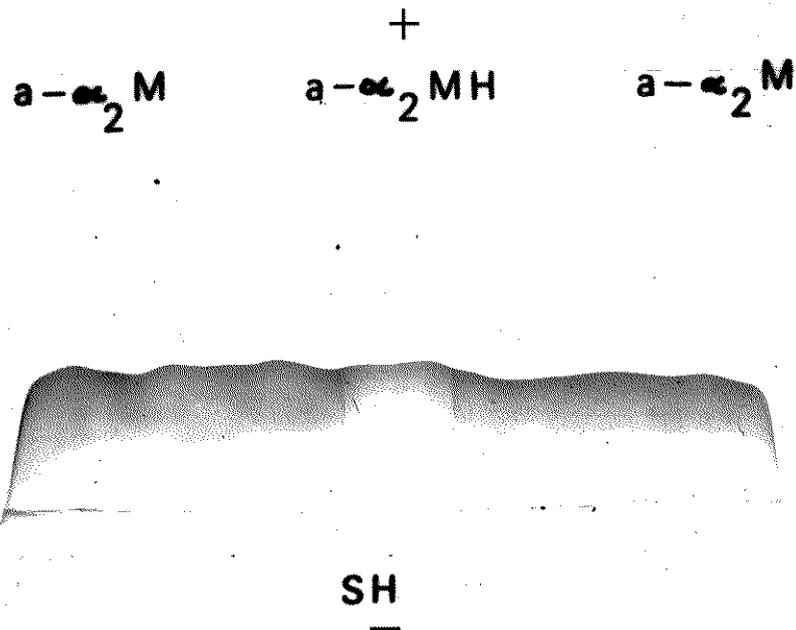


Fig. 18- Imunoeletroforese linear de soro humano (SH, 50 μ l) frente a soro de coelho a- α_2 M de macaco *Cebus* (a- α_2 M) diluído a 1/30 nas porções laterais e soro padrão a- α_2 M humana diluído a 1/30 (a- α_2 MH) no gel do centro.

4- DISCUSSÃO

Vários autores, utilizando anti-soros contra proteínas humanas, compararam as imunoglobulinas humanas e de primatas não humanos^{1, 4-8, 33-35}.

Todos estes autores observaram reatividade cruzada entre as imunoglobulinas e relacionaram este fato à proximidade filogenética existente entre as espécies.

Já em 1904, NUTALL³⁷ observava que a intensidade das reações heterólogas estava relacionada com a semelhança morfológica entre as espécies estudadas.

A verificação de que um anti-soro homólogo contra as proteínas do soro de macaco *Cebus* também apresenta reatividade cruzada com as proteínas do soro humana e do soro de macaco rhesus, vem corroborar a idéia da possibilidade da utilização destes animais como modelos experimentais para o estudó das doenças humanas.

Embora a reação cruzada forneça uma quantidade limitada de informação sobre os determinantes antigênicos de uma proteína, seu estudo ainda é uma alternativa prática para a demonstração de similaridades estruturais e como tal pode funcionar como um indicador para o estabelecimento de homologia entre classes de imunoglobulinas³⁵.

Neste contexto se inserem os resultados por nós obtidos sobre a especificidade do soro de coelho anti-7S de macaco *Cebus*.

Quando testado por imunodifusão com as diferentes classes de imunoglobulinas humanas, este soro reagiu apenas com a IgG humana, e não reagiu com as cadeias leves κ e λ isoladas de IgG humana.

Estes resultados sugerem que os anticorpos presentes no soro anti-7S são específicos para determinantes antigênicos da cadeia pesada da IgG e apontam à existência de homologia entre as cadeias pesadas das imunoglobulinas humanas e de macaco *Cebus*.

Contudo essa hipótese deve ser analisada com cautela porquanto é necessário levar em consideração vários fatores, tais como a influência da espécie de animal no qual este anti-soro foi produzido bem como a técnica de imunização e os procedimentos subsequentes para a produção deste anti-soro⁷.

A natureza do antígeno utilizado para a imunização também deve ser considerada. Uma imunoglobulina é uma proteína, e, como tal, contém vários determinantes antigênicos diferentes cada um dos quais pode induzir à formação de anticorpos correspondentes²².

O resultado de uma análise de reação cruzada depende da presença no anti-soro dos vários anticorpos determinante-específicos e de sua relação quantitativa.

Se duas moléculas diferentes possuem um ou mais grupos em comum, elas geralmente reagem cruzadamente.

Embora a maioria dos grupos determinantes das proteínas sejam "conformacionais", representando um arranjo tridimensional de um grupo de aminoácidos, a base da homologia entre classes de imunoglobulinas está centrada no estabelecimento de similaridade significativa da estrutura primária, ou seja, nos determinantes "seqüenciais"^{39, 43, 44}.

Portanto, o estudo da homologia entre as imunoglobulinas humanas e de outros primatas deveria ser complementado por uma análise da composição de aminoácidos (estrutura primária) das cadeias pesadas destas imunoglobulinas.

A imunização de coelhos com a fração F.l.B, que deveria conter IgM, resultou num soro que contém anticorpos contra determinantes da α_2 -macroglobulina, como foi demonstrado pelas técnicas de imunoeletroforese cruzada de LAURELL com absorção de antígenos no gel intermediário.

A fração 19S obtida por cromatografia de soro de macaco *Cebus* em Sephadex G-200 é rica em proteínas com alto peso molecular, como a haptoglobina, IgM, IaA e α_2 -macroglobulina⁴⁸.

O processo de purificação da IgM inclui uma eletroforese preparativa em bloco de amido a qual exige uma diálise prévia do material (fração 19S) no tampão que vai ser utilizado para a eletroforese (tampão veronal 0,05M, $\mu = 0,02$, pH 8,6).

Nesta diálise, forma-se um precipitado o qual é eliminado. Como a IgM precipita quando a força iônica é baixa, este precipitado deve conter uma quantidade razoável de IgM.

Isto vem demonstrar como, num processo de purificação de uma determinada proteína, uma simples operação como a diálise pode concentrar determinados componentes e diminuir a concentração de outros.

Além disso, deve ser considerado o problema da imunogenicidade das diferentes proteínas.

A fração F.l.B, mesmo contendo IgM, embora em baixa concentração, suscitou o aparecimento de anticorpos dirigidos contra determinantes da α_2 -macroglobulina, o que sugere a grande imunogenicidade desta proteína.

Ademais, os resultados obtidos reforçam a necessidade do estudo cuidadoso da especificidade dos anti-soros, antes que estes sejam utilizados extensivamente.

Uma série de fatores devem, pois, ser considerados quando se deseja obter um soro monoespecífico para IgM de primatas.

Em primeiro lugar, devemos estar atentos para a concentração da IgM no material inicial.

No soro normal de macaco rhesus a concentração de IgM é de aproximadamente 0,8 mg/ml³⁴.

Não possuímos informações a respeito da concentração de α_2 -macroglobulina no soro de primatas não-humanos, mas sabemos que a concentração desta proteína no soro humano é de aproximadamente 2,0 mg/ml¹⁹.

De posse destes dados e fazendo uma estimativa para o soro de macaco *Cebus*, verificamos que o soro normal deste animal não constitui um material adequado para o isolamento de IgM.

Para esta finalidade, deveríamos utilizar um soro no qual a concentração de IgM estivesse aumentada, por exemplo, um soro imune de macaco *Cebus* com doença infecciosa na fase aguda, ou soro de animal portador de mieloma.

Por outro lado, devemos evitar trabalhar com tampoes de baixa força iônica, pois isto leva a uma precipitação da IgM e conseqüente diminuição de sua concentração no material.

Outra alternativa seria a eliminação da α_2 -macroglobulina presente no material inicial, onde poderíamos utilizar a cromatografia de afinidade^{14, 15}. Um soro anti- α_2 macroglobulina de macaco *Cebus* seria fixado à coluna e o material a ser utilizado para a purificação de IgM seria cromatografado previamente nesta coluna. Este procedimento eliminaria toda a α_2 -macroglobulina eventualmente presente no material.

No isolamento e purificação de IgM a partir de

soro de macaco *Cebus*, podemos também nos valer da reatividade cruzada apresentada pelo soro anti-IgM humana quando testado com soro de macaco *Cebus*, em experimentos de imunoeletroforese.

Neste sentido, poderíamos preparar precipitados específicos (IgM de macaco *Cebus*-anti-IgM humana) e imunizar animais com estes complexos.

Nossos resultados demonstram que é possível obter anticorpos contra IgG de macaco *Cebus* e as reações cruzadas com imunoglobulinas humanas confirmam a possibilidade de obtenção de anticorpos contra outras classes de imunoglobulinas presentes no soro deste animal.

No comércio encontram-se disponíveis anti-soros contra imunoglobulinas humanas e de macaco rhesus, porém a aquisição destes soros torna-se muito dispendiosa por se tratar de materiais importados.

Além disso, ao se utilizar o macaco *Cebus* como modelo experimental, é importante trabalhar com soros homólogos contra suas imunoglobulinas, uma vez que através destes soros poderíamos obter reações mais específicas.

5- CONCLUSÃO

Este trabalho foi realizado com a finalidade de se obter anti-soros específicos para proteínas plasmáticas do macaco *Cebus* sp. e estudar as reações cruzadas entre estas proteínas e aquelas presentes no soro humano e soro de macaco rhesus.

Os resultados obtidos mostraram que:

a)- O soro a-7S contém anticorpos dirigidos contra determinantes presentes na cadeia pesada da IgG tendo reagido cruzadamente com IgG humana e soro de macaco rhesus.

b)- O soro a-19S contém anticorpos dirigidos contra os determinantes da α_2 -macroglobulina tendo reagido cruzadamente com esta proteína contida no soro humano e de macaco rhesus.

Em vista desses resultados obtidos podemos concluir que:

5.1- É possível utilizar as reações cruzadas entre imunoglobulinas humanas e de macaco *Cebus* no isolamento das outras classes de imunoglobulinas de macaco e na obtenção dos soros específicos contra estas imunoglobulinas.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ACHARYA, U.S.V.; POULIK, M.D. & GOODMAN, M. Phylogeny of imunoglobulins IgG, IgA and IgM. *Fedn. Proc.*, 27:490, 1968.
- 2 - AXELSEN, N.H.; KROLL, J. & WEEKE, B. *A manual of quantitative immunoelectrophoresis: methods and applications*. Oslo, Universitetsforlaget, 1973, p. 37-56, 61-67, 72-77.
- 3 - BALNER, H.; GABB, B.W.; DERFANT, H.; von VREERWIJK, W. & von ROOD, R.J. Major histocompatibility locus of rhesus monkey (RhL-A). *Nature (lond.)*, 230:177, 1971.
- 4 - BAUER, K. The occurrence of antigenic determinants of human plasma proteins in animal plasmas. *Humangenetik*, 8:27, 1969. (ingl.).
- 5 - ———. An immunological time scale for primate evolution consistent with fossil evidence. *Humangenetik*, 10:344-350, 1970. (ingl.).
- 6 - ———. The antigenic determinants of several human plasma proteins. Their determination from the investigation of the cross-reactions between human and other mammalian plasmas. *Int.J.Prot.Res.*, 2:137-145, 1970.
- 7 - ———. Cross-reactions between human and animal plasma proteins. V - The role of antiserum and immunological specificity in relation to the phenomenon of cross-reaction. *Humangenetik*, 21:179-192, 1974. (ingl.).
- 8 - ———. ———. VI - Assay method for ape and monkey plasma proteins using anti human antisera. *Humangenetik*, 21:273-278, 1974. (ingl.).

- 17- GOLDSMITH, E.I.; MOOR-JANKOWSKI, J. & DAVIS, J. Improved resource utilization through animal and facilities sharing at the laboratory for experimental medicine and surgery in primates. In: HARMISON, L.T., ed. *Research Animals in Medicine*. Washington, D.C., National Heart and Lung Institute, 1973, p. 1047.
- 18- GRABAR, P. & BURTIN, P. *Immuno-electrophoretic analysis*. New York, Elsevier, 1964, p. 3-29, 94-124.
- 19- HEIMBURGER, N. Proteinase inhibitors of human plasma. Their properties and control functions. In: REICH, E.; RIFKIN, D.B. & SHAW, E. ed. *Proteases and biological control*. Cold Spring Harbor Lab., 1975, p.367-86.
- 20- HSU, S.Y. Li & HSU, H.F. Serum protein changes in rhesus monkeys during immunization and following challenge by *S.japonicum*. *Z.Tropenmed.Parasit.*, 15:43-56, 1964.
- 21- KABAT, E.A. The molecular weight of antibodies. *J.exp. Med.*, 69:103-118, 1939.
- 22- ———. The nature of an antigenic determinant. *J.Immunol.* 97:1-11, 1966.
- 23- KUNKEL, H.G. & SLATER, R.J. Electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc.Soc. Expl.Biol. Med.*, 80:42, 1952.
- 24- KUNTZ, R.E.; MYERS, B.J.; MOORE, J.A. e col. *S.haematobium*: Experimental infection in capuchin monkey, *Cebus apella*. *Exp.Parasitol.*, 29:33-41, 1971.
- 25- LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S.J. & CALDWELL, J. An experimental model for immunological studies of dental caries in the rhesus monkey. *Arch.oral Biol.*, 20:299, 1975.

- 26- LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S.J. & CALDWELL, J. Immunological basis for vaccination against dental caries in rhesus monkey. *J.dent.Res.*, 55: C166, 1976.
- 27- LIMA, A.O. & SILVA, W.D. *Imunologia, imunopatologia e alergia: métodos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970, p. 30, 37, 537.
- 28- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol.Chem.*, 193:265, 1951.
- 29- MADDISON, S.E.; HICKLIN, M.D. & KAGAN, I.G. Protective immunity to *S.mansoní* in the rhesus monkey conferred by a combination of transfer factor and hyperimmune serum. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF TROPICAL MEDICINE, 99, 1973, v.2, p. 98-9.
- 30- MADDISON, S.E.; GEIGER, S.J. & KAGAN, I.G. *S.mansoní*: Immunity in *Macaca mulatta*. *Exp. Parasitol.*, 29:463-479, 1971.
- 31- MAGALHÃES, A.F. Reações de hipersensibilidade em macacos *Cebus* infestados com *S.mansoní*. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo*, 3(5): 239-253, 1961.
- 32- MICHELI, A. & ISLIKER, H. Cleavage of gamma-M-globulin by means of reducing enzyme systems. *Immunochemistry*, 3: 385, 1966.
- 33- MONTE, V. & ARBESMAN, C.E. Immunoglobulins of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fedn.Proc.*, 28: 820, 1969.
- 34- MONTE-WICHER, V.; WICHER, K. & ARBESMAN, C.E. Comparative studies of monkey and human immunoglobulins. *Immunochemistry*, 7:839-849, 1970.

- 35- NEOH, S.H.; JAHODA, P.M.; ROWE, D.S. & VOLLER, A. Immunoglobulins in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human immunoglobulins. Immunochemistry, 10:805-813, 1973.
- 36- NEWCOMB, R.W.; NORMANSELL, D. & STANWORTH, D.R. A structural study of human exocrine IgA globulin. J.Immunol., 101(5):905-914, 1968.
- 37- NUTALL, G.H.F. *Blood immunity and blood relation*. Apud: BAUER, K. An immunological time scale for primate evolution consistent with fossil evidence. Humangenetik, 10:344-350, 1970. (ingl.).
- 38- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr.Allerg., 5:78, 1958.
- 39- REICHLIN, M. Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. Adv.Immunol., 20:71-123, 1975.
- 40- ROGENTINE, G.N.; VALL, L.; ELLIS, E.B. & DARROW, C.C. Rhesus lymphocyte alloantigens. Identification of a major alloantigen system. Transplantation, 12: 267, 1971.
- 41- SADUN, E.H.; LICHTENBERG, F. von & BRUCE, J.I. Susceptibility and comparative pathology of ten species of primates exposed to infection with *S. mansoni*. Am.J.trop.med.Hyg., 15:705-718, 1966.
- 42- SCHENKEL, R. Monkeys for research. Brit.med.J., 4:421-422, 1973.
- 43- SELA, M. Role of conformation in antigenicity and in antibody specificity. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMISTRY, 7^o, Tokyo, 1967, 2 p.