

JULIA KEIKO SAKURADA

ESTUDO SOBRE O MECANISMO DE INIBIÇÃO DA IMUNO
HEMÓLISE POR ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINAS.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas como
um dos requisitos para a obtenção de grau
de Doutor em Ciências.

Orientador

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas - São Paulo

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Agradecemos o auxílio prestado ao Curso de Pós-Graduação em
Imunologia pelas seguintes Instituições:

Universidade Estadual de Campinas

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Conselho Nacional de Pesquisa

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

Organização Mundial de Saúde (Divisão de Imunologia)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Humberto de Araujo Rangel, pela orientação, amizade e incentivo constante.

Aos Professores Adenir Perini (Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia - Instituto Butantan), Glaci T. Zancan (Departamende Bioquímica - Universidade Federal do Paraná), Ivan de Carvalho (Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP), Jorge A. Guimarães (Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências Médicas - Universidade Federal Fluminense), Daria Repka (Departamento de Microbiologia e Imunologia - UNICAMP) e Marlene B. Serafim (Departamento de Microbiologia e Imunologia - UNICAMP) pelas sugestões e discussão crítica dos resultados.

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

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Minha sincera gratidão.

ÍNDICE

		Pág.
I	INTRODUÇÃO	1
II	MATERIAL E MÉTODOS	8
III	RESULTADOS	
	1 Papel das diferentes imunoglobulinas na inibição da lise.	16
	1.2 Isolamento de imunoglobulinas de carneiro.	18
	1.3 Inibição da lise específica pela ação da IgS anti-IgG de coelho.	21
	2 Mecanismo da inibição da lise.	24
	2.1 Interação da IgS anti-IgG com EACI.	28
	3 Importância dos determinantes das regiões Fab e Fc no fenômeno da inibição da lise.	32
IV	DISCUSSÃO	36
V	RESUMO E CONCLUSÕES	43
VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ABREVIATURAS

Ac	anticorpo
Ag	antígeno
BDF	4 4' bifenil bis diazonio fluoroborato
C	Complemento
Cl	primeiro componente do sistema complemento
C $\bar{I}$	primeiro componente do sistema complemento ativado
car	carneiro
cb	cobaia
CH50	unidade 50 % de lise do sistema hemolítico
ClH50	unidade de Cl capaz de induzir 50 % de lise do sistema hemolítico
E	hemácias de carneiro
EA	hemácias sensibilizadas com a fração IgG de soro de coelho anti-hemácia
EAcb	hemácias sensibilizadas com o soro de cobaia anti-estroma de carneiro
EGA	hemácias sensibilizadas com o complexo soro albumina bovina antisoro albumina bovina
E-Fc	hemácias sensibilizadas com fragmento Fc de coelho
E-Fab	hemácias sensibilizadas com fragmento Fab de coelho.
E-IgG	hemácias sensibilizadas com IgG de coelho
IgS	imunoglobulina isolada de soro de carneiro anti-IgG de coelho.
IgSn	imunoglobulina isolada de soro normal de carneiro
Ov	ovoalbumina
R1	reagente de C isento de Cl
R4	reagente de C com o quarto componente inativado pela ação da hidrazina
T	tampão veronal isotônico

INTRODUÇÃO

O sistema complemento é uma mistura complexa de proteínas plasmáticas, que são ativadas sequencialmente por mecanismos complexos que incluem a conversão de algumas proenzimas em proteinases ativas. Este sistema é o principal mediador humoral da reação antígeno-anticorpo, podendo-se distinguir duas consequências biológicas de sua ativação : 1 - Ativação funcional de células especializadas, tais como a geração das atividades procoagulantes das plaquetas, migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, etc., como consequência da ação de produtos intermediários da reação. 2 - Alteração estrutural e funcional irreversível da membrana de células especializadas, levando à morte celular, ocasionada pela entrada de água extra celular e saída de constituintes intracelulares.

O sistema complemento pode ser ativado por 2 diferentes mecanismos. O primeiro deles, chamado via clássica, é ativado por imunocomplexos contendo IgG ou IgM, e que compreende 3 unidades funcionais (1):

- 1 - Uma unidade de reconhecimento, constituída pelos componentes de C1.
- 2 - Uma unidade de ativação, constituída pelos componentes C2, C3 e C4.
- 3 - Uma unidade de ataque à membrana, constituída pelos componentes de C5 a C9.

O segundo mecanismo, chamado via alternativa, descoberto por PILLEMER et al. (2), é ativado por polissacarídeos, lipopolissacarídeos ou por imunocomplexos contendo IgA ou algumas subclasses de IgG. Esta via de ativação não utiliza os componentes C1, C2 e C4 e depende de fatores de iniciação, distintos da via clássica (3,4), tais como: fator de iniciação, properdina, C3, proativador de C3 (Fator B) e C3 proativador converta-se ou Fator D (1).

O terceiro componente do sistema complemento desempenha o papel central em ambos os mecanismos e a sua ativação leva à utilização dos demais componentes (C5 a C9) que são comuns a ambas as vias.

Na via clássica, que é iniciada pela combinação do primeiro componente com o imunocomplexo, o Cl representa um papel importante para a ativação sequencial dos demais componentes e os estudos realizados no sentido de investigar as condições de fixação do Cl ao imunocomplexo, mostram que são necessários, no mínimo, uma molécula de IgM ou duas moléculas adjacentes de IgG. De fato os dados obtidos, utilizando-se o teste de transferência de Cl (5), permitiram avaliar o número mínimo de moléculas de anticorpo sobre a superfície celular, necessário à fixação de Cl, e os dados quantitativos (6) indicaram que uma molécula de Cl é fixada quando a superfície da hemácia contém uma molécula de IgM ou duas moléculas adjacentes de IgG. Em concordância com esses achados, COHEN (7) mostrou que a IgG aminada ou benzilada perde a capacidade de fixar complemento, tornando-se capaz de inibir a lise, quando misturada a IgG nativa e que este efeito tem características de inibição competitiva, dependendo da presença de, no mínimo, 2 moléculas adjacentes de IgG. Contudo HYSLOP et al. (8), utilizando o sistema hapteno-anticorpo (bis-DNP-octa metileno diamino e anti-DNP), observaram que os dímeros não apresentam a capacidade de fixar Cl ou Cl², ao passo que os tetrameros e os grandes polímeros apresentam esta capacidade. Estas observações são concordantes com as conclusões de GIVOL et al. e de BROWN E KOSHLAND (9,10), que indicam que a ativação de Cl ligado ao complexo apresenta 4 ou mais moléculas de anticorpo. A discordância entre os dois grupos de dados, talvez seja explicada pela diversidade da natureza do imunocomplexo empregado.

As investigações sobre a natureza do primeiro componente do complemento, indicaram a existência de, pelo menos, 3 subcomponentes: Cl_q, Cl_r e Cl_s que formam, na presença de ions Ca⁺⁺, uma unidade funcional (11, 12) capaz de se combinar reversivelmente com o complexo antígeno-anticorpo.

O subcomponente Cl_q é uma glicoproteína de 400.000 daltons, constituída de 6 subunidades, ligadas não covalentemente. Cada subunidade é constituída de 3 cadeias polipeptídicas distintas, ligadas cova-

lentamente. Estas cadeias polipeptídicas apresentam uma região intermediária com a sequência semelhante à colágeno e regiões terminais com a sequência semelhante à das proteínas globulares. Em concordância com os dados físico-químicos (13 a 17), a análise do Clq, ao microscópio eletrônico, indica uma estrutura grosseira, semelhante a "bouquet", constituída de um corpo central fibrilar, emitindo 6 fibrilas do tipo colágeno com 6 regiões globulares periféricas (18, 19, 20). BRODOSKY-DOYLE et al. (21) indentificaram, nas regiões fibrilares, a estrutura de hélice tripla semelhante à do colágeno.

O subcomponente C1r, uma glicoproteína com mobilidade eletroforética correspondente à β globulina, constituída por 2 cadeias polipeptídicas de 95.000 daltons, ligadas não covalentemente. Da ativação da molécula, provavelmente por proteólise restrita, resultam 2 subunidades de 60.000 e 35.000 daltons, ligadas por pontes de dissulfeto (22 a 24). O sítio ativo foi localizado na cadeia de 35.000 daltons (25).

A proenzima C1s é uma α globulina, constituída por uma simples cadeia polipeptídica de 86.000 daltons. A ativação de C1s requer aparentemente uma quantidade equimolar de C1r ativado (26 a 28) e depende da clivagem de uma ligação polipeptídica da qual resultam 2 cadeias de 56.000 e 30.000 daltons (29, 30). O sítio ativo foi localizado na cadeia de 30.000 daltons (31, 32).

A análise da interação da IgG com os subcomponentes de C1 indica que o Clq isolado se liga à imunoglobulina (33, 34) e que C1r e C1s só se ligam ao imunocomplexo, se Clq tiver sido previamente ativado (23, 26).

As investigações sobre a região da molécula de Clq que interage com o sítio de ligação para o C na molécula de imunoglobulina foram realizadas através do estudo da digestão proteolítica de Clq. REID et al. (16) verificaram que as regiões periféricas de Clq eram resistentes à ação da collagenase e susceptíveis à ação da pepsina. KNOBEL et al. (35) evidenciaram que o sítio de ligação está localizado na região periférica devi-

do a sua capacidade de interação com o complexo ovoalbumina-anti-ovoalbumina. REID et al. (36) realizaram um estudo com o fragmento pepsínico de Clq e observaram que este fragmento não interagiu com o complexo antígeno-anticorpo, mas que era capaz de inibir a reconstituição da atividade hemolítica de Cl, competindo com a molécula nativa de Clq na utilização dos subcomponentes C1r e C1s. Esta competição do fragmento pepsínico de Clq, na utilização de C1r e ou C1s, apoia as observações de KNOBEL et al. (19), de que a subunidade central de Clq pode interagir com C1r e ou C1s.

Os resultados experimentais, utilizando-se a IgG ligada a Sepharose (37) e sistema hapteno monovalente-anticorpo (38), sugerem que o C1r também pode se fixar na região Fc da molécula da imunoglobulina. Contudo esses dados não foram confirmados quando se utilizou o modelo de hemácias sensibilizadas (23).

A análise por ultracentrifugação da mistura de imunoglobulinas e Clq isolados mostrou que as formas monoméricas de IgG e IgM, são capazes de se ligar a Clq (33,39) e sugere que este subcomponente tenha de 12 a 18 sítios de ligação.

A ligação com a IgM é facilitada devido à sua conformação estrutural e a efetividade da IgG depende do seu grau de polimerização. Dentre as subclasses de IgG humana, existem as que possuem maior ou menor afinidade para Clq, na seguinte ordem de reatividade: IgG3, IgG1, IgG2 e IgG4 (34,39). Conclusões semelhantes (40) foram obtidas com as imunoglobulinas IgG ou IgM, ligadas a Sepharose, utilizando-se Clq nativo previamente marcado com I^{125} .

Através do estudo cinético da interação de Clq com a IgG, agregada com glutaraldeído, LIN e FLETCHER (41) verificaram que a ligação de Clq é rápida, específica e saturável. A concentração de sal nesta interação não apresenta efeito competitivo, mas observa-se um deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de dissociação, quando a força iônica é diferente de 0,15 M. Contudo esses dados sobre o efeito da força iônica parece depender essencialmente da natureza do complexo antígeno-anticorpo em

estudo, porquanto alguns autores (42,43) observaram que ocorria maior afinidade de ligação à medida que diminuía a força iônica. A natureza dos grupos químicos de Clq envolvidos na interação com a imunoglobulina tem sido investigada, utilizando-se moléculas de Clq tratadas com grupos químicos definidos. Vários autores (40,41) observaram que Clq perde a capacidade de se ligar à imunoglobulina quando tratada com determinados compostos químicos, tais como : alquilas diaminadas (1,4 diamino butano; 1, 10 diamino decano) e diaminas aromáticas (2,5 diamino tolueno e 1,4 diamino piperazina), polianions (heparina) e polinucleotídeos como DNA.

A maioria das informações, atualmente disponível, indica que a região Fc é capaz de fixar Cl (39, 44 a 51) e os dados de vários autores indicam que o sítio de fixação de Cl está localizado no domínio CH2 desta região (52,53,54), admitindo-se também o envolvimento de estruturas pertencentes ao domínio CH3 (49,51). A região Fab, embora não participe diretamente, aparentemente contribui para a ativação (51,55).

O sítio de fixação de Cl corresponde a uma sequência linear de amino ácidos que, em virtude de mudanças conformacionais que ocorrem na molécula de anticorpo, podem ou não estar acessíveis à interação (56). A evidência da presença de sítio de fixação de Cl em todas as imunoglobulinas é suportada pelo fato de que IgG4, IgA, IgM que não fixam o complemento, apresentaram um sítio de fixação de Cl oculto que pode ser exposto pelo isolamento correto do domínio ou do fragmento Fc (57).

ALLAN e ISLICKER (49,58) mostraram que a modificação progressiva dos resíduos de triptofano na molécula de IgG de coelho ou do seu fragmento Fc leva a uma redução proporcional da capacidade de fixar C. JOHNSON e THAMES (59) utilizando, seja polipeptídeo sintético, seja molécula de imunoglobulina cujos resíduos de triptofano, tirosina e arginina que tinham sido alterados, mostram que resíduos de triptofano e tirosina, situados na posição 277 e 278 da cadeia H, são fundamentais para a fixação de Cl. Através do estudo da exposição de cromóforos aromáticos, ISENMAN et al. (60) mostraram a existência de uma correlação direta entre o número de resí

duos de triptofano e tirosina expostos e atividade de fixação de Cl. Observaram também que a exposição dos cromóforos do fragmento Fc era menor do que o esperado dos resultados obtidos com os domínios CH₂ e CH₃ isolados. Os autores sugerem que a interação-interdomínio limita a exposição desses resíduos aromáticos.

Recentemente FUST et al. (61) verificaram que a capacidade de fixação de Cl pelas imunoglobulinas depende fundamentalmente do método de agregação empregado (imunocomplexo SAB-anti-SAB, Ov- anti-Ov e IgG humana agregada pelo calor e agregação interfacial). Tendo por base essas observações, os autores concluem que na interação entre Cl e as diferentes preparações podem ocorrer 3 diferentes possibilidades: 1) Fixação firme, seguida de ativação. 2) Fixação sem ativação. 3) Fixação, ativação e liberação na fase fluida onde irá ativar o seu substrato natural. A base estrutural dessas interações não é conhecida. Contudo pode-se inferir que a molécula de imunoglobulina possui, ou 2 sítios diferentes ou 2 estados estruturais diferentes, um que fixa Cl e outro que desencadeia sua ativação. Recentemente GOERS et al. (38) sugeriram também a presença de um sítio de fixação de Cl e de um sítio de ativação na molécula de imunoglobulina, o primeiro que interage com Clq e o segundo que afeta o subcomponente C1r da molécula de Cl. Se esta hipótese for aceita, nada impede que esses sítios resultem de alterações alostéricas de imunoglobulinas tal como preconizado por THOMPSON e HOFFMAN (62).

O conjunto de informações disponível sobre a interação Clq com as moléculas de imunoglobulinas indica que essa interação depende da existência nessas moléculas de um domínio estrutural amplo, mas de tamanho definido. Esta interação depende fundamentalmente da presença de grupos aniônicos dentro ou próximo do sítio de ligação, como do estado estrutural da molécula de anticorpo (43, 61).

O mecanismo de conversão de Cl em C1 não está elucidado, admitindo-se, no entanto, que existe um processo de ativação que é lento e dependente de temperatura (64). Igualmente obscuro é o processo de

conversão de Clr a Clr ativo, embora se tenha revelado que nesse processo ocorre uma clivagem proteolítica de Clr (24,25,30,65). Como nenhuma atividade enzimática foi detectada no subcomponente Clq, admite-se que a ativação de Clr seja resultante de uma ativação interna acarretada por mudanças conformacionais críticas que ocorrem após a sua interação com o imunocomplexo (20). ZICCARDI e COOPER (24) admitem que nessas condições, o sítio se tornaria acessível em virtude do rearranjo das subunidades ligadas não covalentemente, tornando possível a hidrólise de uma ligação peptídica da subunidade adjacente. Esta hipótese é suportada, pelo fato de que alguns zimógenos possuem atividades enzimáticas latentes que são potencializadas após a mudança conformacional ou clivagem proteolítica (66).

Os trabalhos realizados com o sentido de elucidar a localização do sítio de fixação de C, ou a interação Cl-IgG, ou a inibição dessa interação, utilizaram como efetores, compostos químicos definidos ou as moléculas de proteínas alteradas estruturalmente. Entretanto vários autores mostraram que a integridade tridimensional dos sítios de ativação é fundamental para a eficiência da fixação de Cl a IgG. A redução de pontes de dissulfeto (67,68), bem como tratamento ácido da molécula (50) levam a uma perda drástica na eficiência da fixação de Cl.

Por esta razão seria importante verificar a possibilidade de se encontrar um método de investigação que não introduzisse alterações drásticas na molécula em estudo. Tendo em vista que o fenômeno da imuno hemólise por soros anti-IgG (69 a 74) está na dependência da natureza das imunoglobulinas presentes nesses soros (75) procuramos investigar no presente trabalho a possibilidade da utilização do fenômeno de inibição da imuno hemólise, como instrumento para investigação do mecanismo de interação de Cl ao imunocomplexo.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTÍGENOS. A soro albumina bovina cristalina (SAB) foi obtida de Pentex, Kankakee, Illinois. A IgG de coelho foi obtida por fracionamento do soro normal de coelho, por precipitação a 50 % de saturação com solução saturada de sulfato de amônio, conforme as indicações de KABAT e MAYER (76) seguida por cromatografia em coluna de DEAE-celulose, previamente equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 8,0. Os fragmentos Fab e Fc de coelho foram preparados de acordo com as indicações de PORTER (77). A IgS normal de carneiro foi obtida através da cromatografia de soro normal de carneiro em coluna de DE-celulose, previamente equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 8,0.

Todos os antígenos preparados, testados através de dupla difusão e de imunoeletroforese em gel de ágar, utilizando-se imunesoros plúriespecíficos, apresentaram uma única linha de precipitação.

IMUNESOROS. O soro de coelho anti-hemácia de carneiro (co.anti-E) foi obtido segundo as indicações de MAYER (78) e apresentou um título hemolítico de 1000 UH/ml.

O soro de cobaia anti-estroma de carneiro (cb.anti-E) foi obtido conforme o esquema preconizado por KIMURA et al. (74). A mistura de soros de 15 cobaias utilizada no presente trabalho continha 40 UH/ml de anticorpo hemolítico.

Os soros de coelho, anti-soro normal de carneiro (anti-SNcar.) e anti-IgS de carneiro (anti-IgS) foram obtidos de coelhos imunizados de acordo com o seguinte esquema: os animais foram inoculados nos linfonodos com 0,5 ml da mistura em partes iguais de Ag (10 mg/ml) em adjuvante completo de Freund. Seguido, quatro semanas após, de uma inoculação por via intramuscular de 0,5 ml da mesma mistura. Os animais eram sangrados 2

semanas após a última dose.

O soro de cobaia anti-IgG de coelho (cb.anti-IgG) foi obtido por imunização segundo o esquema preconizado por RANGEL (79). A mistura desses imunesoros continha 350 µg de proteínas de Ac/ml.

O soro de carneiro anti-IgG de coelho (car.anti-IgG) foi obtido inoculando-se 2 carneiros com 1 ml da mistura de volumes iguais de IgG (1,5 ml) e adjuvante completo de Freund por via subcutânea. Decorridas 5 semanas após a primeira dose, os animais foram inoculados por via intramuscular com 1 ml da mesma mistura. Após 12 dias, os animais foram sangrados. Os imunesoros de carneiro anti-IgG nº1 e nº2 continham respectivamente 3,6 e 12 mg de proteínas de Ac/ml.

O soro de carneiro anti-Fab de coelho foi obtido utilizando-se o mesmo esquema para a obtenção de soro anti-IgG. Este imunesoro continha 1,6 mg de proteínas de Ac/ml.

Todos os imunesoros obtidos foram inativados a 56°C por 30 minutos e mantidos a -20°C até o momento de uso.

REAGENTES E SOLUÇÕES TAMPÕES. A mercuri-papaina foi obtida de ICN. Life Science Group. Cleveland Ohio. DEAE- celulose (0,9 meg/g.) e CM-celulose foram obtidas de Bio Rad Laboratory, Richmond, Califórnia. DE-52 Whatman celulose foi obtida de W. R. Balstar, Inglaterra. Sepharose-2B da Sigma Chemical Company. 4, 4' bifenil bis diazonio fluoroborato (BDF) foi preparado segundo as indicações de ROE (80).

O tampão veronal sódico, contendo quantidades ótimas de Ca^{++} e Mg^{++} , foi preparado segundo MAYER et al. (81) com a adição da gelatina a 0,1 %, como indicado por STEIN e VAN NGU (82). O tampão veronal sódico pH 7,4 contendo 0,01 M de EDTA foi preparado de maneira similar, com exceção da ausência de ions Ca^{++} e Mg^{++} . O tampão veronal sacarose 0,065 M foi preparado segundo as indicações de RAPP E BORSOS (83). Os demais tampões (fosfato, glicina-HCl) foram preparados conforme as instruções fornecidas por GOMORI (84).

ISOLAMENTO DE IMUNOGLOBULINAS. A fração IgG da hemolisa (soro de coelho- anti-estroma de hemácias de carneiro) foi obtida através da cromatografia em coluna de DEAE-celulose (2 x 45 cm) de porções de 25 ml do imunesoro, contendo um total de 1,4 g de proteínas. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato 0,02 M pH 8,0 (85) e o material foi eluído inicialmente com o mesmo tampão a um ritmo de 60 ml/h, coletando-se amostras de 5 ml por tubo. Após a eluição do primeiro pico de proteínas (FI), o tampão inicial era substituído pelo tampão fosfato 0,05M pH 8,0. a fração eluída com este tampão foi denominada de FII. O controle imunoeletroforético dessas frações frente a um soro de carneiro anti-soro normal de coelho mostrou, na fração FI, apenas um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a gama globulina. A fração FII não foi utilizada no presente trabalho.

A fração FI contendo anticorpos da classe IgG foi utilizada para o preparo de hemácias sensibilizadas (EA).

A IgS e IgF de carneiro anti-IgG foram obtidas de cromatografia em colunas de DE-52 Whatman celulose (3 x70 cm) de 30 ml de imunesoro contendo 3,2 g de proteínas. A coluna foi previamente equilibrada e eluída com tampão fosfato 0,005M pH 8,0, obtendo-se nessas condições a primeira fração (FI). As demais frações (FII a FIV) foram obtidas utilizando-se tampão fosfato cujo pH e molaridade são indicadas a seguir: 0,01 M pH 6,3 para fração FII, 0,04 M pH 6,0 para as frações FIIa e FIIb e 0,1 M pH 5,8 para fração FIV. Os eluatos dessa cromatografia foram colhidos em porções de 2 ml, a um ritmo de 60 ml/h. As frações foram dialisadas contra água destilada a 4°C e concentradas por liofilização ou por ultrafiltração, sobre a pressão de nitrogênio em membrana PM-10 diaflo. Essas frações foram caracterizadas através da imunoeletroforese, utilizando-se soro de coelho anti-soro normal de carneiro. A fração caracterizada como IgS continha uma concentração de anticorpo específico correspondente a 25% do seu teor proteico.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. A Sepharose-Fc e Sepharose-Fab foram preparadas de acôrdo com as indicações de CUATREACASAS e ANFENSEN (86) e continham respectivamente 3,0 mg e 5,5 mg de proteínas /ml.

Os anticorpos específicos para as regiões Fab ou Fc da molécula de IgG de coelho foram obtidos através da cromatografia de porções de 1 ml de IgS anti-IgG (12 mg de proteínas/ml), respectivamente em colunas de Sepharose Fc (1 x 4 cm) ou Sepharose-Fab (1 x 10 cm), utilizando-se como eluente, salina fosfatada 0,15 M pH 7,2. Os eluatos eram constituídos, respectivamente de anticorpos anti-Fc e anti-Fab. Os anticorpos fixados à coluna eram eluídos com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5, mas não foram utilizados no presente trabalho.

PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO. As reações de precipitação quantitativa foram realizadas segundo o método de HEIDELBERGER e KENDALL (87).

PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELIFICADO. As técnicas de imunodifusão em gel de ágar foram realizadas em meio isotônico pH 7,2 segundo as indicações fornecidas por OUCHTERLONY (88). As técnicas de eletroforese e imunoeletroforese foram realizadas segundo as indicações de GRADAR e BURTIN (89), em placas de vidro de 12 x 9 cm, contendo uma camada de 3 mm de ágar a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8,6, aplicando-se um gradiente de potencial de 6 volts/cm, tempo de 1 hora e 30 minutos.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS. As concentrações proteicas foram determinadas através do reativo de biureto, segundo DITTENBRAND (90) ou do reativo de fenol segundo LOWRY (91) ou por determinação espectrofotométrica a 280 nm em Espectrofotômetro Zeiss PMQ II, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS. O sangue de carneiros normais, coletado assépticamente por punção venosa, em igual volume de solução de Alsever estéril, como indicado por MAYER (78) e armazenado a 4 °C, foi utilizado como fonte de hemácias entre o 7º e 40º dias após a sua obtenção.

As hemácias lavadas em tampão veronal eram padronizadas de modo que a diluição 1/10 em água destilada fornecesse DO de 0,420 a 550 nm. Hemácias padronizadas para as experiências de hemólise passiva eram lavadas em salina fosfatada e padronizadas de modo que a diluição 1/20 em água destilada fornecesse uma DO 0,420 a 550 nm em Espectrofotômetro Coleman Jr., em cubetas de 10 x 120 mm.

COMPLEMENTO E REAGENTES DE COMPLEMENTO. Como fonte de C foi utilizada uma mistura de soros de 20 a 30 cobaias normais. Esta mistura de soro era liofilizada e armazenada a -70°C até o momento de uso. O título de complemento determinado de acordo com as instruções fornecidas por MAYER et al. (81,92) era expresso em CH50/ml.

Os reagentes C1 e R1 foram preparados a partir de soro normal de cobaia, pelo método de diluição, segundo as indicações de MAYER (78).

O reagente R4 foi preparado de acordo com as indicações de WIRTZ (93) adicionando-se hidrazina 0,01 N ao soro normal de cobaia.

Todos os reagentes de complemento foram testados, utilizando-se o método de titulação em bloco. As preparações de C1 e R4 utilizadas no presente trabalho, quando empregadas na concentração 1/1, não induziam a hemólise de Ea ou EAcb, se usadas separadamente. No entanto se observava 100% de lise quando se utilizava a mistura de R1 diluído a 1/8 com C1, ou R4 diluído a 1/100.

A dosagem quantitativa de C1 foi realizada misturando-se diferentes quantidades de C1 ou R4 a EA ou EAcb, na presença de R1 diluído a 1/8. A unidade C1 H50 foi determinada utilizando-se a relação linear existente entre o logaritmo da concentração de C1 ou R4 e o logaritmo da

função $(y / 1 - y)$. As preparações de C1 e de R4 apresentaram respectivamente 3000 UCl e 2500 UCl.

O complexo EAC1 foi preparado misturando-se volumes iguais de suspensões de EA ou EAcB a quantidades conhecidas de C1 ou R4 e incubando-se a mistura a 0°C por 30 minutos. Após a lavagem com tampão veronal (2 vezes), a suspensão era padronizada de modo que a diluição 1/5 em água destilada fornecesse DO 0,420 a 550 nm. A eficiência lítica dessas preparações foi testada com o reagente R1 diluído a 1/8.

PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOLÍTICOS. No presente trabalho 2 sistemas hemolíticos foram utilizados : 1) Hemácias sensibilizadas (EA) com anticorpo purificado da classe IgG obtido de coelhos imunizados com hemácias de carneiro. 2) Hemácias sensibilizadas (EAcB) com anticorpos provenientes do soro de cobaia anti-hemácia de carneiro.

A sensibilização foi realizada em presença de tampão veronal EDTA 0,01 M a 37°C por 30 minutos. Após o período de sensibilização as hemácias foram lavadas com tampão veronal EDTA (uma vez), e tampão veronal isotônico (duas vezes) e repadronizadas.

HEMÓLISE PASSIVA. As preparações de hemácias sensibilizadas com antígeno (EG) e as experiências de hemólise passiva direta e indireta foram realizadas segundo as indicações fornecidas por RANGEL et al. (94).

As condições ótimas de Ag e BDF para a conjugação foram as seguintes : SAB (1mg/ml) com 0,1 mM de BDF, IgG, Fc e Fab (4 mg/ml) com 0,05 mM de BDF.

Salvo quando expressamente indicado, as hemácias conjugadas com o Ag e sensibilizadas com anticorpo (EGA) foram preparadas, utilizando-se hemácias conjugadas com SAB e sensibilizadas com 0,24 µg, ou 0,44 µg de NAc/ml de anti-SAB. Estas hemácias assim preparadas forneciam respectivamente 50 % ou 100 % de lise quando na presença de 8 CH 50/ ml de

C. Todas as experiências de hemólise passiva foram realizadas utilizando-se a mistura de 0,5 ml de reagente (EGA, EG, C) e tampão veronal isotônico para completar o volume de 2,5 ml.

Os controles de reação, sistematicamente incluídos em cada experiência sempre forneceram os seguintes resultados :

- | | |
|---|-----------------|
| 1) EGA diluída a 1/5 em água destilada | 100 % de lise |
| 2) EGA + tampão veronal | 0 a 5 % de lise |
| 3) EG + tampão veronal | 0 a 5 % de lise |
| 4) EG + C | 0 a 5 % de lise |

INIBIÇÃO DA LISE DO SISTEMA EGA OU EA. A inibição da lise do sistema hemolítico pela ação da IgS anti-IgG foi investigada misturando-se 0,5 ml de EA ou EGA com 0,5 ml de IgS anti-IgG em diferentes concentrações. Após a incubação a 37°C por 30 minutos, as hemácias eram lavadas com tampão veronal (duas vezes) e ressuspensas em 2 ml do mesmo tampão. A seguir 0,5 ml de C, contendo 8 CH50/ml era adicionado à mistura que era reincubada a 37°C por 45 minutos. Após o período de incubação os tubos eram centrifugados a 270 g por 10 minutos a 4°C, determinando-se a absorbância dos sobrenadantes a 550 nm. A determinação da concentração da IgS anti-IgG capaz de inibir 50 % da lise do sistema hemolítico (IH 50) foi realizada utilizando-se a relação linear existente entre o logaritmo da concentração da IgS anti-IgG e o logaritmo da função ($y / 1 - y$).

ABSORÇÃO DA IgS ANTI-IgG COM OS FRAGMENTOS Fab ou Fc DE COELHO. Aliquotas de 2 ml da IgS anti-IgG foram absorvidas com 1 ml de hemácias conjugadas ao fragmento Fab ou Fc (E-Fab ou E-Fc) por 30 minutos a 4 °C de modo a obter anticorpos específicos para região Fc e Fab da molécula de IgG de coelho. Após a absorção, a especificidade dos anticorpos obtidos foi testada através da hemaglutinação passiva.

HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA. O teste de hemaglutinação pas

siva foi realizado segundo as indicações fornecidas por BORDUAS e GRABAR (95).

As hemácias sensibilizadas com os antígenos IgG, Fc ou Fab foram preparadas misturando-se volumes iguais de hemácias taninizadas e soluções de IgG ou Fc (100 $\mu\text{g/ml}$) e Fab (200 $\mu\text{g/ml}$). As misturas de reação eram constituídas de 100 μl da diluição de anticorpo e 20 μl de hemácias sensibilizadas. As leituras foram realizadas após 2 horas de incubação à temperatura ambiente.

RESULTADOS

1. PAPEL DAS DIFERENTES IMUNOGLOBULINAS NA INIBIÇÃO DA LISE.

A ação dos imunesoros de cobaia e de carneiro foi investigada utilizando-se suspensões de EA ou EGA que forneciam 50 % de lise quando em presença de excesso de C e procurando-se verificar a alteração de grau de lise desse sistema, quando submetido a ação de quantidades variáveis de soro anti-IgG.

Na Fig. 1 acham-se apresentados os resultados obtidos quando uma suspensão de EGA foi submetida a diferentes quantidades de um soro de cobaia anti-IgG de coelho (56 μ g NAc/ml). Pode-se observar que o soro de cobaia reforçou ou inibiu a lise de EGA, dependendo da concentração utilizada. Com concentrações superiores a 1,75 μ g de NAc/ml observa-se a redução no grau de lise dessas hemácias, enquanto que com uma concentração de 0,87 μ g de NAc/ml observa-se um aumento no grau de lise. O grau de lise das hemácias não foi alterado quando concentrações inferiores a 0,043 μ g de NAc/ml eram utilizadas.

Resultados semelhantes foram obtidos com soro de carneiros anti-IgG de coelho imunizados com a IgG de coelho ou com fragmento Fab. Esses soros igualmente reforçaram ou inibiram a lise, dependendo da concentração empregada Fig. 2.

Experiências controles mostraram que soros normais de cobaias e de carneiro não tinham nenhuma influência apreciável sobre o grau de lise de EA ou EGA, de modo que podemos concluir que tanto o aumento como a redução da lise dependem da ação de imunoglobulinas dos soros anti-IgG. No caso de soro de cobaia já havia sido demonstrado que este fenômeno se deve à presença de diferentes subclasses de imunoglobulinas, sendo que a IgG1 inibe a lise de EA ou EGA, enquanto que a IgG2 aumenta o grau de lise.

Embora tenha sido demonstrada a presença de diferentes subclasses de IgG no soro de carneiro, a ação dessas subclasses sobre o sig

tema hemolítico não foi investigada. Com o fito de elucidar o fenômeno da inibição procuramos isolar e testar as diferentes subclasses de imunoglobulinas dos soros de carneiro anti-IgG de coelho.

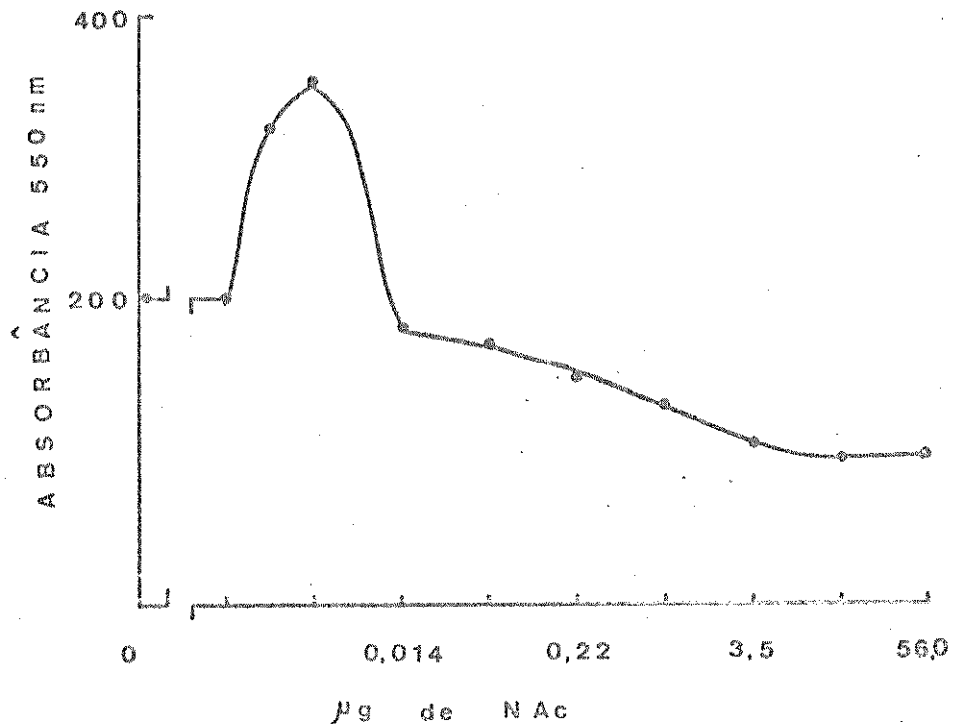


Fig. 1. Influência de diferentes concentrações de anticorpos anti-IgG produzidos em cobaias sobre o grau de lise específica de ECA.

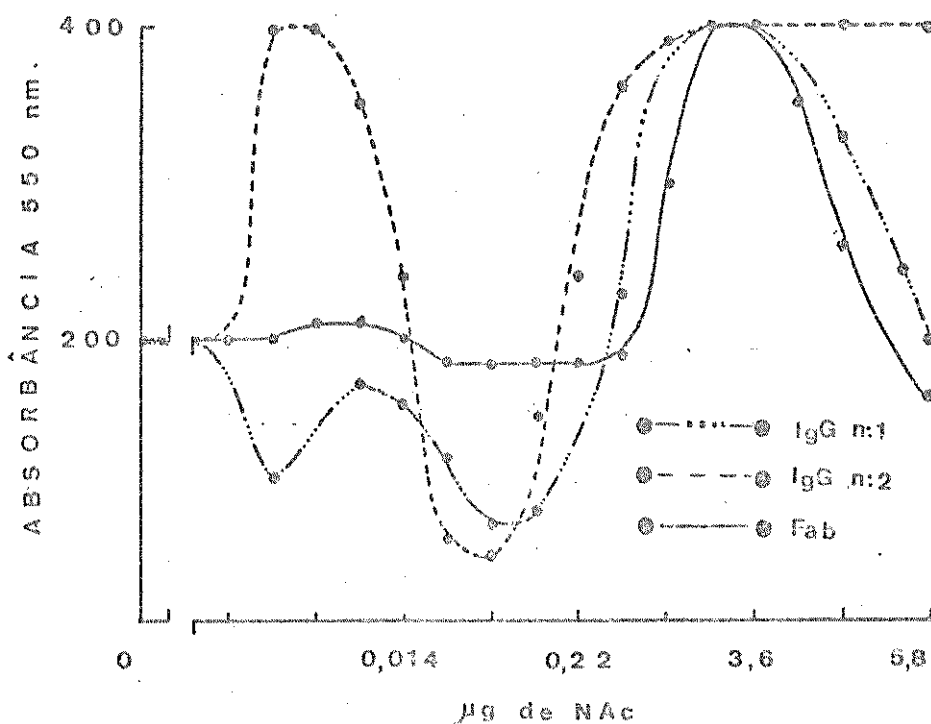


Fig. 2. Influência de diferentes concentrações de anticorpos anti-IgG e anti-Fab produzidos em carneiros sobre o grau de lise específica de ECA.

1.2 ISOLAMENTO DE IMUNEGLOBULINAS DE CARNEIRO.

Os soros de carneiro anti-IgG de coelho foram cromatografados em colunas de DE-52-celulose, sob as condições descritas em material e métodos; o perfil de uma dessas cromatografias acha-se representado na Fig.3, onde se pode verificar que foram obtidas 5 diferentes frações.

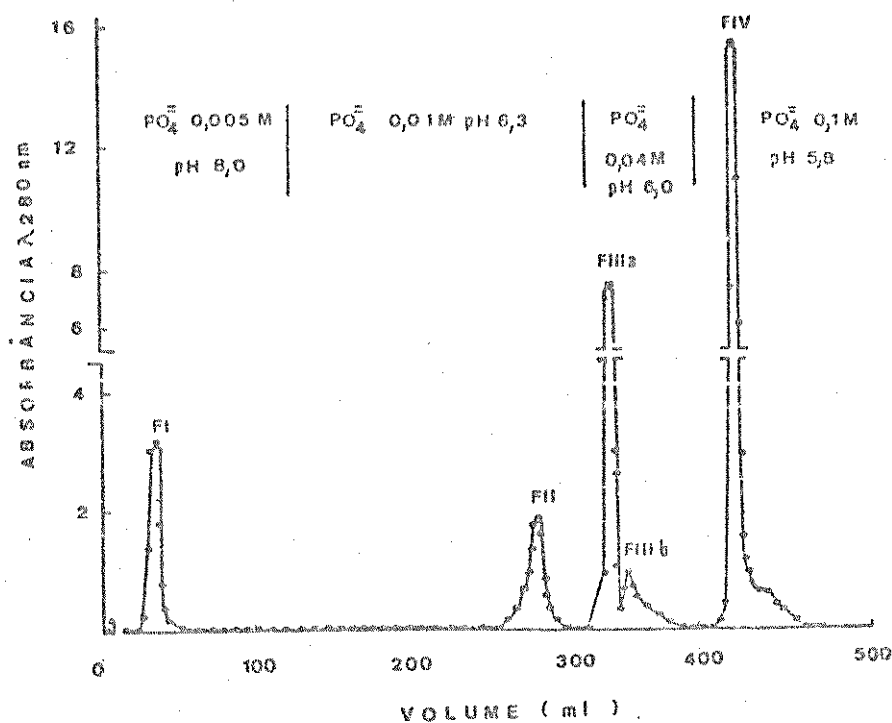


Fig.3. Cromatografia em DE-celulose do soro de carneiro anti-IgG de coelho.

A análise por imunoeletroforese do soro de carneiro anti-IgG de coelho e das diferentes frações cromatográficas, utilizando-se um soro de coelho anti-SNcar (Fig.4) mostrou que o soro de carneiro anti-IgG de coelho apresentava, na região da gama globulina, duas imunoglobulinas, uma de mobilidade lenta (IgS) e outra de mobilidade mais rápida (IgF). Nessas experiências a fração FI apresentou um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a IgS, enquanto que a fração FII apresentou um componente principal com mobilidade eletroforética correspondente a IgF e um segundo componente com mobilidade de β globulina. As demais frações (FIIIa a FIV) apresentavam-se contaminadas com diferentes componentes.

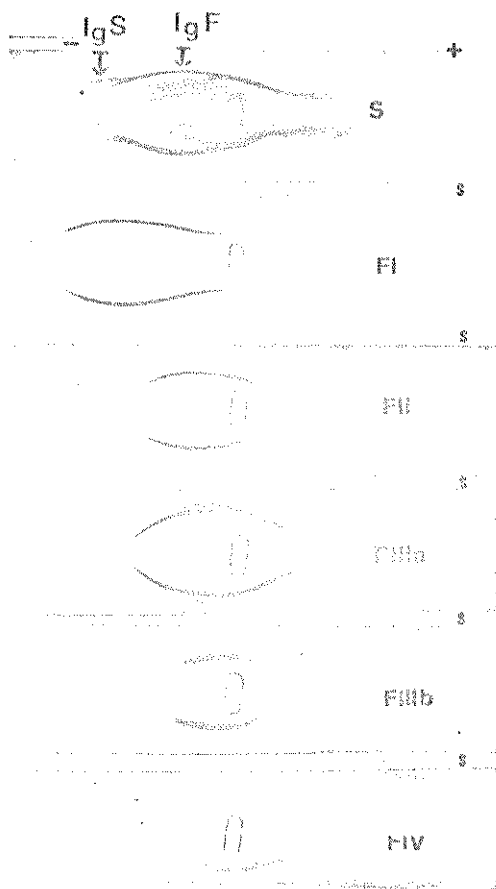


Fig.4. Imunoelctroforese de soro de carneiro anti-IgG de coelho e das frações obtidas em cromatografia em DE-celulose (FI a FIV) contendo 5 mg de proteínas /ml.

Investigações da atividade dessas frações sobre a lise específica foram realizadas, utilizando-se suspensões de EA ou EGA que forneciam 50 % de lise quando em presença de 8 CH50/ml de C. Nessas condições observou-se que a FI, utilizada em diferentes concentrações, apresentou apenas o fenômeno de inibição de lise, não se tendo observado nenhum reforço de lise com quaisquer das concentrações utilizadas (Fig.5). As demais frações apresentaram um comportamento semelhante ao do soro imune não purificado, observando-se reforço ou inibição da lise de acordo com a concentração utilizada. Fig.6.

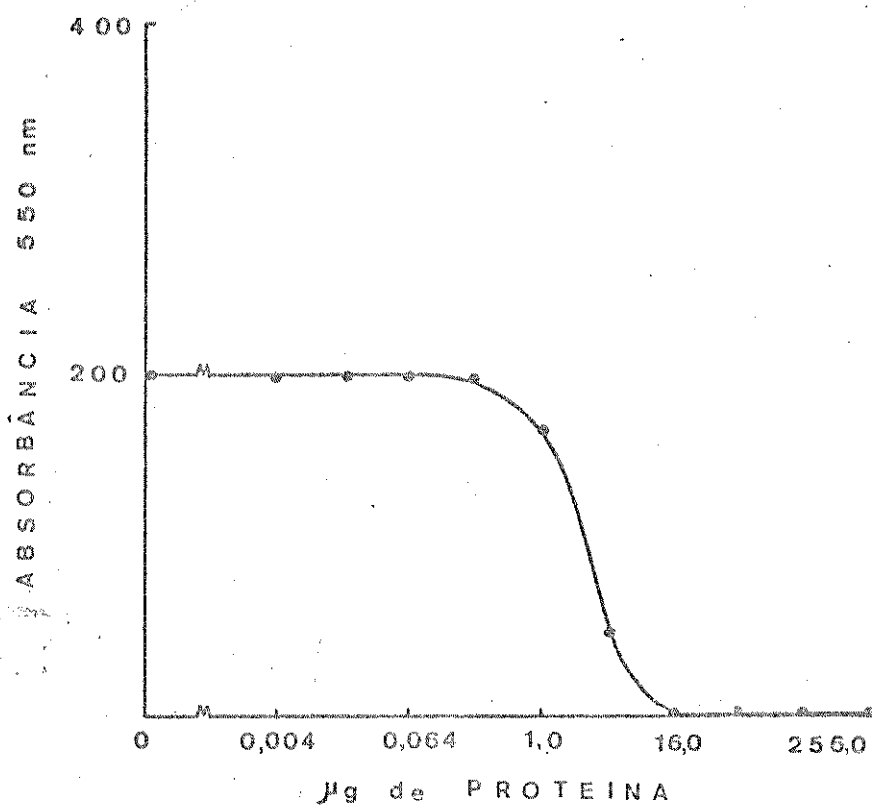


Fig. 5. Inibição da lise de ECA pela FI.

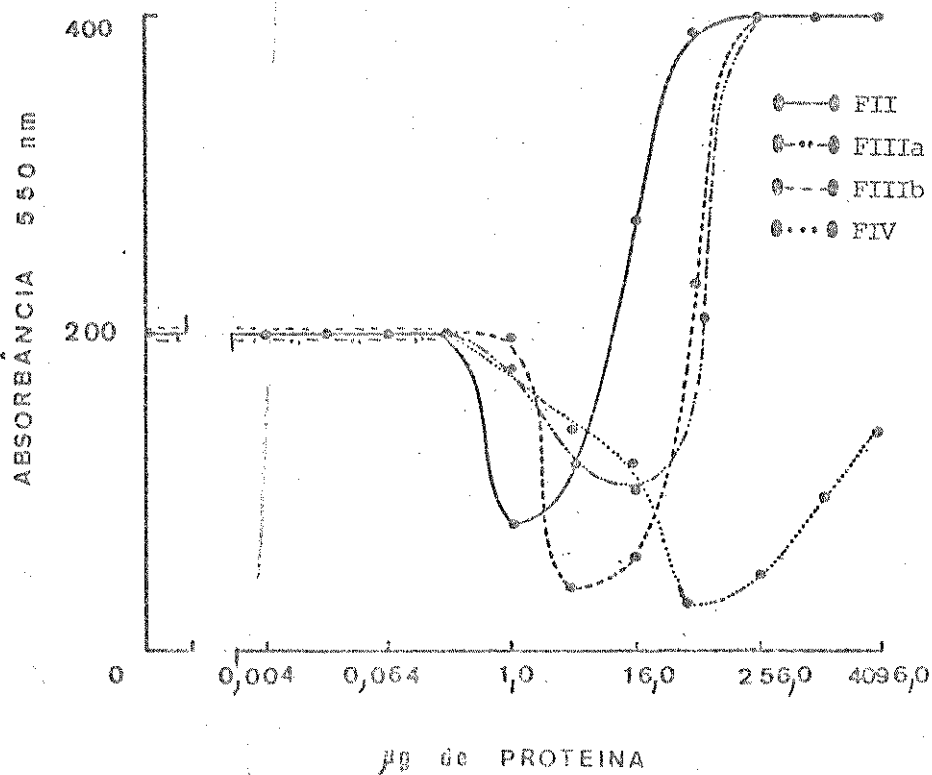


Fig. 6. Influência de diferentes concentrações de anticorpos anti-IgG e anti-Fab produzidos em carneiro sobre o grau de lise específica de ECA.

1.3. INIBIÇÃO DA LISE ESPECÍFICA PELA AÇÃO DA IgS anti-IgG DE COELHO.

Estudo dos fatores que influenciam a inibição da lise específica pela ação da IgS anti-IgG purificada foi realizado, utilizando - se EA e EGA sensibilizados com uma concentração de anticorpo capaz de lisar 100 % das hemácias sensibilizadas em presença de 8 CH50/ml de C.

Na Tabela I acham-se apresentados os resultados obtidos quando se procurou verificar se a IgS anti-IgG de coelho induzia alterações comparáveis no grau de lise de EA e de EGA. Pode-se verificar naquela tabela que não houve diferença significativa, entre o grau de lise de EA e de EGA, quando essas suspensões eram submetidas a uma mesma concentração de IgS anti-IgG e que uma concentração de 3,3 µg de NAc/ml desta imunoglobulina era capaz de inibir totalmente a lise tanto de EA quanto de EGA.

TABELA I. INIBIÇÃO DA LISE DE EA OU DE EGA PELA AÇÃO DA IgS ANTI-IgG PURIFICADA

COMPOSIÇÃO DA MISTURA	CONCENTRAÇÃO DA IgS µg de N Ac/ml	GRAU DE LISE %	
		EA	EGA
EA ou EGA , IgS e C	6,6	0,0	0,0
	3,3	0,0	0,0
	1,6	5,0	7,0
	0,8	70,0	63,0
	0,4	88,0	80,0
CONTROLES			
EA ou EGA e T	-	0,0	0,0
EA ou EGA e C	-	100,0	100,0
E ou EG e C	-	0,0	0,0
EA ou EGA e IgS	6,6	0,0	0,0

Investigações sobre as relações entre a quantidade de IgS anti-IgG purificada e o grau de lise (y) de EGA ou EA, mostraram que existe uma relação linear entre o logaritmo da concentração da IgS anti-IgG e o logaritmo da função $y / 1 - y$ (Fig.7), possibilitando-se expressar essas relações pela equação de von KROGH (78).

$$x = K (y / 1 - y)^h$$

onde, x representa a quantidade de IgS; y a porcentagem de hemólise; h uma constante dependente das condições experimentais e K a concentração de IgS anti-IgG capaz de inibir a lise de 50 % de EA ou de EGA. Este valor de K representa por conseguinte a dose inibitória 50 % (IH50).

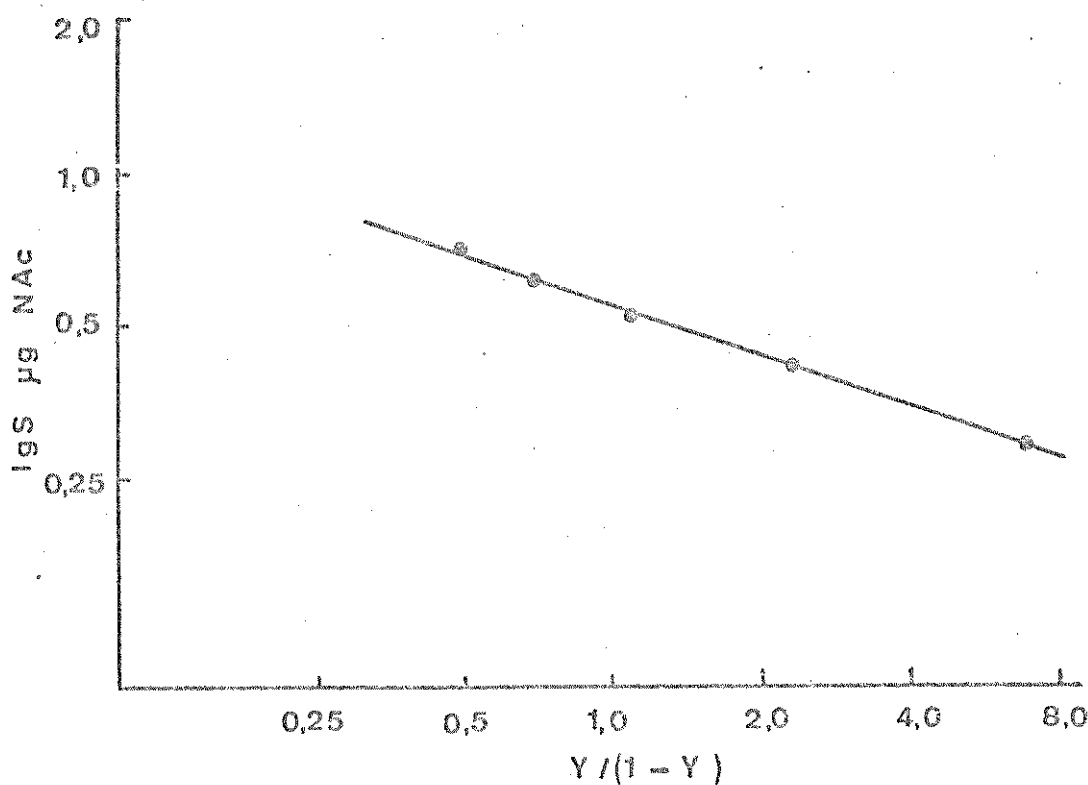


Fig. 7 . Relação entre a quantidade de IgS anti-IgG e o grau de lise (y) de EA.

A fim de investigar as relações entre a quantidade de anticorpo presente na superfície das hemácias e o grau de inibição da lise induzida por determinada quantidade de IgS anti-IgG foram realizadas experiências em que se procurou determinar o grau de lise de EG sensibilizadas com diferentes doses de anticorpos específicos, e submetidas a ação de dife

rentes concentrações de IgS anti-IgG.

A dose IH50 determinada com hemácias sensibilizadas com uma quantidade ótima de Ac (capaz de fornecer 100 % de lise) foi diferente da IH50 determinada com hemácias sensibilizadas com quantidades inferiores de Ac. No entanto não se pode comparar essas doses, visto que as relações entre a dose de IgS anti-IgG e o grau de lise foi representada por sigmóides com diferentes inclinações (Fig.8).

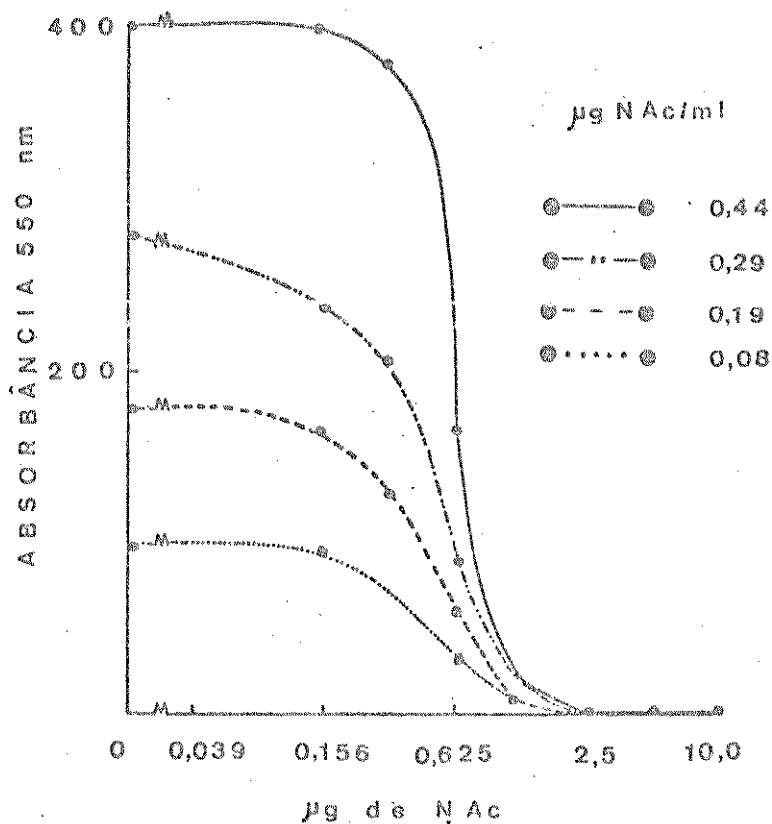


Fig.8. Ação da IgS anti-IgG sobre a lise de EGA sensibilizadas com diferentes concentrações de anticorpo (µg de NAc/ml).

Observou-se contudo um paralelismo entre as retas que descrevem as relações dose-efeito, quando se procurou determinar IH50, utilizando-se hemácias sensibilizadas com dose ótima de anticorpo (EA 100) e hemácias sensibilizadas com uma dose 2 vezes maior de anticorpo (EA 200). Nestas circunstâncias a IH50, determinada com EA foi 2 vezes maior do que a IH 50 determinada com EA 100 Fig.9.

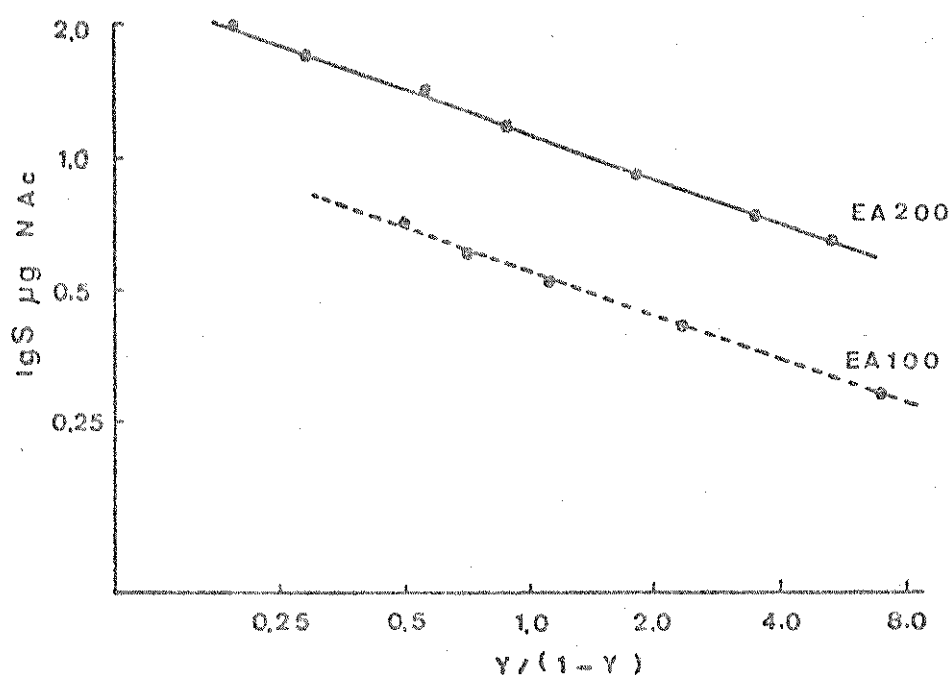


Fig. 9. Determinação quantitativa da IgS anti-IgG sobre EA 100 e EA 200 μ g de proteínas.

2. MECANISMO DE INIBIÇÃO DA LISE.

Com a finalidade de verificar se a IgS anti-IgG poderia estar absorvendo C nas condições experimentais utilizadas, foram realizadas experiências em que a EA, previamente misturada a igual volume de IgS anti-IgG contendo 3,3 μ g de NAc/ml, era misturada a 8 CH50/ml de C e incubada a 0°C por 18 horas. Os controles eram constituídos por EA misturada a IgSn (IgSn) contendo 100 μ g de proteínas e de C. Após incubação, os tubos eram centrifugados a 270g por 10 minutos, e o número de unidades de C dos sobrenadantes determinado.

Os resultados acham-se sumariados na Tabela II, onde se pode observar que o título de C na mistura contendo EA e IgS anti-IgG não sofreu alteração apreciável, em relação ao controle contendo apenas tampão e C, ao passo que na mistura contendo EA e IgSn, houve absorção quase total de C, indicando que a inibição resulta de uma interação específica da IgS

anti-IgG com os anticorpos presentes na superfície da hemácia.

TABELA II. DOSAGEM DE C NA MISTURA DE EA IgS ANTI-IgG

COMPLEMENTO (8 CH50) na presença de	U CH 50 após incubação
1) EA	1,0
2) EA + IgSn	1,0
3) EA + IgS anti-IgG	7,0
4) Tampão	8,0

Com o sentido de verificar se a inibição da lise específica mediada pela IgG anti-IgG era devido ao bloqueio da fixação de Cl ao complexo EA, foram realizadas experiências em que EA incubada (0°C por 30 minutos) com Cl ou R4 (de modo a permitir a formação de complexo EACl) era submetida a ação (0°C, 30 minutos) da IgS anti-IgG de coelho (2 µg NAc/ml) e o grau de lise determinado após incubação em presença de R1 (diluído 1/8) por 45 minutos a 37°C . Nas experiências controles a EA era submetida inicialmente a ação da IgS anti-IgG e em seguida incubada com Cl ou R4, determinando-se o grau de lise como acima, após incubação em presença de R1 a 37°C por 45 minutos.

Pode-se verificar na Tabela III que a IgS anti-IgG não foi capaz de inibir a lise específica quando EA era previamente incubada com Cl ou R4, indicando assim que a IgS aparentemente não interfere na lise de EACl.

TABELA III. AÇÃO DA IgS ANTI-IgG SOBRE EAcl.

COMPOSIÇÃO DA MISTURA E ORDEM DE ADIÇÃO DOS REAGENTES	GRAU DE LISE %
EA + Cl + IgS + R1	95,0
EA + IgS + Cl + R1	0,0
EA + Cl + R1	100,0
EA + Cl	0,0
EA + IgS + Cl	0,0
EA + R4 + IgS + R1	75,0
EA + IgS + R4 + R1	0,0
EA + R4 + R1	100,0
EA + R4	0,0
EA + IgS + R4	0,0
EA + R1	0,0
EA + IgS	0,0

A possibilidade de que este resultado seja dependente da quantidade de Cl fixada a EA, foi investigada utilizando-se EAcl contendo diferentes quantidades de Cl fixada. A concentração de Cl fixada a EA foi estimada determinando-se a diferença entre a concentração inicial e final de Cl nos sobrenadantes das misturas de EA e Cl após a incubação a 0° C por 30 minutos.

A Fig. 10 mostra que existe uma relação linear entre a quantidade de Cl adicionada e quantidade de Cl fixada a EA quando se utilizou quantidades de Cl inferior a 15 unidades. Quando se utilizou quantida-

des de Cl superiores a 15 unidades, as relações entre a quantidade adicionada e fixada a EA são representadas por uma curva aparentemente assintótica.

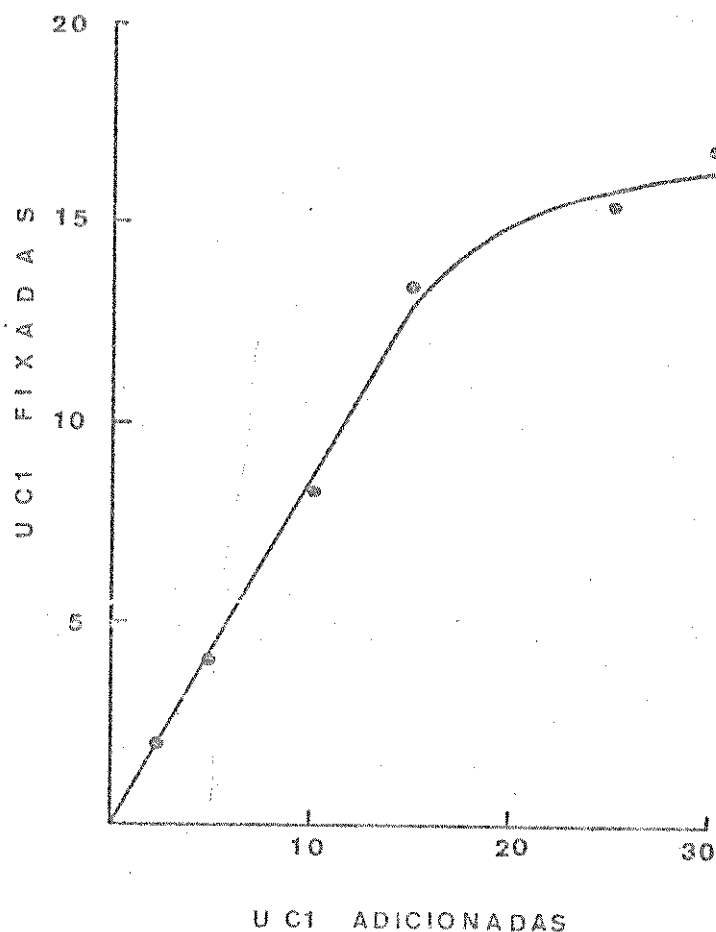


Fig. 10. Relação entre a quantidade de Cl adicionadas ao sistema e quantidade efetivamente fixadas pelo complexo EA.

Na Tabela IV pode-se verificar que a IgS anti-IgG na concentração de 2 μ g de NAc/ml foi capaz de inibir parcialmente a lise de EACl, apenas quando se utilizou EACl, preparado com menos de 15 U de Cl proveniente da fração euglobulina de soro de cobaia. Quando se utilizou o soro de cobaia submetido à ação da hidrazina, observou-se uma discreta inibição mesmo quando se utilizava preparações de EACl que aparentemente continha 15 ou mais unidades de Cl.

TABELA IV. AÇÃO DA IgS ANTI-IgG SOBRE EACL CONTENDO DIFERENTES QUANTIDADES DE Cl.

	U Cl	U Cl	GRAU DE LISE (%)	
	adicionadas	fixadas	em presença da IgS anti-IgG	
	a EA	a EA	0 µg NAc/ml	2 µg NAc/ml
Cl	5,0	4,0	95,0	42,0
	10,0	7,0	100,0	42,0
	15,0	9,8	100,0	100,0
	20,0	14,2	100,0	100,0
	40,0	22,5	100,0	100,0
E4	5,0	4,7	100,0	64,0
	10,0	9,0	100,0	66,0
	15,0	13,5	100,0	75,0
	20,0	17,4	100,0	78,0
	40,0	31,6	100,0	95,0

2.1 INTERAÇÃO DA IgS ANTI-IgG COM EACL.

As experiências anteriores mostram que a IgS anti-IgG não impede a lise de EACL, quando esta contém 10 ou mais unidades de Cl fixadas. Procuramos verificar se a IgS, absorvida pelo complexo EACL, apresentaria maior poder inibitório da lise do que a IgS anti-IgG não absorvida. Aliquotas de 2 ml da suspensão de EACL ou EA foram misturadas a 2 ml de IgS anti-IgG contendo 3,3 µg de NAc/ml e incubadas a 0°C por 30 minutos. Após o período de incubação as misturas foram centrifugadas, a 270g por 10 minutos, determinando-se nos sobrenadantes a concentração de IgS anti-IgG pelo método de hemólise passiva indireta e a dose inibitória 50 % (IH50) pelo método de inibição da lise do sistema EA. Estas experiências foram realizadas utilizando-se tampão veronal EDTA durante a fase de incubação dos sobre

nadantes com EA ou com E-IgG e tampão veronal isotônico nas fases subsequentes.

Os dados obtidos, (Tabela V) não mostraram diferenças significativas entre os sobrenadantes de EA e EACl, seja no que tange à quantidade de IgS absorvida, seja na dose inibitória 50 %.

TABELA V. IH50 E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgS ANTI-IgG APÓS INTERAÇÃO COM EA E EACl.

COMPOSIÇÃO DA MISTURA	IgS anti-IgG NOS SOBRENADANTES (μ g N Ac / ml)	
	Hemólise passiva indireta	Inibição da lise de EA (IH 50)
EA + IgS	1,024	0,540
EACl + IgS	1,088	0,550
E + IgS	3,3	0,550

O fato da IgS anti-IgG, absorvida por EACl, não apresentar nenhuma modificação na sua capacidade inibitória sugere que o Cl é liberado do complexo EACl pela ação da IgS anti-IgG. Com o fito de verificar esta hipótese, foram realizadas as seguintes experiências : as preparações de EACl contendo diferentes unidades de Cl fixadas foram submetidas à ação da IgS 2 μ g de NAc/ml por 30 minutos a 0°C. Os controles eram constituídos de EACl e tampão ou IgSa contendo 100 μ g de proteínas /ml. Após o período de incubação, determinou-se nos sobrenadantes a quantidade de Cl liberada, utilizando-se EAcb.

Os resultados esquematizados na Tabela VI mostram que a IgS anti-IgG foi capaz de liberar Cl do complexo EACl, ao passo que a IgS

normal foi incapaz de fazê-lo

TABELA VI. DOSAGEM DE Cl LIBERADA DO COMPLEXO EACl PELA AÇÃO DA IgS ANTI-IgG.

Cl H50 FIXADAS	Cl H50 LIBERADAS PELA AÇÃO		
	TAMPÃO	IgSa	IgS anti-IgG
8,3	0,5	0,5	2,2
13,5	0,6	0,6	3,0
15,5	0,8	0,8	3,8
31,0	1,0	1,0	4,5

Com a finalidade de verificar se esta liberação de Cl estaria diretamente relacionada com a concentração da IgS anti-IgG no meio, foram realizadas as experiências em que EA contendo 15 U de Cl, foi submetida à ação de diferentes concentrações de IgS anti-IgG.

Os resultados apresentados na Fig. 11 mostram que existe uma relação linear entre a concentração de IgS anti-IgG e U de Cl liberadas, quando se utilizavam concentrações de IgS anti-IgG inferiores a 0,5 µg de NAc/ml. Com concentrações de IgS anti-IgG superiores a 0,5 µg de NAc/ml, a quantidade de Cl liberada tendia a valores assintóticos.

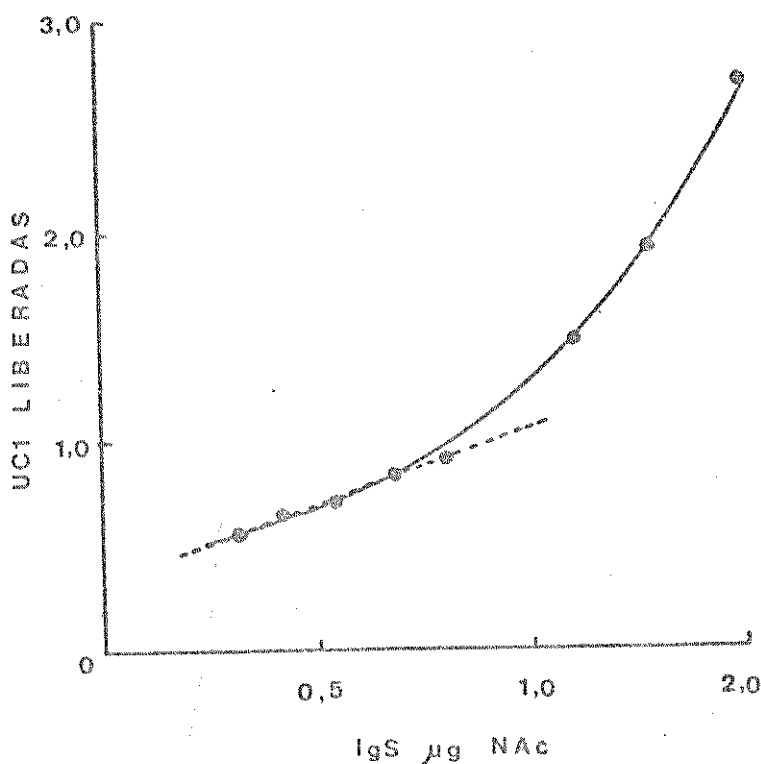


Fig. 11. Liberação de Cl do complexo EACl pela ação da IgS anti-IgG.

Vários autores (96,97,98) têm demonstrado a importância da força iônica no mecanismo de fixação de Cl, tendo sido demonstrado que esta fixação é máxima quando se emprega tampão de força iônica 0,065 μ .

De posse dos resultados anteriores que comprovam a liberação de Cl pela ação da IgS anti-IgG, foram realizadas as experiências com o sentido de verificar a influência da força iônica do sistema diluente nessa liberação de Cl, empregando-se tampão veronal 0,15 μ ou tampão veronal sacarose 0,065 μ .

O resultado apresentado na Fig. 12 mostra que não se observou uma influência apreciável da força iônica na liberação de Cl do complexo EACl pela ação da IgS anti-IgG.

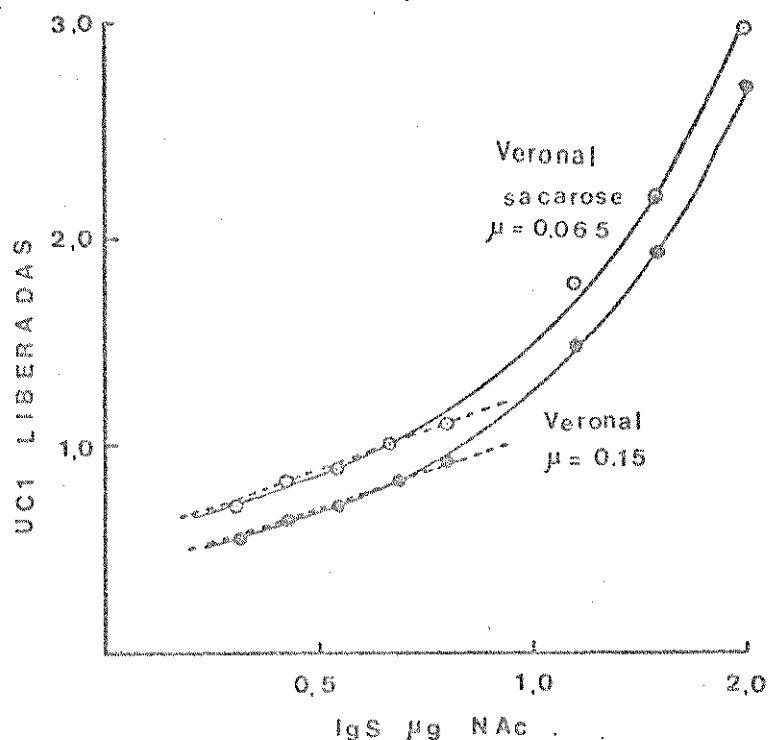


Fig. 12. Influência da força iônica na liberação de Cl do complexo EACl pela ação da IgS anti-IgG.

3. IMPORTÂNCIA DOS DETERMINANTES DAS REGIÕES Fab e Fc NO FENÔMENO DA INIBIÇÃO DA LISE.

Nas experiências anteriores pode-se verificar que a IgS anti-IgG inibe a lise de EGA e de EA, sendo essa inibição proporcional à concentração da IgS anti-IgG adicionada aos sistemas. Com o fito de verificar se essa inibição era devido à combinação do anticorpo com os determinantes antigênicos localizados na região Fab ou Fc da molécula de IgG de coelho, foram realizadas as seguintes experiências.

A IgS anti-IgG foi absorvida com o fragmento Fab ou Fc conjugada a hemácias (E-Fab, E-Fc) de modo a obter anticorpos específicos respectivamente para as regiões Fc e Fab da molécula de IgG de coelho. Estes anticorpos específicos apresentavam respectivamente 250 µg e 76 µg de NAc/ml. O segundo método utilizado para obter IgS específica para as regiões Fc e Fab foi a cromatografia de afinidade, utilizando-se respectivamente Sepharose-Fab e Sepharose-Fc. Os anticorpos obtidos continham respec

tivamente 22,4 e 26,4 μg de N Ac/ml. Os anticorpos absorvidos por qualquer dos 2 métodos, mostraram-se específicos para as regiões Fab e Fc, quando testados em experiências de hemaglutinação passiva, utilizando-se hemácias sensibilizadas com Fab, Fc e IgG de coelho. A atividade hemolítica da IgS, específica para as regiões Fab e Fc, foi testada utilizando-se EGA ou EA.

Os resultados obtidos com a IgS proveniente de um dos animais imunizados acham-se representados na Fig. 13 onde se pode verificar que houve inibição total quando se utilizou concentrações iguais ou superiores a 2,5 μg de NAc tanto da IgS específica para a região Fab como da IgS específica para região Fc ou IgS anti-IgG.

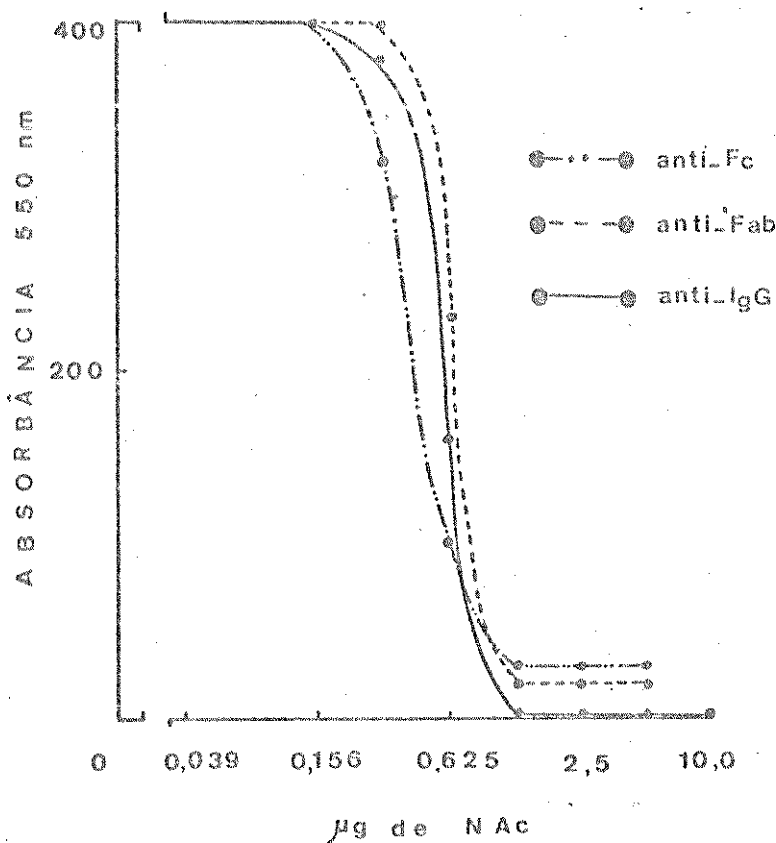


Fig. 13. Inibição da lise de EGA por anticorpos específicos para Fc e Fab e IgG de coelho.

Quando se utilizou a IgS proveniente de um segundo animal imunizado, pôde-se verificar que só se observava a inibição total quando se utilizavam a IgS específica para região Fc ou IgS anti-IgG. Quando se

utilizou IgS anti-Fab só se observou uma inibição parcial, empregando-se uma alta concentração (26,4 µg NAc/ml) desse reagente.

A fim de verificar se essas preparações reforçavam ou não a ação inibitória de determinada quantidade de anticorpo anti-Fc, foram realizadas experiências em que se procurou determinar o poder inibitório da mistura de quantidades fixa de anti-Fc e quantidades variáveis de anti-Fab (Tabela VII).

TABELA VII. AÇÃO DA MISTURA DE ANTICORPOS ANTI-Fab E ANTI-Fc SOBRE O GRAU DE LISE DE EA.

COMPOSIÇÃO DA MISTURA	QUANTIDADE DE IgS (µg NAc/ml)		GRAU DE LISE	GRAU DE INIBIÇÃO
			%	%
	anti-Fc	anti-Fab		
	0,28	0,0	63,0	37,0
	0,28	1,7	41,6	58,0
	0,28	6,6	19,4	80,0
	0,28	26,4	5,5	94,5
EA + IgS + C	0,0	1,7	97,2	2,8
	0,0	6,6	83,3	16,7
	0,0	26,4	19,4	80,6
CONTRÔLES				
EA + C	0,0	0,0	100,0	-
EA + IgS	0,28	0,0	0,0	-
EA + IgS	0,0	26,4	0,0	-
EA + T	0,0	0,0	0,0	-

Os resultados apresentados na Tabela VII mostram que houve um reforço do grau de inibição de anti-Fc quando se adicionava anti-Fab. Pôde-se verificar naquela tabela que quando se utilizava apenas 1,7 μg de NAc/ml de IgS anti-Fab ocorria uma inibição de lise de cerca de 3 % e que quando se utilizava somente anti-Fc (0,28 μg NAc/ml) o grau de inibição era cerca de 37 %, ao passo que a mistura dessas duas quantidades de IgS anti-Fab e anti-Fc produziu um grau de inibição de cerca de 58 %.

DISCUSSÃO

Vários autores demonstraram que os imunesoros obtidos em diferentes animais possuíam a capacidade de inibir total ou parcialmente a lise do sistema hemolítico (69,99,100). A compreensão deste fato só foi possível depois que BENACERRAF et al. (101) demonstraram através do fracionamento de imunesoros de cobaia, a existência de duas subclasses de imunoglobulinas que possuíam diferentes mobilidades eletroforéticas e foram denominadas de gama 1 e gama 2. A evidência de que estas imunoglobulinas possuem algumas propriedades biológicas diferentes foram obtidas por BLOCH et al. (102) que mostram que os anticorpos gama 2 possuem a capacidade de fixar o C de cobaia e promover a lise do sistema hemolítico, enquanto que os anticorpos gama 1 não possuem esta propriedade.

RANGEL, (75) no estudo da ação de soro de cobaia anti-globulinas sobre o sistema EGA, observou que a lise do sistema hemolítico era dependente da propriedade hemolítica dos anticorpos presentes nos imunesoros. Com os anticorpos isolados destes imunesoros, mostrou que a mediação da lise do sistema hemolítico era uma propriedade de imunoglobulinas da subclasse IgG2 e que o fenômeno inibitório era dependente da presença de imunoglobulinas da subclasse IgG1.

As nossas tentativas de obter soro de cobaia anti-IgG de coelho com alto teor de IgG1 foram infrutíferas, a despeito de termos utilizado os esquemas preconizados por vários autores (75,103,104). A causa do insucesso não foi esclarecida, estando possivelmente ligada a aspectos genéticos desses animais. No entanto, as experiências com soro de carneiro anti-IgG de coelho (Fig.2), mostraram que este soro foi capaz de inibir ou reforçar a lise do sistema EGA, dependendo da concentração de proteína de antígeno utilizada, sugerindo a presença de duas subclasses de imunoglobulinas. Em concordância com estes dados, o fracionamento da imunesoro de carneiro permitiu a obtenção de várias frações com propriedades diferentes. Uma deg

nas frações a FI, continha um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a gama 2 e era capaz de inibir a lise do sistema ECA (Figs. 4 e 5). As demais frações de FII a FIIIa apresentaram como uma mistura de componentes (Fig.4), sendo que o principal deles tinha mobilidade correspondente a gama 1. O estudo dessas frações sobre o sistema ECA (Fig. 6) mostrou que elas eram capazes de inibir ou reforçar a lise dependendo da concentração utilizada, o que indica uma heterogeneidade na propriedade das moléculas de anticorpo.

A existência de diferentes subclasses de imunoglobulinas no soro de carneiro, foi observada por SILVERSTEIN et al.(105). Estas subclasses foram designadas, de acordo com a sua mobilidade eletroforética, de IgF (fast) e IgS (slow) ou gama 1 e gama2 por AALUND et al. (106). A ação biológica destas imunoglobulinas, foi estudada por ESTEVES et al.(107), que verificaram que a IgS não fixa o C e que a IgF possuía esta capacidade.

As experiências com IgS anti-IgG purificada mostraram que esta imunoglobulina é capaz de inibir a lise, tanto do sistema ECA como do EA, o que mostra que o fenômeno inibitório independe da especificidade da IgG de coelho que se acha combinada, na superfície da hemácia, seja com determinantes próprios desta superfície ou com determinantes a ela artificialmente conjugados (Tabela I). Por outro lado este fato sugere que a IgS anti-IgG, uma vez combinada com a IgG impede a fixação de C. Esta hipótese foi confirmada pelas experiências em que o sistema EA, previamente incubado com a IgS anti-IgG, foi mantido na presença de C por 18 horas a 0°C, condições consideradas como ótimas para a fixação de C (108). Nenhuma quantidade de C foi absorvida nestas condições (Tabela II^a, indicando desse modo que a fixação de C pela EA, foi bloqueada pela IgS anti-IgG e confirmando as observações de ESTEVES et al.(107) de que a IgS é incapaz de fixar o C.

Utilizando-se a IgS anti-IgG purificada, foi possível demonstrar a existência de uma relação linear entre o logaritmo da concentração de IgS anti-IgG e o logaritmo da função $(y/1-y)$, sugerindo que a IgS anti-IgG e o C competem entre si pelos mesmos sítios ou por determinan-

tes muito próximos (Fig.7). Contudo, esse dado não exclui a possibilidade da ocorrência de alterações alostéricas na molécula de IgG de coelho.

As experiências realizadas no sentido de verificar se a IgS anti-IgG era capaz de impedir a lise do complexo EACl (Tabela III), sugerem que a inibição da imuno hemólise se deve ao bloqueio da fixação de Cl, porquanto EACl tratadas com IgS anti-IgG lisam quando em presença de RI. Esta interpretação contudo necessita o respaldo de dados quantitativos sobre a interação Cl e EA, devido à complexidade das preparações de Cl. Muito embora os reagentes de complemento utilizado no presente trabalho apresentassem como funcionalmente puros, não se pode descartar a possibilidade da presença de alguns componentes do C em níveis não detectáveis, através do método de ensaio utilizado. Por outro lado essas preparações de Cl devem ser constituídas por misturas de moléculas de Cl na forma nativa e de moléculas de Cl na forma ativada, pois vários autores (11, 26, 30) mencionam a ocorrência de ativação espontânea de Cl durante o processo de purificação parcial.

O estudo quantitativo da quantidade de Cl necessária para a saturação dos sítios disponíveis, indicou que o sistema está provavelmente saturado de Cl quando são adicionadas 15 ou mais unidades de Cl ao sistema. De fato houve uma relação linear entre a quantidade de Cl adicionada e de Cl fixada, quando se adicionava quantidades inferiores a 15 unidades. Quando se adicionava quantidades superiores a 15 U ao sistema, a quantidade de Cl fixada tendia a valores assintóticos (Fig.10). LIN e FLETCHER (38) obtiveram resultados similares no estudo cinético da interação de Clq com agregado de IgG, e a análise dos dados através do modelo de LINEWEAVER e BURK e do modelo de SCATCHARD, da interação não foi linear. Os autores concluíram que na sua fase linear cada molécula de Clq se liga a um sítio da molécula de IgG agregada, e o desvio da linha reta sugere fortemente a interação sítio-sítio com cooperatividade positiva (109). Atribuem ainda ao desvio da linearidade a possibilidade da interação de mais de uma valência de Clq no mesmo sítio da molécula de IgG, baseando-se na observação de

HUGHES-JONES (39) de que o número de valência de Clq envolvido na interação está diretamente relacionado à constante de afinidade funcional na interação de Clq com a IgG.

As observações de KIMURA et al. (74) de que a lise do sistema hemolítico na presença de soro de carneiro ou de cão anti-IgG de coelho, só ocorre quando sistema se encontra no estágio EACl_{4,2}, levantaram a possibilidade de que nossas preparações denominadas EACl estivessem no estágio EACl_{4,2}. Contudo o estudo comparativo da ação inibitória de uma quantidade fixa de IgS anti-IgG sobre o sistema EACl contendo diferentes unidades de Cl fixadas (Cl ou R4) indicou que só ocorre a inibição da lise, quando o complexo não está saturado de Cl (Tabela IV). De fato só ocorreu a inibição parcial da lise, quando a quantidade de Cl adicionada ao sistema era inferior a 15 U e se situava portanto na região da existência de relações lineares entre a quantidade de Cl adicionadas e fixadas. Por outro lado quando o Cl era proveniente de R4, ocorreu uma ligeira inibição da lise mesmo quando o complexo EA estava saturado de Cl. Esta inibição talvez possa ser explicada pela ação residual da hidrazina presente na mistura de reação sobre o C4 do reagente R1, ou ainda atuando sobre o C3 (110).

Com base nesses dados pode-se explicar a aparente discordância entre os nossos dados e os de KIMURA et al. (74), que concluíram que a inibição da lise se passa ao nível de EACl₄. Aqueles autores utilizaram sistemas contendo de 2 a 3 sítios ativos por células, enquanto que nas nossas preparações provavelmente todos os sítios estavam ocupados por Cl.

As tentativas de utilização de EA saturado de Cl para obtenção de anticorpos específicos para o sítio de fixação de Cl foram infrutíferas. Não houve diferença significativa em relação à inibição da lise quando a IgS anti-IgG absorvida por EA foi comparada com IgS anti-IgG absorvida com EACl, sugerindo a ocorrência de liberação de Cl durante o processo de absorção (Tabela V). Esta hipótese foi confirmada nas experiên-

cias subseqüentes. A quantificação do fenômeno mostrou que a quantidade de Cl liberada é função da quantidade de Cl fixada e da quantidade de IgS anti-IgG utilizada no sistema (Tabela VI).

Utilizando o sistema EA saturado com Cl, foi possível demonstrar que as relações entre a quantidade de Cl liberada e a quantidade de IgS anti-IgG no sistema são descritas por uma curva (Fig.11), onde podem ser identificadas duas regiões: uma primeira região, quando são utilizadas quantidades inferiores a 0,5 µg de NAc/ml, onde existe uma relação linear entre a quantidade de IgS anti-IgG e U liberada de Cl, e a segunda região onde aparentemente existe uma relação exponencial entre a quantidade de IgS anti-IgG e U de Cl liberadas.

Vários autores salientam a importância da força iônica na interação EA-Cl, pelas evidências de que o C de coaba se liga otimamente ao complexo EA na força iônica 0,065 µ (64, 85,110) e a sua dissociação com o aumento da força iônica 0,15 µ (97,98). Segundo THOMPSON e HOFFMAN (62) o aumento da força iônica afeta a ligação de Cl, e como consequência, o decréscimo no número de sítio de fixação de Cl. Contudo HUGHES-JONES (42), no estudo da ligação de Clq a agregado de IgG, observou um aumento na afinidade de ligação com o envolvimento de maior número de valências de Clq.

Nos estudos realizados por nós, a influência da força iônica na liberação de Cl sob a ação da IgS anti-IgG, não mostrou diferenças significativas entre os dados obtidos com força iônica 0,065 µ e os obtidos com 0,15 µ, sugerindo que a afinidade da IgS anti-IgG para a IgG é maior do que a afinidade de Cl para o complexo EA (Fig.12). Os dados da literatura apoiam esta interpretação pelo fato de moléculas de anticorpos de alta afinidade apresentarem uma constante de associação de 10^{-10} M a 10^{-12} M (111,112,113) enquanto que a constante de associação da interação Clq-IgG é na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} M (41,43).

A investigação do poder inibitório da IgS específica para determinantes da região Fc mostrou que esses anticorpos são altamente

eficientes no fenômeno da inibição da lise. Esses dados são concordantes com as informações que indicam que o sítio de fixação de C se situa na região Fc (39,44,51).

No que diz respeito a poder inibitório da IgS anti-Fab os dados obtidos mostram que existe uma ampla variação deste poder inibitório, dependendo da proveniência dos anticorpos. Com a IgS anti-Fab obtida de um dos animais observou-se que, utilizando doses cerca de duas vezes maiores do que a IgS anti-Fc, as inibições eram em níveis comparáveis. No entanto, com a IgS anti-Fab obtida de um segundo animal, só se pôde observar o mesmo grau de inibição quando se utilizavam doses cerca de 30 vezes maiores. Este fato sugere que apenas alguns determinantes antigênicos da região Fab acham-se envolvidos no fenômeno da inibição da lise. Essa interpretação encontra apoio nas observações que indicam que a parte proximal da região Fab contribui para a fixação de C1 (51,55). Reforça ainda esta interpretação o fato de que a IgS anti-Fab potencializou o poder inibitório da IgS anti-Fc. Os dados mostram que, utilizando-se cerca de 1,7 μ g de NAc/ml de, IgS anti-Fab, praticamente não se observou a inibição da lise (3 %). Contudo quando se adicionou esta mesma quantidade a 0,28 μ g de NAc/ml de IgS anti-Fc que produzia 37 % de inibição, observou-se um grau de inibição de 58 %, bem mais extensa, portanto, do que o esperado (cerca de 40) %, admitindo-se apenas o efeito somatório. Esta potencialização do efeito inibitório sugere fortemente a existência de uma cooperação entre os determinantes da região Fab e Fc para a fixação de C1.

O conjunto de dados apresentados sugere que o fenômeno da inibição da imuno hemólise se deve, primariamente, a impedimento estérico de acesso de C1 a determinantes na região Fc da molécula da IgG de coelho e secundariamente por alterações alostéricas da molécula de IgG, como consequência da combinação da molécula de IgS, facilitando a liberação de moléculas de C1 já fixadas. Além desse mecanismo, a combinação da molécula da IgS com alguns determinantes da região Fab, muito provavelmente dificulta ou

impede estericamente a interação dos determinantes de Fab e Fc, envolvidos na fixação de Cl . Por razão dessa complexidade de ações, o fenômeno da inibição da imuno hemólise não representa um modelo ideal para o estudo do mecanismo de interação Cl-IgG.

RESUMO E CONCLUSÕES

As investigações foram levadas a efeito com o sentido de se verificar se seria possível utilizar o fenômeno da inibição da imuno hemólise por soro anti-IgG, como instrumento para o estudo de fixação de Cl aos imunecomplexos.

A ação de imunesoros de carneiro anti-IgG de coelho ou de imunoglobulinas isoladas sobre a lise específica de hemácias sensibilizadas com a fração IgG de soro de coelho anti-hemácia de carneiro (EA) ou sensibilizadas com o complexo SAB.antiSAB (EGA) foi investigada. Os resultados obtidos mostram que:

Os soros anti-IgG eram capazes de reforçar ou inibir a lise desses sistemas hemolíticos dependendo da dose utilizada, ao passo que uma imunoglobulina isolada desse soro por cromatografia em DE-celulose e caracterizada por imunoeletroforese como IgS, apresentava apenas a capacidade de inibir a lise desses sistemas. As relações encontradas entre a quantidade de IgS anti-IgG (x) e o grau de lise (y) podem ser expressas pela equação de von KROGH, de modo que se pode determinar a dose inibitória 50 % (IH_{50}). O valor de IH_{50} guarda relação direta com a quantidade de IgG de coelho presente na superfície da hemácia, mas independe da especificidade de IgG, indicando assim que o fenômeno da inibição da lise é uma consequência da interação específica entre a IgG e a IgS anti-IgG.

A inibição da lise específica se deve a um bloqueio de fixação de Cl, porquanto o complexo IgS.EA não fixa o complemento e ocorre a lise de EACl em presença de IgS anti-IgG desde que este complexo tenha sido preparado com quantidades ótimas de Cl. Quando se utilizam complexos com quantidades sub-ótimas de Cl ocorre uma inibição parcial da lise.

Da interação da IgS anti-IgG com EACl resulta a liberação de Cl, não se tendo encontrado diferença significativa nas IgS anti-IgG absorvidas por EACl ou EA. A titulação de Cl nos sobrenadantes das reações EA, EACl e IgS anti-IgG mostrou que a quantidade de Cl liberada é uma função tanto da quantidade de Cl previamente fixada, como da concentração de IgS anti-IgG utilizada. Esta liberação de Cl não foi influenciada significativamente pela força iônica do tampão.

Existe uma relação linear entre a quantidade de Cl liberada e a quantidade de IgS anti-IgG, quando estas são empregadas em concentrações inferiores a 0,5 μ g de NAc/ml frente a EACl, preparadas com quantidades ótimas de Cl. Estas relações são do tipo exponencial, quando se utilizam a IgS anti-IgG nas concentrações superiores a 0,5 μ g de NAc/ml, sugerindo assim uma liberação do tipo competitivo nas concentrações iguais ou inferiores a 0,5 μ g de NAc/ml e liberação do tipo cooperativo nas concentrações superiores a 0,5 μ g de NAc/ml.

A IgS anti-Fc é mais eficiente no fenômeno da inibição da lise do que a IgS anti-Fab. Para se obter inibição em níveis comparáveis ao dos anticorpos anti-Fc, são necessários doses, cerca de 2 a 30 vezes maiores de anticorpo anti-Fab, indicando que apenas alguns dos determinantes da região Fab acham-se envolvidos no fenômeno da inibição da lise. Contudo estes anticorpos anti-Fab potencializam o poder inibitório da IgS anti-Fc, sugerindo a existência de uma cooperação entre os determinantes da região Fab e da região Fc para fixação de Cl.

O conjunto de dados mostra que o fenômeno da inibição da imuno hemólise é por demais complexo para ser utilizado como instrumento para o estudo de fixação de Cl aos imune-complexos. Embora o mecanismo de in

bção resulte primariamente de um impedimento estérico de acesso de Cl a determinantes da região Fc da molécula de IgG, ocorrem alterações alostéricas, como consequência da combinação da IgS com os determinantes das regiões Fab e Fc que levam a liberação de Cl já fixadas. Além desse mecanismo, a interação da IgS com alguns determinantes da região Fab, próximo ao sítio de fixação de Cl, provavelmente induz alterações conformacionais ou impedem estericamente os determinantes da região Fc envolvidos na interação de Cl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MULLER-EBERHARD, H. J. (1975) Complement. *Ann. Rev. Bioch.*, 44:697.
- 2 - PILLEMER, L., BLUM, L., LEPOW, I.H., ROSS, O. A., TOOD, E. W. and WARDLAW, A. C. (1954) The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120 : 279.
- 3 - GEWURZ, H., SHIN, H. S. and MERGENHAGEN, S.E. (1968) Interaction of the complement system with endotoxic lipopolysacharides consumption of each of six terminal components. *J. Exp. Med.*, 128: 1049.
- 4 - SANDBERG, A. L. and OSLER, A. G. (1971) Dual pathways of complement interaction with guinea pig immunoglobulins. *J. Immunol.*, 107:1268.
- 5 - BORSOS, T. and RAPP, H. J. (1965) Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science*, 105 : 55.
- 6 - HUMPHREY, J. H. and DOORMASHKIN, R. R. (1965) Electron microscope studies of immune cell lysis. In Wolstenholme, G. C., and Knight, J., eds. *Ciba Foundation Symposium on Complement*. London, J. and A. Churchill Ltd., p. 175.
- 7 - COHEN, S. (1968) The requirement for the association of two adjacent rabbit γ G antibody molecule in the fixation of complement by immune complexes. *J. Immunol.*, 100 : 407.
- 8 - HYSLOP, N.E., DOORMASHKIN, R. R., GREEN, N.M. and PORTER, R.R. (1970) The fixation of complement and activated first component C1 of complement by complexes formed between antibody and divalent hapten.

J. Exp. Med., 131:783.

- 9 - GIVOL, D., PECHT, I., HOCHMANN, J., SCHLESSINGER, J. and STEINBERG, I. Z. (1974) Conformational change in the Fab and Fc of the antibody as a consequence of antigen binding. Proc. of the second International congress on Immunology. Vol. I Ed. by Brent and Holbrow North Holland Pub. Amsterdam . p.39.
- 10 - BROWN, J. C. and KOSHLAND, M. E. (1975) Activation of antibody Fc function by antigen induced conformational change. Proc. natl. Acad. Sci. , 72:5111.
- 11 - LEPOW, I.H., NAFF, G. B., TOOD, E. W. and HINZ, C. H. (1963) Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. J. Exp. Med., 117:983.
- 12 - NAFF, G. B., PENSKEY, J. and LEPOW, H.I. (1964) The macromolecular nature of the first component of human complement. J. Exp. Med. , 119:593.
- 13 - CALCOTT, M. A. and MULLER-EBERHARD, H. J. (1972) Clq protein of human complement. Biochemistry, 11:3443.
- 14 - YONEMASU, K. and STROUD, R. M. (1972) Structural studies on human Clq : noncovalent and covalent subunit. Biochemistry, 9 : 545.
- 15 - LOWE, D. M. and REID, K. B. M. (1974) Studies on the structure and activity of rabbit Clq (a subcomponent of the first component of the first component of complement). Biochem. J., 134:265.
- 16 - REID, K. B. M., LOWE, D. M. and PORTER, R. R. (1972) Isolation and

- characterization of Clq, a subcomponent of the first component of complement, from human and rabbit sera. *Biochem. J.*, 130:749.
- 17 - REID, K. B. M. (1976) Isolation by partial pepsin digestion, of the three collagen-like regions present in subcomponent Clq of the first component of human complement. *Biochem. J.*, 155:5.
 - 18 - SHELTON, E., YONEMASU, K. and STROUD, R. M. (1972) Ultrastructure of the human complement, Clq. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69:65.
 - 19 - KNOBEL, H. R., VILLIGER, W. and ISLIKER, H. (1975) Chemical analysis and electron microscopy studies of human Clq prepared by different methods. *Eur. J. Immunol.*, 5 :78.
 - 20 - POLLEY, M. J. (1971) Ultrastructural studies of Clq and the interaction between membranes and complement protein. *J. Immunol.*, 107:322.
 - 21 - BRODOSKY-DOYLE, B., LEONARD, K.R. and REID, K. B. M. (1976) Circular dichroism and electron-microscopy studies of human subcomponent Clq before and after limited proteolysis by pepsin. *Biochem. J.*, 159 : 279.
 - 22 - VALET, G. and COOPER, N. R. (1971) Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1r subunit of the first complement component. *J. Immunol.*, 112:1667.
 - 23 - ZICCARDI, R. J. and COOPER, N. R. (1976) Physicochemical and functional characterization of the C1r subunit of the first complement component. *J. Immunol.* 166:496.
 - 24 - ZICCARDI, R. J. and COOPER, N. R. (1976) Activation of C1r by pro-

proteolytic cleavage . J Immunol. 166:504

- 25 - ASSIMEN, S. N., CHAPIUS, R. M and ISLIKER, H. (1978) Studies on the precursor form of the first component of complement. II Proteolytic fragmentation of C1r. Immunochemistry 15:37.
- 26- GIGLI, I., PORTER, R. R. and SIM, R.B. (1976) The unactivated form of the first component of human complement C1. Biochem. J. 157:541.
- 27 - COOPER, N.R. and ZICCARDI, R.J. (1977) Reconstitution of C1 in native proenzyme form and its use in a quantitative C1 activation test. J. Immunol. 199:1664.
- 28 - ZICCARDI, R. J. and COOPER, N. R. (1977) The subunit composition and sedimentation properties of human C1. J. Immunol. 118:2047.
- 29 - VALET, G. and COOPER, N. R. (1974) Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1s subunit of the first complement component. J. Immunol. 112 :339.
- 30 - SIM, R. B. and PORTER, R. R. (1976) Isolation and comparison of the proenzyme and activated forms of the human serum complement subcomponents C1r and C1s. Biochem. Soc. Trans. 4:127.
- 31 -BARKAS, T.,SCOTT, G.K. and FOTHERGILL, J.E. (1973) Purification and active-site studies on human serum complement subcomponent C1s. Biochem. Soc. Trans. 1:1219.
- 32 - SAKAI, K. and STROUD, R. M. (1974) The activation of C1s with purified C1r. Immunochemistry 11:191.

- 33 - MÜLLER-EBERHARD, H.J. and KUNKEL, H.G. (1961) Isolation of a ther -
molabile serum protein wich precipitates γ globulin aggregates and
participates in immune hemolysis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106:
291.
- 34 - SCHUMAKER, V. N., CALCOTT, M. A., SPIEGELBERG, M.A. and MÜLLER-EBERHARD,
H.J. (1976) Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of dif-
ferent subclasses to the Clq subunit of the first component of com-
plement. Biochemistry , 15:5175.
- 35 - KNOBELL, H. R., HEUSSER ,C., RODRICK, M.L. and ISLIKER, H. (1974)
Enzymatic digestion of the first component of human complement (Clq)
J. Immunol. 112:2094.
- 36 - REID, K. B. M., SIM, R. B. and FAIERS, A. P. (1977) Inhibition of
the reconstitution of the haemolytic activity of the first component
of human complement by a pepsin derived fragment of subcomponent Clq.
Biochem. J. 161:239.
- 37 - ASSIMEH, S. N. and PAINTER, R. H. (1975) The macromolecular structu
re of the first component of complement. J. Immunol. 115:488.
- 38 - GOERS, J. W., ZICCARDI, R., SCHUMAKER, V. N. and GLOSVSKY, M. M. (1977)
The mechanism of activation of the first component of complement by
a univalent hapten-IgG complex. J. Immunol. 118:2181.
- 39 - AUGENER, W., GREY, H. M., COOPER, N. R. and MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971)
The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl.
Immunochemistry , 8 :1011.
- 40 - SLEDGE, C. R. and BING, D. R. (1973) Binding properties of human

- complement protein Clq. J. Biol. Chemistry, 248:2818.
- 41 - LIN, T. Y. and FLETCHER, D.S. (1978) Interaction of human Clq with insoluble immunoglobulin aggregates. Immunochemistry, 15:107.
 - 42 - HUGHES-JONES, N. C. (1977) Functional affinity constants of the reaction between ^{125}I labelled Clq and Clq binders and their use in the measurement of plasma Cl concentrations. Immunology 32:191.
 - 43 - HUGHES-JONES, N. C. and GARDNER, B. (1978) The reaction between the complement subcomponent Clq, IgG complexes and polyionic molecule. Immunology 34:459.
 - 44 - AMIRAIAM, K. and LEIKHIM, E. J. (1961) Interaction of fragment III of rabbit gamma globulin and guinea pig complement. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108:454.
 - 45 - TARANTA, A. and FRANKLIN, E. (1961) Complement fixation by antibody. Science 134:1982.
 - 46 - ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. and SUGAHARA, T. (1962) Biological activities of soluble antigen-antibody complexes. VIII Role of an antibody fragment in the induction of biological activities. J. Immunol. 88:690.
 - 47 - KEHOE, J. M. and FOUGEREAU, M. (1969) Immunoglobulin peptide with complement fixing activity. Nature (lond.) 244:1212.
 - 48 - UTSUMI, S. (1969) Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically activities Fc fragments. Biochem. J. 112:343.

- 49 - ALLAN, R. and ISLIKER, H. (1974) Studies on the complement-binding site of rabbit immunoglobulin G. II The reaction of rabbit IgG and its fragment with Clq. *Immunochemistry* 11 :243.
- 50 - COLOMB, M. and PORTER, R. R. (1975) Characterization of a plasmin digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that binds antigen and complement. *Biochem. J.* 145:177.
- 51 - OVARY, Z., SALUK, P.H., QUIJADA, L. and LAMM, M. (1976) Biologic activities of rabbit immunoglobulin G in relation to domains of the Fc region. *J. Immunol.* 116:1265.
- 52 - ELLERSON, J. R., YASMEEN, D., PAINTER, R. H. and DORRINGTON, K. J. (1972) A fragment corresponding to the CH2 region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity. *FEBS Lett.* 24:318.
- 53 KEHOE, J. M., BORGOIS, A., CAPRA, J. D. and FOUGEREAU, M. (1974) Amino acid sequence of murine immunoglobulin fragment that possesses complement fixing activity. *Biochemistry* 13:2499.
- 54 - YASMEEN, O., ELLERSON, J.R., DORRINGTON, K. J. and PAINTER, R.H. (1976) The structure and functions of immunoglobulin domains. III The distribution and some effector functions among the C_γ2 and C_γ3 homology regions of human immunoglobulin G. *J. Immunol.* 116:518.
- 55 - REISS, A. M. and PLESCIA, O. J. (1963) Fixation of complement fragments to antibodies. *Science* 141:812.
- 56 - ISENMAN, D.E., DORRINGTON, K. J. and PAINTER, R. H. (1975) 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.

- 57 - BUBB, M. O. and CONRADIE, J. D. (1978) Studies on the structural and biological functions of the C μ 3 and C μ 4 domains of IgM. Immunology 34 :449.
- 58 - ALLAN, R. and ISLIKER, H. (1974) Studies on the complement binding site of rabbit immunoglobulin G. I Modification of tryptophan residues and their role in anticomplementary action of rabbit IgG. Immunochemistry 11:175.
- 59 - JOHNSON, B. J. and THAMES, K. E. (1976) Investigation of the complement fixing sites of immunoglobulins. J. Immunol. 117:1491.
- 60 - ISENMAN, D. E., ELLERSON, J. R., PAINTER, R. H. and DORRINGTON, K. J. (1977) Correlation between exposure of aromatic chromophores at the surface of the Fc domains of immunoglobulin G and their ability to bind complement. Biochemistry 16:233.
- 61 - FUST, G., MEDGYESI, G. A., RAJNAVOLGYI, E. CSÉCSI-NAGY, M., CZIKORA, K. GERGELY, J. (1978) Possible mechanisms of the first step of the classical complement activation pathway: binding and activation of C1. Immunology 35:873.
- 62 - THOMPSON, J. J. and HOFFMANN, L. G. (1974) Cooperative binding of a complement component to antigen-antibody complexes. II Effect of variations in temperature and ionic strength. Immunochemistry 11: 537.
- 63 - JATON, J. C., HEUSSER, H., REISEN, W. F., SCHELESSINGER, J. and GIVOL, D. (1976) The binding of complement by complexes formed between a

rabbit antibody and oligosaccharides of increasing size. J. Immunol. 116:1363.

64 - LOOS, M., BORSOS, T. and RAPP, H. J. (1972) Activation of the first component of complement. Evidence for an internal activation step. J. Immunol. 108:683.

65 - TAKAHASHI, K., NAGASAWA, S. and KOYAMA, J. (1975) A gross structure of an activated form of a subunit of the first component of human complement C1r. FEBS Lett. 55:156.

66 - KASSEL, B. and KAY, J. (1973) Zymogens of proteolytic enzymes. These enzyme precursors, formerly thought to be inert substance, have inherent proteolytic activity. Science, 180 : 1022.

67 - PRESS, E. M. (1975) Fixation of the first complement by immune complexes : Effect of reduction and fragmentation of antibody. Biochem. J. 149 : 285.

68 - JATON, J. C., HUSER, H., BLATT, Y. and PECHT, I. (1975) Circular dichroism and fluorescence studies of homogeneous antibodies to type III pneumococcal polysaccharides. Biochemistry 14 : 5308.

69 - LA PORTE, H., DE LOOZE, L. H. et ROULIER, P. (1950) Immuneserums antihémolytiques. An. Inst. Pasteur 79 : 381.

70 - ROMEYN, J. A. and ONYSCO, E. (1964) The effects of anti-antibody on immune haemolysis. Immunology 7 : 217.

71 - STERZL, J. and RINA, I. (1965) A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7 S antibody. Nature

(Lond) 208: 858.

- 72 - DRESSER, D. W. and WORTHIS, H. H. (1965) A localized haemolysis in gel method for detection of cells producing γ S antibody. Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low hemolytic efficiency. Nature (Lond.) 208:859.
- 73 - HUMPHREY, J. H. (1967) Hemolytic efficiency of rabbit IgG anti-Forsman antibody and its augmentation by anti-rabbit IgG. Nature (Lond.) 216: 1295.
- 74 - KIMURA, I., EULITZ, H. and THIERFELDER, S. (1970) Effect of anti-rabbit IgG antisera on immune haemolysis. Immunology 19:689.
- 75 - RANGEL, H. (1968) Studies on passive haemolysis mediated by antiserum globulin antibodies. Immunology 14 : 197.
- 76 - KABAT, E. A. and MAYER, M. (1961) Experimental Immunochemistry. Thomas , Springfield, Illinois 2nd ed.
- 77 - PORTER, R. R. (1959) The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 73 : 119.
- 78 - MAYER, M. M. (1961) Complement and complement fixation. " In Experimental Immunochemistry " Ed. by E.A. Kabat and M. M. Mayer 2nd edn, p. 133. Thomas, Springfield, Illinois.
- 79 - RANGEL , H. (1968) Study of the cross-reaction between rabbit anti-bovine serum albumin antibodies and equine serum albumin. Immunology 8 : 88.

- 80 - ROE, A. (1967) Preparation of aromatic fluorine compounds from diazonium fluoroborates. The Schiemann reaction, in "Organic reactions" R. Adams, 5 p. 193, John Wiley & Sons, Inc., London.
- 81 - MAYER, M., OSLER, A., BIER, O., and HEIDELBERGER, M. (1946) The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J. Exp. Med. 48:538.
- 82 - STEIN, G. J. and VAN NGU, D. (1950) A quantitative complement fixation test, titration of litic sera unit of 50 % hemolysis. J. Immunol. 65:17.
- 83 - RAPP, H. J. and BORSOS, T. (1963) Effect of low ionic strenght on immune hemolysis. J. Immunol., 91: 826.
- 84 - GOMORI, G. (1965) Preparation of buffers for use in enzyme studies, in: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1:138.
- 85 - SOBER, H. A., GUTER, F., WICKOF, M.M. and PETERSON, E. A. (1956) Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange adsorbents. J. Chem. Soc., 78:751.
- 86 - CUATRECASAS, P. and ANFISEN, A. G. (1971) Affinity chromatography. Ann. Rev. Biochem. 40:259.
- 87 - HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F. E. (1935) The precipitin reaction between type III pneumococcus polysacharides and homologus antibody. II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. J. Exp. Med. 61:559.

- 88 - OUCHTERLONY, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5 : 78.
- 89 - GRABAR, P. and BURTIN, P. (1964) *Immunoelectroforetic analysis*. Amsterdam London, N. Y. Elsevier Publ. Co.
- 90 - DITTENBRAND, M. (1948) Application of the Weischebaum biuret reaction to the determination of protein. *Am. J. Chem. Path.* 18:439.
- 91 - LOWRY, O. H., ROSENBERG, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- 92 - MAYER, M., OSLER, A., BIER, O. and HEIDELBERGER, M. (1948) Quantitative studies of complement fixation. I Method. *J. Immunol.* 59:195.
- 93 - WIRTZ, G. H. (1965) Influence of aliphatic amines on the interaction of human C1 with EAC4. *Immunochemistry* 2 : 95.
- 94 - RANGEL, H., SERAFIM, M. B. and SAKURADA, J.K. (1978) The use of 4,4'-biphenyl bisdiazonium fluoroborate as a coupling agent for passive haemolysis tests. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 129 C:401.
- 95 - BORDUAS, A. G. et GRABAR, P. (1935) L' Hemagglutination passive dans recherche des anticorps anti-proteiques. *Ann. Inst. Pasteur* 84 : 903.
- 96 - BORSOS, T. and RAPP, H. J. (1965) Hemolysin titration based on fixation of the activated first component of complement evidence that one molecule of hemolysin suffices to sensitize an erythrocyte. *J. Immunol.* 95 : 559.

- 97 - COLTEN, H. R., BORRISO, T. and RAPP, H.J. (1968) Reversible loss of activity of the first component of complement (C1) as a function of ionic strength. J. Immunol. 100:79.
- 98 - LINSOTT, W. D. (1969) The effect of ionic strength, temperature, and antibody class and avidity on fixation and transfer of the first component of complement. J. Immunol. 102 :993.
- 99 - BORDET, J. (1904) Les propriétés des antisensibilisatrices et les théories chimiques de l'immunité. Ann. Inst. Pasteur 18:593.
- 100 - ALTMAN, K. (1912) Ueber immunisierung mit ambozeptorbeladenen. Blutkörperchen Z. Immun. Forsch. 13 : 219.
- 101 - BENACERRAF, F. B., OVARY, Z., BLOCH, K. J. and FRANKLIN, E.C. (1963) Properties of guinea pig 7 S antibodies. I Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7 S antibodies. J. Exp. Med. 117:937.
- 102 - BLOCH, K., KOURIELSKY, P. M., OVARY, Z. and BENACERRAF, B. (1963) Properties of guinea pig 7 S antibodies. III Identification of antibodies involved in complement fixation and hemolysis. J. Exp. med. 117 :965.
- 103 - BINAGHI, R. (1966) Production of 7 S immunoglobulin in immunized guinea pig. J. Immunol. 97 : 157.
- 104 - OLIVEIRA, B., OSLER, A., SIRAGANIAN, R. P. and SANDBERG, A. (1970) The biologic activities of guinea pig antibodies. I separation of gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins and their participation in allergic reaction of the immediate type. J. Immunol. 104 :320.

- 105 - SILVERSTEIN, A. M., THOEBECK, G. J., KRANER, K. I. and LUKES, R. J.
(1963) Fetal response to antigenic stimulus. III γ globulin production in normal and stimulated fetal lambs. Biochem. Biophys. Acta. 147: 59.
- 106 - AALUND, O., OSEBOLD, J. W. and MURPHY, F. A. (1964) Isolation and characterization of ovine gamma globulins. Arch. Bioch. Biophys. 109: 142.
- 107 - ESTEVES, M. B., SANT'ANNA, O. A., ANNES, V.S. and BINAGHI, R. (1974)
Characterization and properties of an anaphylatic γ S antibody in sheep. J. Immunol. 112 : 439.
- 108 - POROS, T., COLTEN, H. R., SPALTER, J. S., ROSENTINE, N. and RAPP, H. J. (1968) The Cla fixation and transfer test example of its applicability of detection and enumeration of antigen and antibodies at cell surfaces. J. Immunol. 101 : 392.
- 109 - KOSHLAND, D. E. Jr. (1970) " The molecular basis for enzyme regulation " p. 341. in P. D. Boyer (ed.). The enzyme 3rd ed. vol. 1 Academic. N. York.
- 110 - MULLER-EBERHARD, H. J., NIELSEN, V., and ARONSON, T. (1960). Isolation and characterization of two β 1 glycoproteins of human serum. J. Exp. Med. 111 : 201.
- 111 - KARUSH, F. and EISEN, H. N. (1962) A theory of delayed hypersensitivity. Science 136 : 1032.
- 112 - BERSON, S. A. and YALOW, R. S. (1959) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. J. Clin.

Invest. 38 : 1996.

- 113 - EISEN, H. N. and SISKIND, G. W. (1964) Variation in affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry 3 : 996.