

CLAUDIO LUCIO ROSSI

"PRODUÇÃO DE ANTICORPOS HOMOCITOTRÓPICOS EM CAMUNDONGOS PARA A IgG DE COELHO E PARA OS FRAGMENTOS Fab E Fc".

TESE DE MESTRADO

apresentada ao Curso de Pós-
-Graduação em Microbiologia e
Imunologia da Universidade Es-
tadual de Campinas.

CAMPINAS/1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Orientador

Dr. IVAN MOTA

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia da OPS/OMS, Instituto Butantan, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ivan Mota, pela orientação e compreensão;

Aos funcionários do Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia, pela colaboração;

Ao Dr. Luiz S. Prigenzi, pelo incentivo;

Aos meus pais, pelo apoio;

À Vera e à Ana Claudia, pelo estímulo.

ÍNDICE

	página
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	8
1. Animais	8
2. Reagentes usados	8
3. Hemácias de carneiro	9
4. Precipitação com sulfato de amônio ...	9
5. Cromatografia em coluna	10
a. Cromatografia em DEAE-celulose	10
b. Cromatografia em CM-celulose	11
6. Imunoeletroforese	12
7. Digestão enzimática	12
8. Imunização de coelhos com soro albumi- na bovina	13
9. Imunização de coelhos com hemácias de carneiro	13
10. Imunização de camundongos com IgG, Fab e Fc	14
a. Usando hidróxido de alumínio como adjuvante	14
b. Usando adjuvante completo de Freund	15
11. Avaliação dos anticorpos IgE e IgG ₁ por reação de anafilaxia passiva cutâ- nea (PCA)	15
12. Avaliação de anticorpos aglutinantes para a IgG	16

III. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
IV. RESULTADOS	20
1. Obtenção de IgG de coelho	20
2. Obtenção dos fragmentos Fab e Fc	21
3. Produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG íntegra e para os fragmentos Fab e Fc	24
4. Produção de anticorpos homocitotrópicos para Fab I e Fab II	25
5. Produção de anticorpos aglutinantes para a IgG	26
6. Produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG, Fab e Fc usando adjuvante completo de Freund	27
7. Especificidade dos anticorpos homocitotrópicos anti-Fab e anti-Fc	28
8. Influência da linhagem de camundongo para a produção de anticorpos homocitotrópicos anti-IgG	29
V. DISCUSSÃO	30
VI. RESUMO E CONCLUSÕES	37
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

I. INTRODUÇÃO

No curso de uma resposta imune os antígenos exibem duas propriedades distintas, a imunogenicidade e a antigenicidade. Por imunogenicidade entende-se a capacidade do antígeno de induzir uma resposta imune humoral, que se traduz pela produção de anticorpos, ou uma resposta mediada por células que resulta na produção de linfócitos sensibilizados. O termo antigenicidade refere-se a capacidade do antígeno de interagir com os anticorpos ou com os receptores dos linfócitos sensibilizados de maneira específica (ARNON & GEIGER, 1977).

A região da molécula do antígeno que reage com o sítio ativo dos anticorpos ou com os receptores de antígeno dos linfócitos é denominada determinante antigênico. Embora as proteínas possuam numerosos determinantes antigênicos potencialmente imunogênicos, somente um número limitado destes, geralmente aqueles elementos estruturais que se projetam da massa central do antígeno, são imunodominantes, isto é, exercem uma maior influência na determinação da especificidade dos anticorpos ou dos linfócitos sensibilizados (KABAT, 1966).

Nos antígenos proteicos é possível distinguir determinantes antigênicos sequenciais e conformacionais. Determinantes sequenciais têm a sua especificidade dependente da sequência de aminoácidos da cadeia peptídica e em consequência os anticorpos contra estes determinantes geral

mente reagem com cadeias peptídicas de sequência igual ou similar. Por outro lado, o determinante conformacional resulta da conformação espacial da molécula do antígeno e os anticorpos que reconhecem este tipo de determinante não reagem necessariamente com peptídios derivados da mesma região (ARNON & GEIGER, 1977).

A imunogenicidade de uma molécula depende de uma série de fatores (WHO TECHNICAL REPORT SERIES, 1976) entre os quais salientamos:

- Posse de numerosos e diferentes determinantes antigênicos, com configuração estável, de maneira que a população de linfócitos T e B específicos seja relativamente grande.
- Distribuição adequada dos determinantes antigênicos para a interação com os receptores dos linfócitos.
- Presença de determinantes antigênicos que reajam cruzadamente com antígenos com os quais o indivíduo já tenha se imunizado previamente, de modo que haja um número maior de linfócitos T e B potencialmente reativos.
- Capacidade dos macrófagos de fagocitar o antígeno e retê-lo em forma adequada para a apresentação aos linfócitos.
- Estrutura molecular adequada para evitar uma eliminação rápida do organismo. A estrutura molecular é também relevante, na maioria das vezes, entre outros

fatôres, pela multiplicidade dos determinantes antigênicos.

Duas populações de linfócitos estão envolvidas na resposta imune, ambas originárias de células indiferenciadas da medula óssea - a população de linfócitos T e a população de linfócitos B, sendo a primeira responsável pela imunidade mediada por células, além de participar também na regulação da resposta imunológica, e a segunda responsável pela imunidade humoral (RAFF, 1973; BAKER, 1975). Duas subpopulações de linfócitos T estão perfeitamente definidas - a subpopulação de linfócitos T auxiliares e a subpopulação de linfócitos T supressores (BAKER, 1975; DUTTON, 1975; GERSHON, 1980). É fato conhecido que para antígenos timo-dependentes, como a IgG de coelho, há necessidade de linfócitos T auxiliares para a indução da síntese de anticorpos pelos linfócitos B, fenômeno conhecido por cooperação celular (RAFF, 1973). Embora os dados da literatura não sejam claros há evidências sugestivas de que existem diferentes tipos de linfócitos T auxiliares para diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas, tal como ocorre com os anticorpos de classe IgE (KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973; ISHIZAKA, 1980).

Nos últimos anos a subpopulação de linfócitos T supressores tem sido cada vez mais estudada. Em certos sistemas têm-se mostrado que ela pode bloquear a síntese de anticorpos para antígenos timo-dependentes interferindo com a atividade dos linfócitos T auxiliares específicos

ou agindo sobre linfócitos B e plasmócitos, suprimindo a diferenciação dos primeiros e a síntese de anticorpos pelos últimos (TADA, TANIGUHI & TAKEMORI, 1975; GERSHON, 1980).

A resposta imune para um antígeno pode ser inibida ou suprimida pela administração de outro antígeno não relacionado. Este fenômeno, conhecido por competição antigênica, foi descrito pela primeira vez por Michaelis (1902). Este autor observou que a injeção de uma mistura de soro-albumina e soro-globulinas, em coelhos, resultava em uma produção menor de anticorpos anti-soro-albumina do que quando esta era injetada isoladamente.

A competição antigênica pode ser demonstrada na resposta imune humoral ou mediada por células, no decorrer de uma resposta primária ou secundária. Os antígenos envolvidos podem ser timo-dependentes ou timo-independentes, solúveis ou particulados, injetados no mesmo local ou em locais diferentes, simultânea ou sequencialmente (LIA-COPOULOS & BEN-EFRAIM, 1975).

A competição é dita intermolecular se os determinantes antigênicos envolvidos estão localizados em moléculas imunogênicas diferentes. Competição intramolecular, por outro lado, ocorre quando os determinantes antigênicos envolvidos estão localizados em uma mesma molécula imunogênica (TAUSSIG, 1975).

Um bom exemplo de competição intramolecular e intermolecular pode ser demonstrado, respectivamente, com a molécula de IgG e com os fragmentos Fab e Fc, resultantes

da digestão com papaína (PORTER, 1959), quando estes são usados como antígenos, em camundongos, como mostrado pelos estudos de Taussig (1971) e de Taussig & Lachmann (1972). A competição intramolecular é evidenciada pelo fato de que quando a IgG é usada como imunógeno há uma boa resposta para o Fc, em contraste com uma resposta fraca para o Fab, avaliadas pela técnica de hemaglutinação passiva. Por outro lado, se o fragmento Fab for injetado isoladamente há uma boa resposta anti-Fab, mostrando que este é um bom imunógeno. Parece, portanto, que na molécula íntegra de IgG, existe competição entre os fragmentos Fab e Fc, possuindo este último os determinantes imunogênicos dominantes. Os fragmentos Fab e Fc, uma vez isolados, podem também ser administrados como uma mistura. Neste caso, pode também ser evidenciada uma competição, agora intermolecular, entre os fragmentos, com a presença do Fc, em determinadas condições experimentais, inibindo a resposta dos anticorpos anti-Fab.

Ao pesquisarmos a bibliografia referente à competição antigênica verificamos que, na grande maioria dos trabalhos sobre este fenômeno, a resposta humoral foi avaliada sempre pela determinação de anticorpos aglutinantes, sem especificação de classe, subclasse ou atividade biológica dos anticorpos envolvidos. Diante disto, nos pareceu de interêsse estudar a resposta humoral de camundongos para a IgG de coelho e seus fragmentos Fab e Fc, através da produção de anticorpos homocitotrópicos desta espécie (IgE e IgG₁), procurando verificar se nestas condições, ocorreria

também o fenômeno de competição antigênica.

Os anticorpos envolvidos nas reações anafiláticas são parte da heterogeneidade da resposta imune humoral para um determinado imunógeno. Com base em suas propriedades biológicas eles podem ser divididos em duas categorias: *anticorpos homocitotrópicos*, aqueles capazes de mediar reações anafiláticas na espécie que os produziu ou mesmo em outras espécies e *anticorpos heterocitotrópicos*, aqueles incapazes de produzir uma reação anafilática na mesma espécie que os produziu, embora capazes de produzi-la em outras espécies (BECKER, 1971).

Os anticorpos homocitotrópicos, com base em suas propriedades biológicas e físico-químicas, são divididos em dois grupos. Um deles é constituído por imunoglobulinas pertencentes a classe IgE, que se caracterizam por uma persistência prolongada nos tecidos, após sensibilização passiva, por sua termolabilidade e por sua sensibilidade à redução seguida de alquilação. O outro grupo é constituído por imunoglobulinas da classe IgG, que são termoestáveis, usualmente resistentes à redução seguida de alquilação e incapazes de permanecerem nos tecidos por tempo prolongado, usualmente menos de 24 horas (BECKER, 1971).

Durante o curso de experiências em que procurávamos estudar a possível existência de competição antigênica, inter ou intramolecular, em termos de anticorpos homocitotrópicos, entre os fragmentos Fab e Fc da IgG de coelho, notamos que, dentro de determinadas condições, a molécula

de IgG íntegra não se mostrava imunogênica, embora fosse capaz de reagir com anticorpos induzidos pelos seus fragmentos Fab e Fc, nas mesmas condições de imunização. Achamos este fenômeno bastante interessante e passamos a estudá-lo. No presente trabalho relatamos os resultados de nossas experiências.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Coelhos albinos, de ambos os sexos, pesando de 3 a 5 kilos, foram utilizados para a obtenção de IgG e para a produção de anticorpos anti-hemácias de carneiro.

Ratos da linhagem isogênica Lou/M, de ambos os sexos, pesando aproximadamente 100 gr. foram usados para avaliação dos anticorpos da classe IgE, por reação de anafila^{xi}axia passiva cutânea heteróloga.

Camundongos das linhagens isogênicas A/Sn, Balb/c e C57Bl/10J, de ambos os sexos, com aproximadamente 2 meses de idade, foram utilizados para imunização.

Camundongos da linhagem isogênica Balb/c, de ambos os sexos, com 6 semanas de idade, foram usados para avaliação dos anticorpos IgG₁, por reação de anafilaxia passiva cutânea homóloga.

2. Reagentes usados

Ácido acético glacial, ácido dietil barbitúrico, acetato de sódio, azul de Evans, barbital sódico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico (E.Merck, Darmstadt); cloreto de sódio, hidróxido de sódio (ECIBRA Equipamentos Científicos do Brasil S/A); sulfato de amônio

(May & Baker LTD Dagenham, England); cisteína-HCl (K & K Laboratories, Inc., Hollywood, USA); etilenodiaminotetraacetato dissódico (Carlo Erba do Brasil); papaína 1:25 (BBL - Baltimore Biological Laboratories, Inc., Baltimore, USA); p-cloromercuribenzoato de sódio (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, USA); hidróxido de alumínio (Fontoura-Wyeth do Brasil); agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, USA); tolueno (J. T. Baker Chemical, USA); 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA); lactato de cálcio (Drogasil Ltda, Brasil); heparina (Glaxo do Brasil, RJ); CM-celulose (Celulose Ionesnaustauscher, Type CM); DEAE-celulose (Whatman Inc., NJ, USA); ovalbumina de galinha, soroalbumina bovina (Pentex Inc., Kankakee, Illinois, USA); soro de cavalo anti-soro total de coelho (Kallestad Labs., Inc., Minnesota, USA); soro de cabra anti-IgG de coelho (Calbiochem, La Jolla, California, USA).

3. Hemácias de carneiro

Sangue de carneiro foi coletado, de maneira estéril, em frasco contendo solução de Alsever, volume a volume, e deixado a 4° durante 4 dias antes do uso.

4. Precipitação com sulfato de amônio

A fração globulina do soro de coelho foi precipitada com uma solução saturada de sulfato de amônio, a temperatura ambiente. Para cada 100 ml de soro foi adicionado, sob agitação, gota a gota, 50 ml de uma solução satura-

da de sulfato de amônio. A mistura foi deixada sob agitação durante 1 hora e, a seguir, centrifugada, a temperatura ambiente, durante 45 minutos a 3000 rpm. O precipitado foi dissolvido em 5 ml de NaCl 0.15 M e dialisado a 4° contra tampão fosfato de sódio 0.0175 M pH = 6,3, até ficar isento de íons sulfato.

5. Cromatografia em coluna

a) Cromatografia em DEAE-celulose

Foi preparada uma papa de DEAE-celulose misturando 30 gr. de resina com 500 ml de água destilada. Após homogeneização a mistura foi deixada 1 hora a temperatura ambiente. Findo este intervalo, o sobrenadante foi removido por decantação e a resina ressuspensa em 1 litro de uma solução de NaOH 0.5 M e deixada 30 minutos a temperatura ambiente com agitação ocasional. O fluido foi então removido por sucção em funil de Büchner e a resina lavada extensivamente com água destilada, sendo então equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.0175 M pH = 6.3, o qual também foi usado na preparação e eluição da coluna e ainda para a diálise da amostra a ser processada.

Aliquotas de 10 ml de soluções contendo 30 a 40 mg de proteína/ml foram aplicadas às colunas de 5x75 cm e eluídas com o tampão de equilíbrio, a 5°, a uma velocidade de fluxo de 30 ml/hora. O efluente foi recolhido em frações de 5 ml por tubo sendo sua absorvância determinada

a 280 nm (espectrofotômetro Zeiss, modelo PMQII).

b) Cromatografia em CM-celulose

Foi preparada uma papa de CM-celulose, misturando 30 gr. de resina com 500 ml de uma solução contendo volumes iguais de NaCl 0.15 M e NaOH 0.15 M. Após homogeneização o fluido foi removido por sucção através de funil de Büchner. A operação anterior foi repetida três vezes. A celulose foi lavada com água destilada para retirar o excesso de hidróxido de sódio e em seguida com tampão acetato de sódio 0.01 M pH = 5.5. Colunas de 2.2x50 cm foram montadas e equilibradas com este mesmo tampão.

Alíquotas de 5 ml de soluções contendo 30 a 40 mg de proteína/ml, previamente dialisadas contra o tampão de equilíbrio, foram aplicadas às colunas e eluídas, à temperatura ambiente, a uma velocidade de fluxo de 30 ml/hora.

As frações foram eluídas por etapas ("step-wise") com tampões acetato de sódio de molaridade crescente e mesmo pH: tampão acetato de sódio 0.01 M pH = 5.5 (tampão de equilíbrio); 0.05 M; 0.1 M e 0.225 M. O efluente foi recolhido em frações de 5 ml por tubo sendo sua absorvância determinada a 280 nm. A troca por tampão de molaridade maior foi efetuada quando a concentração de proteínas, controlada por espectrofotômetro, começava a diminuir.

As frações obtidas por cromatografia em

DEAE-celulose e CM-celulose foram concentradas por ultrafiltração, sob pressão de nitrogênio, através de membranas que retêm moléculas de $PM > 10000$ (PM 10-Diaflo Membranes, Amicon, Corp., Cambridge, USA).

A concentração aproximada da IgG de coelho foi estimada espectrofotometricamente usando-se o coeficiente de extinção $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 13.5$ (KIRSCHENBAUM, 1973). A concentração de proteínas totais, das frações eluídas em DEAE-celulose e CM-celulose foi determinada pelo método do Kjeldahl modificado (A.O.A.C, 1965).

6. Imunoeletroforese

Os experimentos de imunoeletroforese foram realizados com agar a 1%, misturando 1 volume de agar a 2% em água destilada com 1 volume de tampão barbital 0.04 M pH = 8.6 contendo lactato de cálcio (0.0045 M).

O tampão usado para a eletroforese foi o tampão barbital 0.05 M pH = 8.6 contendo lactato de cálcio (0.00175 M).

A eletroforese foi efetuada em lâminas de vidro 76 x 26 mm com uma corrente contínua de 150 volts durante 90 minutos (Fonte BOSKAMP-Pherostat, West Germany).

7. Digestão enzimática

A digestão enzimática da IgG de coelho foi rea

lizada segundo técnica descrita por Garvey, Cremer e Sussdorf (1977). Resumidamente: a 200 mg de IgG, dissolvidos em 5 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M pH = 5.5 contendo 0.002 M de EDTA e 0.001 M de cisteína-HCl, foram adicionados 9 mg de papaina. A mistura foi deixada 7 horas em banho-maria e a digestão foi interrompida pela adição de p-cloromercuribenzoato de sódio (concentração final de 0.001 M). A seguir, a amostra foi dialisada, a temperatura ambiente, contra tampão acetato de sódio 0.01 M pH = 5.5, contendo algumas gotas de tolueno, durante 36 horas, com várias mudanças de tampão.

8. Imunização de coelhos com soro albumina bovina

A imunização de coelhos com soro albumina bovina teve como objetivo aumentar a concentração de IgG no soro. Assim, os animais foram imunizados com 1 mg de soro albumina bovina em 1 ml de adjuvante completo de Freund, por via intramuscular. Trinta dias depois eles receberam, por via intradérmica, 100 µg de soro albumina bovina em NaCl 0.15 M, procedimento este que se repetiu por mais duas vezes, com intervalos de 1 semana. Sete dias após a última injeção os animais foram sangrados. Foi feito um "pool" dos soros que foi estocado a -20° até o momento do uso.

9. Imunização de coelhos com hemácias de carneiro

Coelhos foram imunizados, por via intra-perito

neal com 1 ml de papa de hemácias de carneiro, lavadas previamente 3 vezes com NaCl 0.15 M, emulsificadas em 1 ml de adjuvante completo de Freund. Trinta dias depois os animais receberam, por via intra-peritoneal, 2 ml de uma suspensão a 0.5% de hemácias de carneiro, procedimento este que se repetiu por mais 3 vezes com intervalos de 1 semana. Sete dias após a última injeção os animais foram sangrados e após separação do soro o mesmo foi distribuído em alíquotas de 2 ml e estocado a -20° até o momento do uso. Análise por hemaglutinação, usando 2-mercaptoetanol, revelou somente a presença de anticorpos da classe IgG anti-hemácias de carneiro.

10. Imunização de camundongos com IgG, Fab e Fc

a) Usando hidróxido de alumínio como adjuvante

Grupos de 8 camundongos foram imunizados, por via intra-peritoneal, com diferentes concentrações de antígeno (IgG, Fab ou Fc), num volume de 0.4 ml contendo 12 mg de hidróxido de alumínio. Este foi utilizado como adjuvante devido a sua reconhecida propriedade de induzir a síntese de IgE e IgG₁ em camundongos (LEVINE & VAZ, 1970). Após um intervalo de 30 dias os animais foram sangrados pelo plexo orbital, com pipeta heparinizada, e receberam, em seguida, uma dose de 10 µg de antígeno, por via intra-peritoneal. Sete dias depois os animais foram novamente sangrados como já descrito. O sangue, na primeira e segunda sangria, foi coletado individualmente, diluído a 1:5 com

NaCl 0.15 M a 4°, centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° e dos sobrenadantes de cada sangria foi feito um "pool" que foi estocado a -20° até o momento do uso.

b) Usando adjuvante completo de Freund

Grupos de 8 camundongos foram imunizados, por via intra-peritoneal, com diferentes concentrações de antígeno (IgG, Fab e Fc), num volume de 0.4 ml emulsificado em adjuvante completo de Freund. Após um intervalo de 30 dias os animais foram sangrados pelo plexo orbital, com pipeta heparinizada e receberam, em seguida, uma dose reforço de 10 µg de antígeno, por via intra-peritoneal. Sete dias depois os animais foram novamente sangrados, sendo o sangue, da primeira e segunda sangria, manuseado como já descrito no ítem anterior.

11. Avaliação dos anticorpos IgE e IgG₁ por reação de anafilaxia passiva cutânea (PCA)

Os anticorpos homocitotrópicos do camundongo foram detectados por reações de PCA. As reações de PCA em ratos para a determinação do nível de anticorpos IgE foram realizadas de acordo com MOTA & WONG (1969). Ratos foram sensibilizados no dorso, após depilação, com diferentes diluições do plasma. Dezoito horas depois os animais recebiam, por via intravenosa, 1 ml de NaCl 0.15 M contendo 1 mg de antígeno e 2.5 mg de azul de Evans.

As reações de PCA para avaliar o nível de

anticorpos IgG₁ foram realizadas em camundongos de acordo com a técnica descrita por OVARY (1964). Camundongos Balb/c, após depilação, foram sensibilizados no dorso, com diferentes diluições dos plasmas, previamente aquecidos a 56° durante 30 minutos. Duas horas após, os animais foram injetados, por via intravenosa, com 0,5 ml de NaCl 0.15 M contendo 0.5 mg de antígeno e 1.25 mg de azul de Evans.

Vinte a trinta minutos após a injeção do antígeno, ambos os grupos de animais foram sacrificados, a pele destacada, invertida e os diâmetros das reações medidos com uma régua transparente. O título de PCA foi expresso como a recíproca da maior diluição do soro capaz de produzir uma reação de mais de 5 mm de diâmetro. Desde que a variação obtida com um mesmo soro foi de 2 diluições ou menos, somente diferenças maiores do que 2 diluições foram consideradas significantes.

12. Avaliação de anticorpos aglutinantes para a IgG

Os anticorpos aglutinantes de camundongo para a IgG de coelho foram avaliados por hemaglutinação passiva pela técnica de Rose, Ragan, Pearce e Lipman, ligeiramente modificada (1948).

Hemácias de carneiro foram sensibilizadas com uma dose subaglutinante, previamente determinada, de soro de coelho anti-hemácias de carneiro. Assim, 1 volume de hemácias de carneiro a 2% em tampão fosfato de sódio 0.15 M pH = 7.2 foi misturado com 1 volume de soro de coelho

anti-hemácias de carneiro, diluído no mesmo tampão, e a mistura foi deixada a temperatura ambiente durante 15 minutos com agitação ocasional. Em placas de hemaglutinação, a cada 50 μ l de soro de camundongo diluído em tampão fosfato, contendo 1 mg de ovalbumina/ml, foi adicionado 50 μ l da susensão de hemácias de carneiro sensibilizadas. Após homogeneização, a placa foi deixada em repouso durante 2 horas e o título de anticorpos avaliado, como a maior diluição do soro capaz de causar aglutinação das hemácias sensibilizadas.

III. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A produção de anticorpos anti-IgG, anti-Fab e anti-Fc foi estudada usando-se os seguintes protocolos:

- a. Para verificar a imunogenicidade da IgG e dos fragmentos Fab e Fc, quando os mesmos eram administrados em hidróxido de alumínio, grupos de animais foram imunizados com diferentes concentrações de cada imunógeno e a produção de anticorpos homocitotrópicos, IgE e IgG₁, foi avaliada através de reações de PCA induzidas para cada um dos antígenos.
- b. Para verificar a importância do adjuvante na imunogenicidade dos antígenos estudados, em função da produção de anticorpos homocitotrópicos, grupos de camundongos foram imunizados com IgG, Fab ou Fc em hidróxido de alumínio ou em adjuvante completo de Freund e a produção de anticorpos em cada um destes grupos foi comparada.
- c. Para verificar se os anticorpos homocitotrópicos anti-Fab e anti-Fc eram dirigidos a determinantes antigênicos presentes na molécula de IgG ou a determinantes originados durante a digestão enzimática desta proteína com papaína, ratos e camundongos foram sensibilizados com soro anti-Fab e anti-Fc e a IgG foi usada como antígeno para induzir as reações de PCA.

d. Para avaliar uma possível importância da linhagem isogênica de camundongo na produção de anticorpos homocitotrópicos anti-IgG, animais das linhagens A/Sn, Balb/c e C57Bl/10J foram imunizados com diferentes concentrações de IgG e a produção de anticorpos homocitotrópicos avaliada através de reações de PCA.

IV. RESULTADOS

1. Obtenção da IgG de coelho

A IgG foi isolada, de soro de coelhos imunizados com soro albumina bovina, por cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-celulose.

A figura 1 mostra o resultado da cromatografia em DEAE-celulose.

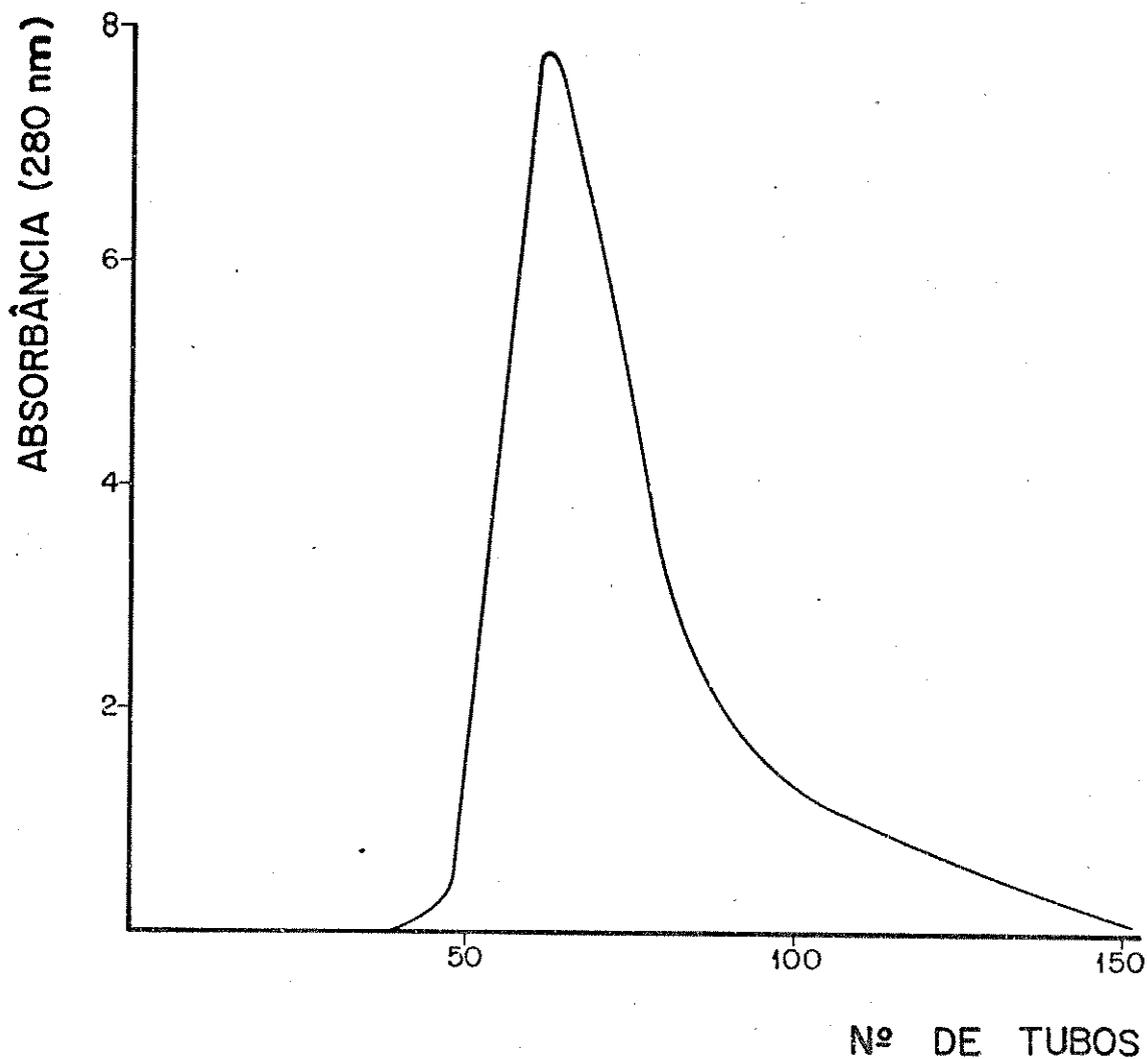


FIGURA 1 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose (5 x 75 cm) de soro de coelho. Tampão de eluição: tampão fosfato de sódio 0.0175 M pH = 6.3. Velocidade de fluxo: 30 ml/hora, 5 ml/tubo.

Após eluição com o tampão de equilíbrio foi obtido um único pico que foi concentrado e cuja pureza foi avaliada por imunoeletroforese. O material foi submetido à eletroforese, nas condições descritas, e posteriormente revelado com soro de cavalo anti-soro total de coelho.

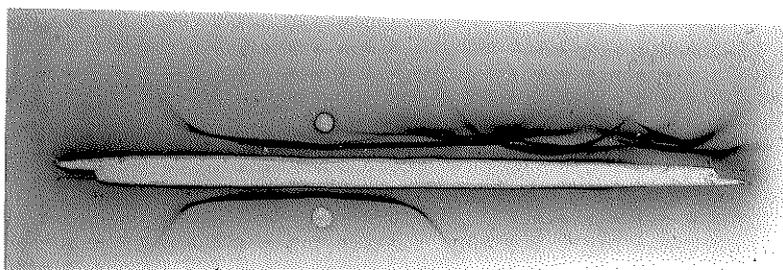


FIGURA 2 - Imunoeletroforese de soro normal de coelho (orifício superior) e da fração eluída em DEAE-celulose (orifício inferior). Os componentes foram separados por eletroforese, nas condições descritas, e posteriormente revelados com soro de cavalo anti-soro total de coelho.

Como pode ser observado, a imunoeletroforese da fração eluída em DEAE-celulose revela apenas um arco de precipitação correspondente a IgG.

2. Obtenção dos fragmentos Fab e Fc

A figura 3 mostra o resultado da cromatografia em CM-celulose do material obtido após digestão da IgG com papaína.

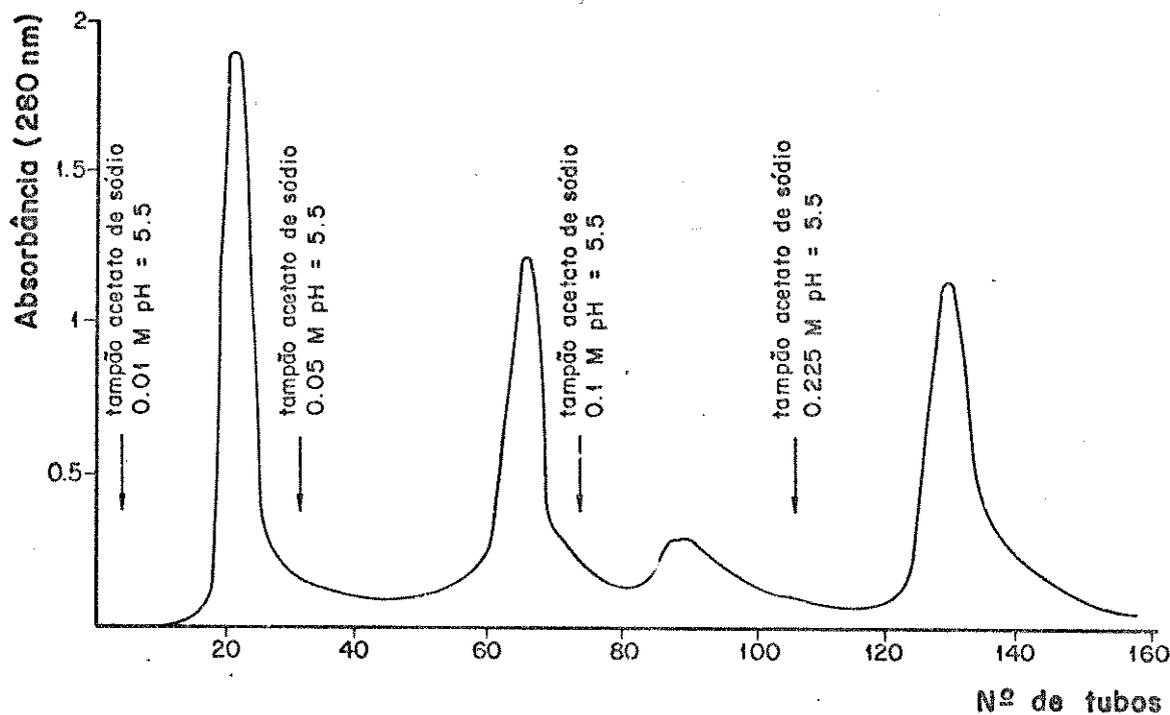


FIGURA 3 - Cromatografia do digesto papainico da IgG em coluna de CM-celulose (2.2 x 50 cm). Tampão de equilíbrio: Tampão acetato 0.01 M pH = 5.5. Velocidade de fluxo: 30 ml/hora, 5 ml/tubo. As setas indicam a troca dos tampões de eluição.

Como esperado, de acordo com a metodologia usada, o fragmento Fab foi eluído nas frações I e II, a fração III continha uma mistura de IgG, Fab e Fc, enquanto o Fc foi eluído preferencialmente na fração IV.

O fragmento Fc, eluído na fração IV, foi purificado por sucessivas cristalizações, que foram obtidas concentrando-se o material para 2 ml e dializando o mesmo

contra tampão fosfato de sódio 0.001 M pH = 6.8 a 4°. Após cada cristalização o material foi centrifugado e os cristais dissolvidos numa solução de ácido acético glacial 0.02 N. Este processo foi repetido 3 vezes.

A pureza das frações I, II e IV, foi avaliada por imunoeletroforese. As frações foram concentradas e submetidas à eletroforese, nas condições descritas, sendo posteriormente reveladas com soro de cabra anti-IgG de coelho, como mostrado na figura 4.

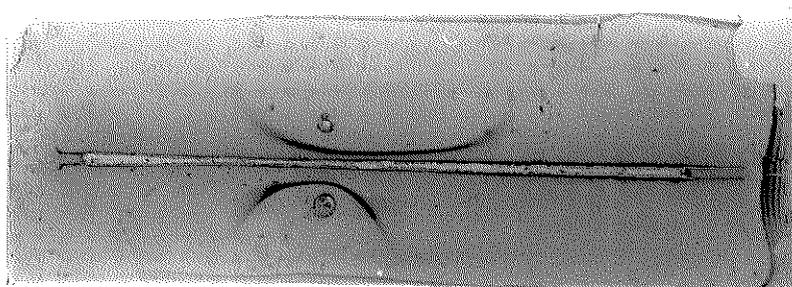


FIGURA 4 - Imunoeletroforese da fração I (orifício superior) e da fração IV (orifício inferior). Os componentes de cada fração foram separados por eletroforese, nas condições descritas, e posteriormente revelados com soro de cabra anti-IgG de coelho.

Como pode ser observado a imunoeletroforese revelou, tanto na fração I como na fração IV, apenas um arco de precipitação. O perfil imunoeletroforético da fração II foi semelhante ao da fração I (resultado não mostrado).

3. Produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG íntegra e para os fragmentos Fab e Fc

Afim de estudar a produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG e para os fragmentos Fab e Fc, animais de linhagem A/Sn foram imunizados com diferentes concentrações de cada imunógeno usando hidróxido de alumínio como adjuvante.

O quadro I mostra a produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG, Fab e Fc.

QUADRO I

Produção de anticorpos IgG e IgG₁ anti-IgG, anti-Fab e anti-Fc

imunógeno	dose (µg)	Título de PCA			
		IgE		IgG ₁	
		resposta 1ª	resposta 2ª	resposta 1ª	resposta 2ª
IgG	25	< 1/10	< 1/10	< 1/10	1/10
	50	< 1/10	< 1/10	< 1/10	1/10
	100	< 1/10	< 1/10	< 1/10	1/10
	200	< 1/10	< 1/10	< 1/10	1/10
Fab	25	n.d	1/400	n.d	1/160
	50	1/25	1/600	1/40	1/320
	100	n.d	1/200	n.d	1/320
	200	n.d	1/200	n.d	1/160
Fc	25	< 1/10	1/10	n.d	1/10
	50	< 1/10	1/20	< 1/5	1/10
	100	1/10	1/40	< 1/5	1/20
	200	1/10	1/40	< 1/5	1/20

n.d = não determinado.

Camundongos foram imunizados, por via i.p., com diferentes concentrações de IgG, Fab e Fc em hidróxido de alumínio. Trinta dias depois os animais foram sangrados, receberam uma dose reforço de cada imunógeno por via i.p. e foram sangrados, mais uma vez, 7 dias depois. As sangrias foram feitas pelo plexo orbital e os anticorpos detectados por reações de PCA.

Como se pode observar a IgG de coelho não se revelou um bom imunógeno, no tocante a produção de anticorpos homocitotrópicos, quando injetada em camundongos da linhagem A/Sn, em hidróxido de alumínio, em contraste com o fragmento Fab e Fc. Pode-se observar também que o fragmento Fab mostrou-se mais imunogênico do que o Fc.

4. Produção de anticorpos homocitotrópicos para Fab I e Fab II

A cromatografia em CM-celulose separa 2 frações de moléculas Fab devido a pequenas diferenças na carga elétrica destes fragmentos, que refletem a heterogeneidade entre as moléculas de IgG das quais os fragmentos são derivados. Embora não seja descrito na literatura, até o presente momento, diferenças biológicas entre as moléculas Fab das duas frações, um experimento foi realizado para avaliar uma possível diferença na imunogenicidade destes dois fragmentos.

QUADRO II

Estudo comparativo da produção de anticorpos homocitotrópicos anti-Fab I e anti-Fab II

imunógeno	reforço	antígeno usado no PCA	Título de PCA	
			resposta secundária	
			IgE	IgG ₁
Fab I	Fab I	Fab I	1/400	1/160
Fab I	Fab I	Fab II	1/400	1/160
Fab II	Fab II	Fab II	1/400	1/160
Fab II	Fab II	Fab I	1/400	1/160

Animais de linhagem A/Sn foram imunizados com Fab I ou Fab II, por via i.p, em hidróxido de alumínio. Trinta dias depois os animais receberam uma dose reforço de 50 µg, por via i.p, sendo sangrados 7 dias depois pelo plexo orbital. Os anticorpos homocitotrópicos foram detectados por reações de PCA.

Os resultados destes experimentos mostraram que as duas frações de Fab comportaram-se da mesma maneira no tocante a produção de anticorpos homocitotrópicos (Quadro II). No presente trabalho, sempre que o Fab foi empregado, foi utilizada a fração aqui designada de Fab I.

5. Produção de anticorpos aglutinantes para a IgG

Como a IgG de coelho não se mostrou um bom imunógeno, em relação a produção de anticorpos homocitotrópicos, um experimento foi realizado com o intuito de avaliar a produção de anticorpos aglutinantes nas mesmas condições. Com esta finalidade, soro de camundongos A/Sn imunizados com IgG, em hidróxido de alumínio, foram testados, por hemaglutinação passiva, e os resultados estão expressos no quadro III.

QUADRO III

Produção de Anticorpos aglutinantes Anti-IgG

IgG (μ g)	Título de anticorpos aglutinantes	
	resposta 1 $^{\circ}$	resposta 2 $^{\circ}$
50	1/20	1/160
100	1/40	1/160

Animais da linhagem A/Sn foram imunizados com IgG de coelho da mesma maneira que para a detecção de anticorpos homocitotrópicos e os anticorpos produzidos detectados por hemaglutinação passiva.

Como se pode observar houve uma produção detectável de anticorpos aglutinantes para a IgG, tanto na resposta primária quanto na secundária, quando esta foi administrada nas mesmas condições usadas para a produção de anticorpos homocitotrópicos.

6. Produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG, Fab e Fc usando adjuvante completo de Freund

Com a intenção de verificar se o nível da produção de anticorpos homocitotrópicos obtido com o uso do hidróxido de alumínio seria reproduzido usando-se outro adjuvante, camundongos da linhagem A/Sn foram imunizados com IgG, Fab e Fc em adjuvante completo de Freund e os resultados destes experimentos estão resumidos no quadro IV.

QUADRO IV

Produção de anticorpos homocitotrópicos anti-IgG, anti-Fab e anti-Fc usando-se adjuvante completo de Freund

imunógeno	dose (µg)	Título de PCA			
		IgE		IgG ₁	
		resposta 1º	resposta 2º	resposta 1º	resposta 2º
IgG	50	1/10(<1/10)	1/40(<1/10)	1/40(<1/10)	1/160(1/10)
	100	1/10(<1/10)	1/40(<1/10)	1/40(<1/10)	1/160(1/10)
Fab	50	1/50(1/25)	1/200(1/600)	1/40(1/40)	1/320(1/320)
Fc	50	1/10(<1/10)	1/20 (1/20)	1/40(<1/5)	1/320(1/10)

Camundongos da linhagem A/Sn foram imunizados com IgG, Fab e Fc em adjuvante completo de Freund do mesmo modo descrito para a imunização com hidróxido de alumínio. Os anticorpos homocitotrópicos foram detectados por reações de PCA. Entre parênteses, para comparação, colocamos os resultados obtidos quando a imunização foi feita com hidróxido de alumínio.

Como pode ser observado o uso do adjuvante completo de Freund aumentou consideravelmente a imunogenicidade da molécula de IgG e de seus fragmentos, particularmente em relação a produção de IgG₁. Note-se a produção consideravelmente maior dos anticorpos IgG₁ anti-Fc, a qual havia sido muito reduzida quando se utilizou o hidróxido de alumínio como adjuvante (Quadro I).

7. Especificidade dos anticorpos homocitotrópicos anti-Fab e anti-Fc

Com o intuito de verificar se os anticorpos anti-Fab e anti-Fc eram dirigidos a determinantes antigênicos pré-existentes e ativos na molécula de IgG ou a determinantes antigênicos expostos ou formados durante o processo de digestão enzimática com papaína, a reação de PCA em animais sensibilizados com anti-Fab e anti-Fc foi desencadeada usando-se a IgG como antígeno e os resultados estão expressos no quadro V.

QUADRO V

Especificidade dos anticorpos homocitotrópicos anti-Fab e anti-Fc.

anti-soro usado na sensibilização	antígeno usado no PCA	Título de PCA	
		resposta secundária	
		IgE	IgG ₁
anti-Fab	Fab	1/600	1/320
anti-Fab	IgG	1/300	1/160
anti-Fc	Fc	1/40	1/20
anti-Fc	IgG	1/40	1/20

Animais foram sensibilizados com soro anti-Fab ou anti-Fc. Nos animais sensibilizados com anti-Fab foi usado Fab ou IgG para desencadear a reação anafilática, enquanto que nos animais sensibilizados com anti-Fc foi usado Fc ou IgG.

Os resultados destas experiências, expressos no quadro V, mostraram que as reações de PCA podem ser induzidas com IgG em animais sensibilizados com soro anti-Fab ou anti-Fc. Estes resultados sugerem que os anticorpos homocitotrópicos, obtidos por imunização com Fab ou Fc, não são dirigidos a determinantes antigênicos novos, formados ou expostos durante a digestão enzimática com papaína.

8. Influência da linhagem de camundongo para a produção de anticorpos homocitotrópicos anti-IgG

Para verificar se outras linhagens de camundongo comportavam-se do mesmo modo, em relação a produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG, quando esta era administrada em hidróxido de alumínio, camundongos das linhagens C57Bl/10J e Balb/c foram imunizados como já descrito para a linhagem A/Sn, e a produção de anticorpos homocitotrópicos para cada linhagem foi determinada. Os resultados não mostraram diferença entre as três linhagens usadas, mostrando-se a IgG igualmente pouco imunogênica em todas elas.

V. DISCUSSÃO

Quando estas experiências foram realizadas nós estávamos estudando a possível existência de competição antigênica, em termos de anticorpos homocitotrópicos do camundongo, entre os fragmentos Fab e Fc da IgG de coelho.

A imunização de camundongos usando-se a IgG de coelho como imunógeno e o hidróxido de alumínio como adjuvante, não resultou em produção de anticorpos da classe IgE em nível detectável e a resposta de anticorpos IgG₁ foi muito baixa. Por outro lado, a imunização, em idênticas condições, com os fragmentos Fab ou Fc induziu a produção de níveis detectáveis tanto de anticorpos IgE quanto de IgG₁, capazes de reagirem não somente com o imunógeno original, Fab ou Fc, mas também com a molécula íntegra de IgG. Isto significa que os anticorpos induzidos por estes fragmentos isolados reconhecem determinantes antigênicos existentes na molécula íntegra de IgG que, por alguma razão ainda não determinada, não foram capazes de induzir a produção de anticorpos homocitotrópicos, quando partes integrantes da molécula de IgG.

Estudos sobre a imunogenicidade da gelatina (SELA, 1966) mostraram que esta é muito pouco imunogênica, mas é capaz de reagir com anticorpos produzidos em resposta a um seu derivado, resultante da introdução em sua molécula de um número discreto de radicais tirosínicos. Nestas condições o derivado tirosinado da gelatina é capaz de induzir

a síntese de anticorpos capazes de reagir com a molécula nativa, não imunogênica, da gelatina. No nosso caso existe uma situação semelhante, só que a imunogenicidade resultou não da adição de novos radicais à molécula mas sim da clivagem desta por ação enzimática levando a formação de fragmentos menores e imunogênicos, capazes de induzir a síntese de anticorpos que reconhecem determinantes antigênicos presentes na molécula de IgG nativa.

Existem evidências de que o comportamento do fragmento Fc isolado é diferente do comportamento do mesmo quando integrado à molécula de IgG.

Algumas subpopulações de linfócitos exibem em sua superfície receptores, os quais interagem com a porção Fc de complexos antígeno-anticorpo, com a IgG agregada não especificamente ou com o fragmento Fc isolado por digestão enzimática da IgG (WEIGLE & BERMAN, 1979). Estes receptores para o Fc foram demonstrados inicialmente em linfócitos B do camundongo e do homem e mais recentemente em linfócitos T (DICKLER, 1976). Macrófagos também possuem receptores para o Fc (UNANUE, 1976), mas não se sabe se estes receptores são idênticos aqueles encontrados nos linfócitos. Nos últimos anos uma série de trabalhos têm mostrado que os fragmentos Fc derivados de imunoglobulinas de mamíferos induzem os linfócitos B de camundongo a proliferarem e a sintetizarem imunoglobulinas, embora o mecanismo pelo qual estes fragmentos estimulam os linfócitos não esteja esclarecido (MORGAN, WALKER, THOMAN & WEIGLE, 1980). Sabe-se, além disto, que a resposta proliferativa de linfócitos B de

camundongo, induzida por fragmentos Fc é dependente de macrófagos (MORGAN & WEIGLE, 1979). Embora os macrófagos sejam requeridos, novamente, as interações entre fragmentos Fc, macrófagos e linfócitos não são claras. MORGAN & WEIGLE (1980) mostraram que a interação de macrófagos com o Fc resulta na produção de um componente estimulador de linfócitos B, derivado do fragmento Fc. É importante notar que o efeito do Fc isolado, em termos de estimulação blástica e indução de síntese policlonal de anticorpos é muito maior que o efeito obtido por este mesmo fragmento, quando parte da IgG íntegra agregada pelo calor (BERMAN & WEIGLE, 1977). Estas observações sugerem que o processamento pelos macrófagos do fragmento Fc isolado é diferente daquele que ocorre quando este é parte constituinte da molécula de IgG e por analogia sugere que o mesmo possa ocorrer com o fragmento Fab.

Parece-nos razoável considerar que no fenômeno aqui descrito o processamento pelos macrófagos dos fragmentos Fab e Fc isolados seja diferente do processamento da molécula de IgG íntegra, podendo resultar desta diferença uma maior imunogenicidade dos fragmentos.

ISENMAN, DORRINGTON & PAINTER (1975) mostraram que a IgG₄ humana não interage com Clq, embora o seu fragmento Fc isolado seja tão ativo, a este respeito, como o Fc da IgG₁. As características estruturais que permitem ao Clq interagir com a IgG estão presentes na IgG₄, mas de algum modo, talvez por uma característica de distribuição espacial, dos determinantes antigênicos, não ocorre intera-

ção quando o Fc está integrado à molécula de IgG.

Respostas imunes de camundongos para vários antígenos são governadas por um conjunto de genes, denominados genes da resposta imune (Ir), em estreito relacionamento com os genes do complexo principal de histocompatibilidade (BENACERRAF & DORF, 1974). De acordo com os nossos resultados, a não imunogenicidade da IgG, em termos de anticorpos homocitotrópicos, não foi restrita a nenhuma das linhagens estudadas, não parecendo depender, portanto, de diferenças nos genes Ir.

TAUSSIG (1971) mostrou que quando a IgG de coelho, emulsificada em adjuvante completo de Freund, é injetada em camundongos, a grande maioria dos anticorpos anti-IgG produzidos, detectados por hemaglutinação passiva, são dirigidos a determinantes antigênicos localizados na porção Fc da imunoglobulina. Nas nossas condições, embora a molécula de IgG, quando administrada em hidróxido de alumínio, se mostrasse muito pouco imunogênica, no tocante a produção de anticorpos homocitotrópicos, foi capaz, entretanto nas mesmas condições de imunização, de induzir a síntese de anticorpos aglutinantes. Até o presente momento não dispomos de dados acerca da especificidade de tais anticorpos. Do mesmo modo, não sabemos se estes anticorpos pertencem a uma ou mais das quatro subclasses de IgG descritas: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} ou IgG₃.

Ao longo de nossas experiências nos pareceu de interesse verificar se o uso de um outro adjuvante, em

substituição ao hidróxido de alumínio, concorreria para uma maior produção de anticorpos homocitotrópicos para a IgG de coelho. Realmente, com o uso do adjuvante completo de Freund a resposta de anticorpos homocitotrópicos anti-IgG foi significativamente maior do que aquela obtida com o hidróxido de alumínio, particularmente de anticorpos IgG₁. Este resultado, não inesperado, pois o adjuvante completo de Freund favorece a síntese de anticorpos da classe IgG na maioria das espécies estudadas (WHITEHOUSE, 1977), permitiu-nos verificar que o comportamento imunogênico da IgG de coelho em camundongos é bastante influenciado pelo adjuvante usado.

De uma maneira geral os adjuvantes podem agir a nível celular por uma ou mais das seguintes vias (WHO TECHNICAL REPORT SERIES, 1976).

- criando condições que favoreçam a diferenciação imune
- amplificando a proliferação de linfócitos imunoinduzidos
- aumentando a eficiência de macrófagos para estocar, preservar e apresentar o antígeno às células imunocompetentes.

O último ponto serve para enfatizar que os macrófagos podem ser um fator importante em muitos, se não em todos, casos de indução da resposta imune. Substâncias com propriedades adjuvantes podem estimular os macrófagos com referência a qualquer uma das suas várias funções na respos

ta imune (ROSENTHAL, 1980; UNANUE, 1980). Estes incluem: apresentação do antígeno, associado aos antígenos Ia, às células imunocompetentes, no fenômeno de cooperação celular; processamento do antígeno de modo a modificar a sua imunogenicidade; remoção do excesso de antígeno, protegendo o animal contra a indução da tolerância; ação de retenção dos antígenos, que podem ser liberados gradualmente durante um maior período de tempo.

Embora com características comuns, a ação dos diversos adjuvantes têm aspectos próprios. O hidróxido de alumínio e o adjuvante completo de Freund retêm o antígeno no sítio da injeção, de onde ele é liberado lentamente. Com o hidróxido de alumínio, embora o antígeno persista localmente ele rapidamente deixa de agir como estímulo para as células imunocompetentes, ao contrário do efeito muito mais duradouro que se obtém com o adjuvante completo de Freund (WHO TECHNICAL REPORT SERIES, 1976).

Sabe-se que as células imunocompetentes precisam reconhecer pelo menos dois determinantes antigênicos diferentes na molécula do antígeno para que haja uma resposta imune eficiente. Um destes determinantes funcionaria como a parte carreadora da molécula enquanto o outro corresponderia ao determinante haptênico, sendo o primeiro reconhecido pelos linfócitos T auxiliares e o segundo pelos linfócitos B (ARNON & GEIGER, 1977). Deste modo, a imunogenicidade seria um fenômeno que dependeria basicamente da estrutura do antígeno. A presença destes dois determinantes seria um pré-requisito para a imunogenicidade dos anti-

genos timo-dependentes, porém o mesmo não se poderia dizer com respeito a antigenicidade, visto que a reação antígeno-anticorpo, através da qual os anticorpos são revelados, exige apenas que o anticorpo reconheça um dos determinantes antigênicos.

Em face destes conhecimentos, parece-nos razoável sugerir que a diferença entre a não imunogenicidade da IgG e a imunogenicidade de seus fragmentos, seja devida ao fato dos determinantes antigênicos da molécula da IgG íntegra estarem situados nesta de tal forma que não permitam uma interação com as células imunocompetentes, de modo a favorecer a síntese de anticorpos homocitotrópicos. Esta localização espacial, entretanto, não constituiria um fator limitante para a reação dos mesmos determinantes com o anticorpo específico, sintetizado em resposta aos fragmentos Fab e Fc. Nestes fragmentos, entretanto, os mesmos determinantes seriam capazes de induzir a síntese de anticorpos homocitotrópicos devido a mudança em sua relação espacial em consequência de sua separação da molécula nativa.

Uma melhor interpretação das observações apresentadas neste trabalho de tese exige a realização de experiências adicionais para esclarece-las, bem como um maior progresso nos conhecimentos sobre as bases moleculares da imunogenicidade e sobre o mecanismo de ação dos adjuvantes.

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

1. A imunização de camundongos usando-se a IgG de coelho como imunógeno e o hidróxido de alumínio como adjuvante não resultou em produção de anticorpos da classe IgE em nível detectável e a produção de anticorpos IgG₁ foi muito baixa.

2. A imunização, em idênticas condições, com os fragmentos Fab e Fc, induziu a produção de níveis detectáveis tanto de IgE quanto de IgG₁, capazes de reagirem não somente com o imunógeno original, Fab ou Fc, mas também com a molécula íntegra da IgG.

3. Embora a IgG, quando administrada em hidróxido de alumínio, não se mostrasse um bom imunógeno, no tocante a produção de anticorpos homocitotrópicos, foi capaz, nas mesmas condições de imunização, de induzir a síntese de anticorpos aglutinantes da classe IgG.

4. O uso de adjuvante completo de Freund potenciou a imunogenicidade da IgG, induzindo uma resposta de anticorpos homocitotrópicos significativamente maior do que aquela obtida com o hidróxido de alumínio, particularmente de anticorpos IgG₁.

5. A não imunogenicidade da IgG, quando administrada em hidróxido de alumínio, em termos de anticorpos homocitotrópicos, não foi restrita a linhagem A/Sn, visto que as linhagens C57Bl/10J e Balb/c, nas mesmas condições de

imunização, comportaram-se do mesmo modo.

6. Sugere-se que a diferença entre a não imunogenicidade da IgG e a imunogenicidade de seus fragmentos, usando-se hidróxido de alumínio como adjuvante, seja devida a diferenças de localização espacial dos determinantes antigênicos na molécula íntegra de IgG e em seus fragmentos Fab e Fc.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. A. O. A. C. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 10^a ed., A. O. A. C., Washington, 1965.
02. ARNON, R. & GEIGER, B. Molecular basis of immunogenicity and antigenicity. In: "Immunochemistry - An Advanced Textbook", p. 307, L. E. Glynn & M. W. Steward, ed., Wiley Interscience Publication, Chichester, 1977.
03. BAKER, P. J. Homeostatic control of antibody responses: A model based on the recognition of cell-associated antibody by regulatory T cells. Transplant. Rev. 26:3, 1975.
04. BECKER, E. L. Nature and classification of immediate type allergic reactions. Adv. Immunol., 13:267, 1971.
05. BENACERRAF, B. & DORF, M. E. Genetic control of specific immune responses. In: "Progress in Immunology" vol. 2, p. 181, L. Brent & J. Holborow, ed., North-Holland Publishing Company, 1974.
06. BERMAN, M. A. & W. O. WEIGLE. B - Lymphocyte activation by the Fc region of IgG. J. Exp. Med., 146: 241, 1977.

07. DICKLER, H. B. B - Lymphocyte receptor for immunoglobulin. *Adv. Immunol.*, 24:167, 1976.
08. DUTTON, R. W. Supressor T cells. *Transplant. Rev.*, 26:39, 1975.
09. GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. *In: "Methods in Immunology - A Laboratoty Text for Instruction and Research"*, p. 256, W. A. Benjamin, ed., Massachusetts, 1977.
10. GERSHON, R. K. Supressor T cells: A miniposition paper celebrating a new decade. Fourth International Congress of Immunology. *In: "Progress in Immunology IV"*, p. 375, M. Fougereau & J. Dausset, ed., Academic Press, London, 1980.
11. ISENMAN, D. E.; DORRINGTON, K. J. & PAINTER, R. H. The structure and function of immunoglobulin domains. II. The importance of interchain disulfide bonds and the possible role of molecular flexibility in the interaction between immunoglobulin G and complement. *J. Immunol.*, 114:1726, 1975.
12. ISHIZAKA, K. Regulation of IgE response. Fourth International Congress of Immunology. *In: "Progress in Immunology IV"*, p. 815, M. Fougereau & J. Dausset, ed., Academic Press, London, 1980.

13. KABAT, E. A. The nature of an antigenic determinant. *J. Immunol.*, 97:1, 1966.
14. KIRSCHENBAUM, D. M. Molar absorptivity and $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of ultraviolet and visible regions. *IX Anal. Biochem.*, 56:237, 1973.
15. KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. Regulation of antibody response in vitro. IV. Carrier-specific helper cell for IgG and IgE antibody response. *J. Immunol.*, 111:720, 1973.
16. LEVINE, B. B. and VAZ, N. M. Effect of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch. Allergy* 39, 156, 1970.
17. LIACOPOULOS, P. & BEN-EFRAIM, S. Antigenic competition. *Progr. Allergy*, 18:97, 1975.
18. MICHAELIS, L. Untersuchungen uber eiweissprazipitize. *Dtsch. med. Wschr.*, 28:733, 1902.
19. MORGAN, E.L.; WALKER, S.M.; THOMAN, M.L. & WEIGLE, W. O. Regulation of immune response. I. The potentiation of *in vivo* and *in vitro* immune responses by Fc fragments. *J. Exp. Med.*, 152:113, 1980.

20. MORGAN, E.L. & WEIGLE, W. O. The requirement for adherent cells in the Fc fragment-induced proliferative response of murine spleen cells. *J. Exp. Med.*, 150:256, 1979.
21. MORGAN, E.L. & WEIGLE, W.O. Regulation of Fc fragment-induced murine spleen cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 151:1, 1980.
22. MOTA, I & WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Science* 8:813, 1969.
23. OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis. *In: Immunological Methods*, p. 259, Blackwell Scientific Publications, 1st ed., Oxford, 1964.
24. RAFF, M. C. T and B lymphocytes and immune responses. *Nature*, 242:19, 1973.
25. PORTER, R. R. Hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, 73:119, 1959.
26. ROSE, H. M.; RAGAN, C.; PEARCE, E. & LIPMAN, M. O. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68:1, 1948.

27. ROSENTHAL, A. S. Regulation of immune responses. Role of macrophages. *N. Engl. J. Med.*, 303:1153, 1980.
28. SELA, M. Immunological studies with synthetic polypeptides. *Adv. Immunol.*, 5:29, 1966.
29. TADA, T.; TANIGUCHI, M. & TAKEMORI, T. Properties of primed suppressor T cells and their products. *Transplant. Rev.*, 26:106, 1975.
30. TAUSSIG, M. J. Studies on antigenic competition. I. Antigenic competition between the Fc and Fab fragments of rabbit IgG in mice. *Immunol.*, 20:51, 1971.
31. TAUSSIG, M. J. Antigenic competition. *In*: "The Immune System - A Course on the Molecular and Cellular Basis of Immunity, p. 165, M. J. Hobart & I. McConnell. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.
32. TAUSSIG, M. J. & LACHMANN, P. J. Studies on antigenic competition. II. Abolition of antigenic competition by antibody against or tolerance to the dominant antigen: A model for antigenic competition. *Immunol.*, 22:185, 1972.
33. UNANUE, E. R. Secretory function of mononuclear phagocytes. *Am. J. Pathol.*, 83:396, 1976.

34. UNANUE, E. R. Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. *N. Engl. J. Med.*, 303:977, 1980.
35. WEIGLE, W. O. & BERMAN, M. A. Role of the Fc portion of antibody in immune regulation. *In: Cells of Immunoglobulin Synthesis*, p. 223, B. Pernis & H. J. Vogel ed., Academic Press, Inc., New York, 1979.
36. WHO TECHNICAL REPORT SERIES N° 595 Immunological Adjuvants. World Health Organization, Geneva, 1976.
37. WHITEHOUSE, M. W. The chemical nature of adjuvants. *In: Immunochemistry - An Advanced Textbook*, page 571, L. E. Glynn & M. W. Steward, ed., A Wiley Interscience Publication, Chichester, 1977.