

Humberto A. Rangel

CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO IMUNOQUÍMICO DAS REAÇÕES CRUZADAS ENTRE AS SÔRO-ALBUMINAS
HUMANA, BOVINA E EQUINA

Tese de doutoramento apresentada
ao Instituto de Biologia da Uni-
versidade de Campinas

Campinas, 1.968

Aos meus pais
A minha espôsa
Aos meus filhos

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
Biblioteca Central

PREFÁCIO

Nenhuma obra, por mais modesta, representa os esforços isolados de um autor. Adiciona-se sempre a êste a somatoria algébrica do concurso de colaboradores eventuais ou permanentes, das críticas justas ou injustificadas, das disponibilidades materiais, do apôio intelectual do ambiente de trabalho, das facilidades ou dificuldades que o contexto social aduz à investigação científica.

Somos gratos à êste concurso sem o qual não existiria êste trabalho e desculpamo-nos por não poder discriminar individualmente todos os elementos que o integram. O número desses elementos, por demais extenso, se perde nas imprecisões do julgamento incapaz de decidir se o mestre escola - que nos ensinou as primeiras letras - e a mãe preta - poema de amor que primeiro nos despertou a imaginação com estórias de fadas e de princezas - não representam, numa realidade mais profunda, um elemento tão importante quanto o do mestre universitário que ampara os primeiros tíbios passos científicos. Somos gratos à esta colaboração anônima - patrimônio social que recebemos continuamente do berço ao túmulo. Esperamos que a continuação dos nossos esforços possa contribuir indiretamente para aprimorar e enriquecer êste patrimônio.

As investigações integrantes do presente trabalho representam as pesquisas que, iniciadas em 1961 com a colaboração do Prof. O.G.BIER, foram desenvolvidas na cadeira de Microbiologia e Imunologia da ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA (1961-1964), no Serviço de Química Microbiana do INSTITUTO PASTEUR DE PARIS (1965-1966) e no laboratório de Imunoquímica do INSTITUTO BUTANTAN. Agradecemos o apôio que a direção dessas Instituições e os chefes dos dois primeiros laboratórios - Profs. O.G.BIER e P. GRABAR - concederam às nossas pesquisas. Somos igualmente gratos aos seguintes pesquisadores, técnicos e Instituições:

Dr. C.LAPRESLE, Institut Pasteur, Paris, pelo constante estímulo e apôio, facilitando sobremaneira os nossos traba

lhós com o fornecimento de numerosos reagentes.

Prof. M. RAYNAUD, Dr. R. MANGALO, Institut Pasteur, Garches; C. CHAGAS FILHO e A.F.R. LIMA, Instituto de Biofísica, da Universidade do Brasil; F. MENDELBAUM, Instituto Butantan, pelo auxílio prestado às experiências de ultracentrifugação analítica.

Prof. A. G. OSLER, The John Hopkins University; Prof. E. KABAT, Columbia University; J. URIEL e I. AVRAMEAS, Institut de Recherche sur le Cancer, Villejuif; Drs. M.S. PINHEIRO, H.C. PASSOS e A. PERINI, Escola Paulista de Medicina pelo auxílio prestado à discussão dos resultados experimentais.

Prof. S.B. HENRIQUES e O.B. HENRIQUES pela acolhida no laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan onde foram realizadas algumas experiências.

Prof. U.F. ROCHA, Universidade de S. Paulo, K. KLOETZEL e A.F. RIBEIRO pela revisão do manuscrito.

C.O. RANGEL pela assistência técnica prestada às experiências realizadas; H. RIBEIRO pelo serviço datilográfico.

CONSÉLHO NACIONAL DE PESQUISAS pelo apóio financeiro à nossa estadia no Institut Pasteur, Paris; ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA pela impressão em Rotaprint do presente trabalho.

No início de sua carreira científica o Autor recebeu estímulo e apóio dos Profs. Egon DARZINS, Heitor da ROCHA LIMA e Dorival FONSECA RIBEIRO. Com esta obra lhes rende pálida mas sincera homenagem.

H.A. Rangel

INTRODUÇÃO

As primeiras observações sobre as reações imunitárias (1) ressaltavam o alto grau de especificidade das interações antígeno-anticorpo. Comparando estas interações às reações químicas, EHRlich propôs a célebre teoria das cadeias laterais (2,3) admitindo a existência de relações estequiométricas definidas na combinação A.Ag. A descoberta de numerosos fatos, entre os quais os fenômenos de DANYSZ (4) e o de EHRlich, que impunham reformulações sucessivas da teoria das cadeias laterais, conduziram BORDET (5,6) a classificar as reações A.Ag entre os fenômenos coloidais, admitindo a reversibilidade dessas reações e a combinação dos reagentes em proporções variáveis. ARRHENIUS (7,10,11) conciliando os pontos de vista discordantes das duas teorias, propôs como modelo das reações A.Ag as reações entre bases fracas e ácidos fracos.

Os métodos de análise existentes àquela época, precários ante a complexidade do material biológico em estudo, não permitiram uma tomada de posição definitiva entre as três teorias. Contudo a concepção de EHRlich postulando uma base química para as reações imunológicas exerceu um influxo ponderável no desenvolvimento das pesquisas ulteriores. Procurando verificar a importância de determinados grupos químicos do antígeno, OBERMAYER e PICK (12,13) verificaram que a introdução de radicais halogenados ou nitrosos na molécula do antígeno conferia a este uma nova especificidade. O fato conhecido de que aqueles radicais se combinavam ao anel benzênico de alguns amino-ácidos, levaram esses autores a atribuir um papel preponderante àqueles amino-ácidos na antigenicidade das proteínas. As observações (14,16) de LANDSTEINER e col. de que a esterificação, metilação e acetilação conduziam igualmente a alterações da especificidade sugeriram a importância dos grupos carboxílico, hidroxila e amínicos na especificidade dos antígenos. A vasta obra desenvolvida por LANDSTEINER (17) e seus colaboradores em seguida à introdução do uso da diazo-reação para conjugar estruturas químicas definidas à molécula do antígeno (18), representa sem sombra de dúvida o passo

fundamental para a compreensão do mecanismo das reações antígeno-anticorpo. A despeito das restrições inicialmente levantadas (19) relativas ao artificialismo das ligações -N=N-, inexistentes nos compostos naturais, e ao drástico tratamento químico a que eram submetidos os antígenos durante a diazotização, as conclusões de LANDSTEINER se mantiveram porquanto foram amplamente confirmadas com o uso de outros reagentes para conjugação em condições mais suaves de reação (20,21). O conjunto dos resultados obtidos com os haptenos demonstra que a especificidade imunológica depende de grupos químicos de estrutura definida. A existência, nos antígenos naturais, de grupos determinantes da antigenicidade é uma inferência lógica dessas experiências.

Se a demonstração da existência de determinantes antigênicos trouxe argumentos em favor das ideias de EHRLICH, o estudo da reação de precipitação, descoberta por KRAUS (22), veio trazer argumentos em desfavor do postulado da combinação em proporções definidas. A observação de discrepâncias entre os resultados semi-quantitativos obtidos com as técnicas de RAMON (23) e DEAN e WEBB (24) já sugeriam a formação de complexos A.Ag em proporções variáveis. Foi, porém, a introdução de técnicas quantitativas (25,26), aperfeiçoadas e proficientemente utilizadas por HEIDELBERGER e colaboradores, que propiciou a demonstração inequívoca da formação de complexos A. Ag contendo proporções variáveis de reagentes (27,30). Baseados nesta demonstração, HEIDELBERGER e KENDALL, emitiram a hipótese da combinação, segundo a lei de ação das massas, entre um anticorpo divalente e um antígeno multivalente, deduzindo equações que se ajustavam à maioria dos dados experimentais (31). Em essência, a hipótese de HEIDELBERGER e KENDALL se confunde com a hipótese de MARRACK (32,33) e ambas, suportadas por numerosos fatos, indicam que os antígenos naturais, polissacáridos e proteínas, contém vários determinantes antigênicos.

As noções iniciais da teoria sobre a correlação entre estrutura e especificidade dos polissacáridos devem-se a AVE-
RY e GOEBEL (34,36). Conjugando açúcares simples ou oligósi-
dos a proteínas, puseram em evidência a importância da nature-
za das oses, bem como o tipo (alfa ou beta) e posição das li-
gações entre os açúcares constituintes do polissacárido.

O antígeno capsular dos pneumococos (37) isolado e ca-
racterizado do ponto de vista físico-químico (38,42) serviu
de material experimental extremamente útil para o estudo de
determinantes antigênicos nos polissacáridos. A existência de
numerosos tipos imunológicos (43,45), alguns dos quais exi-
bindo reações cruzadas entre si, sugeriu a presença de estru-
turas similares nos antígenos capazes de reagir com um mesmo
anticorpo. A demonstração de que o antígeno capsular SIII e-
ra constituído de unidades de ácido celubiurônico (46,47) con-
duziram HEIDELBERGER e GOEBEL a uma série de elegantes expe-
riências (48,51), demonstrando a importância desta unidade es-
trutural nas reações cruzadas entre SIII e SVIII. Os sôros
preparados contra êstes polissacáridos precipitavam um antíge-
no artificial constituído de ácido celubiurônico conjugado a
proteínas. Os sôros preparados contra êste antígeno artifi-
cial precipitavam ambos SIII e SVIII e, finalmente, a celulo-
se, polímero constituído de unidades de glicose ligadas entre
si por ligações alfa 1-4, após oxidação parcial, conduzindo à
formação de unidades de ácido celubiurônico na molécula do po-
límero, precipitava com os sôros preparados contra SIII e o
antígeno artificial. Os trabalhos de JONES (52), esclarecendo
a estrutura química de SVIII, vieram corroborar as conclusões
imunológicas.

Experiências orientadas no mesmo sentido, comperando
as estruturas dos SVI e SII, permitiram a previsão e subse-
quentemente confirmação da existência de reações cruzadas en-
tre êsses antígenos e polissacáridos extraídos de várias plan-
tas (53,54). Inversamente, a demonstração de reações cruza-
das entre êsses antígenos e outros polissacáridos permitiu a

previsão, amplamente confirmada pela análise química subsequente, da existência de determinadas estruturas comuns nos antígenos que reagem cruzadamente.

As observações de que o dextran era antigênico para o homem (61,63) conduziram a uma série de experiências que permitiram obter algumas noções sobre as dimensões do sítio de combinação do anticorpo. As reações de precipitação dos sêros anti-dextran com o dextran, formado predominante por moléculas de glicose unidas por ligações alfa 1-6, são inibidas por oligo-isomaltoses. O maior grau de inibição, em base molar, foi obtido com isomaltohexaose. A molécula deste oligossacárido, quando na forma "extendida" mede $34 \times 12 \times 8$ Å, o que indica que a região complementar da molécula do anticorpo tem dimensões aproximadamente correspondentes (64,64). Estudos de equilíbrio de diálise indicaram que se se admite que a isomaltohexaose representa 100% da energia de combinação antígeno - anticorpo, a glicose terminal, possuindo o grupo redutor livre do oligósido, contribue com 40% dessa energia. A região correspondente à glicose terminal e à adjacente contribue com 60%. O conjunto representado pela glicose terminal e as duas unidades vizinhas contribue com 90% dessa energia (66,67). Resultados similares obtidos com o antígeno O das Salmonelas (55,57) permitiram o estabelecimento da noção da existência de regiões imunodominantes na estrutura do determinante antigênico.

O estudo de outros polissacáridos antigênicos, tais como os antígenos O e R das Salmonelas (STAUB, WESTPHAL) o ácido tecoico das bactérias gram-positivas (58), antígeno C dos estreptococos (59), bem como dos antígenos responsáveis pela especificidade dos grupos sanguíneos (60), vem contribuindo para a compreensão das relações entre estrutura e especificidade e vieram ressaltar a importância das ramificações laterais desses polissacáridos.

Muito embora ainda existam numerosos problemas ainda

sem solução (69,70), os resultados obtidos na investigação dos antígenos polissacarídicos permitem-nos ter uma idéia das estruturas desses antígenos que estão envolvidos na reação antígeno-anticorpo. O determinante antigênico dos polissacarídicos pode ser representado por conjuntos de 6 a 7 oses, geralmente pertencentes à ramificação lateral da cadeia principal do polissacarido. A natureza das oses, bem como o tipo e a posição das ligações entre as diversas unidades, são fatores essenciais na especificidade desses antígenos.

Contrastando com a relativa simplicidade dos polissacarídicos, constituídos em geral de unidades que se repetem, as proteínas são constituídas por amino-ácidos unidos entre si por ligações peptídicas, formando conjuntos altamente complexos que, salvo raras exceções, não se repetem na estrutura desses antígenos. A molécula proteica deve ser examinada em pelo menos três níveis diferentes (71): a) a estrutura primária, relativa à sequência dos amino-ácidos na cadeia polipeptídica; b) a estrutura secundária, referente às posições assumidas pela cadeia e c) a estrutura terciária, referente à conformação tri-dimensional da molécula. O reconhecimento de que certas proteínas são constituídas por um número determinado de sub-unidades justapostas levou BERNAL (72) a admitir a existência de uma estrutura quaternária correspondente à configuração resultante da posição das estruturas terciárias.

As dificuldades no estudo destas estruturas são de várias ordens. Os métodos de fácil utilização para o isolamento de proteínas são de desenvolvimento recente. Há cerca de um decênio atrás, raras proteínas podiam ser obtidas em estado puro e o advento das técnicas imunoquímicas permitiu demonstrar a existência de numerosos contaminantes nas proteínas cristalizadas várias vezes e rotuladas como 100% puras. A existência de uma micro-heterogeneidade de algumas entidades proteicas representa um fator adicional de dificuldade para o

conhecimento da estrutura dêsses antígenos. Variações de estrutura, geneticamente determinadas (alotipos, isoenzimas, hemoglobina) (73,75), ocorrem dentro de uma espécie animal e provavelmente em um mesmo indivíduo, no decorrer de sua existência (idiotipia) (76). Por outro lado as técnicas empregadas para o conhecimento dos diversos níveis de estrutura não são facilmente acessíveis e de interpretação simples. Os trabalhos pioneiros de SANGER sobre a estrutura primária da insulina (77), introduzindo metodologia para a determinação da sequência de amino-ácidos, permitiu abordar o estudo de algumas proteínas. Contudo, a despeito do otimismo de NEUBERGER (78) e do constante aperfeiçoamento das técnicas de química das proteínas, a determinação da estrutura primária apresenta dificuldades técnicas tanto mais consideráveis quanto maior o peso molecular do material em estudo (79). Considerações semelhantes podem ser aduzidas em relação às contribuições pioneiras de KENDREW e de PERUTZ (80-82) sobre a estrutura terciária de mioglobina e de hemoglobina.

Tendo em vista a escassez de informação sobre a estrutura dos antígenos proteicos, o estudo dos determinantes antigênicos não pode ser abordado por metodologia semelhante à utilizada no estudo do polissacárido pneumocócico. Muito embora algumas comunicações tenham sido feitas relatando a ocorrência de reações cruzadas entre péptidos sintéticos e algumas proteínas (83), não se pode pretender estabelecer uma metodologia de estudo baseada na investigação dessas reações, por duas razões principais. Em primeiro lugar, a ocorrência de reações cruzadas indicaria a existência na proteína de estruturas semelhantes ao oligopéptido mas não forneceria indicações quanto à participação dessa estrutura no determinante antigênico da proteína. Em segundo lugar, o número de estruturas a serem pesquisadas seria extremamente elevado. Considerando-se que um determinante seja representado por uma sequência de 3 a 4 resíduos de amino-ácidos dispostos em alfa hélice, pode-se calcular a existência de 40070 determinantes di-

ferentes (84). Esta cifra é reconhecidamente insuficiente para representar os determinantes possíveis, pois qualquer dos 20 amino-ácidos naturais pode repetir-se na estrutura do determinante, o que permite calcular a existência de 168.000 de determinantes (85). A estimativa de 10^6 determinantes diferentes é considerada conservadora, se se incluem as possibilidades de arranjos desses resíduos em três dimensões (86).

O estudo dos determinantes proteicos tem sido abordado sobretudo por métodos visando verificar a ação de determinados agentes, particularmente compostos químicos e enzimas proteolíticos, sobre a reatividade imunológica do antígeno proteico. A alteração da molécula proteica com agentes químicos, visando estabelecer a importância de determinadas estruturas do antígeno na especificidade imunológica, não permitiu a obtenção de informações precisas sobre os grupos químicos envolvidos na especificidade das proteínas. Os resultados obtidos com o uso de acetilação, metilação, deaminação, esterificação, (87) são dependentes da natureza do antígeno e da amplitude da alteração nêle produzida. Resultados opostos foram obtidos submetendo-se diferentes proteínas a um mesmo tratamento químico (88,89), o que indica que diferentes grupos químicos devem estar envolvidos na reação antígeno-anticorpo. Esses resultados são contudo de difícil interpretação, porquanto nem todos os grupos, teoricamente alteráveis, são efetivamente alterados durante o tratamento. A posição de tais grupos, alguns inacessíveis nas condições de reação, ou a sua relação de vizinhança com outros grupos químicos, são fatores importantes na reatividade com os reagentes químicos empregados (90). A dificuldade maior, porém, na interpretação dos dados obtidos provem da constatação de que a introdução ou a supressão de radicais conduzem a modificações complexas (91), de algum modo semelhantes às obtidas por desnaturação (calor, ácidos, bases, ureia, guanidina) e que implicam em alterações da estrutura terciária da molécula. Estudos recentes com a ribonuclease vieram consolidar a noção da importância da estrutura terciária na especificidade antigênica das proteínas. A

redução das pontes dissulfeto êsse antígeno altera profundamente a sua especificidade antigênica e a oxidação controlada da ribonuclease reduzida reconduz à especificidade original da proteína nativa (92).

As investigações iniciais sôbre a reatividade imunológica das proteínas submetidas a ação de enzimas mostraram que esta reatividade diminue progressivamente com a intensidade de digestão, anulando-se num período de tempo variável para cada antígeno (93). Verificou-se igualmente que, no decorrer da digestão, apareciam polipéptidos capazes de inibir parcialmente as reações do antígeno nativo com o sôro homólogo. Alguns dêsses polipéptidos são de baixo pêso molecular, em alguns casos constituídos por 8 a 12 amino-ácidos apenas (94); outros podem ser de pêso molecular relativamente elevado (95). Constatou-se também que, em certos antígenos, a remoção de um determinado grupo de amino-ácidos pode reduzir consideravelmente a sua precipitabilidade pelo sôro imune (96).

A introdução das técnicas de imuno-difusão permitiu a LAPRESLE e colaboradores a realização de um estudo sistemático da estrutura antigênica da albumina humana (SAH), investigando a ação de proteases sôbre a mesma. Sob a ação de proteases de baço de coelho a SAH é cindida em alguns fragmentos que contêm diferentes determinantes antigênicos (97-102). A comparação dêsses resultados com os obtidos de estudo da ação de outros enzimas permitiu demonstrar que o motivo antigênico da albumina é constituído por vários determinantes diferentes entre si (103-105). Em concordância com êsses achados demonstraram que os imune-sôros anti-SAH são constituídos por misturas de anticorpos de diferentes especificidades (106). Nos produtos de digestão da SAH pela catepsina D de coelho existe um fragmento capaz de inibir, parcialmente, a reação SAH versus anti-SAH (107). Êste fragmento, denominado de inibidor, de pêso molecular igual a 11.000, contém pelo menos dois dos determinantes antigênicos da albumina nativa (108). Pela ação da tripsina sôbre o inibidor pode-se obter um fragmento, de pêso

molecular igual a 6.600, que contém apenas 1 dos determinantes antigênicos da albumina (109). O conjunto dos trabalhos desses pesquisadores, confirmado pelo estudo de numerosos antígenos (110), mostrou que o motivo antigênico de uma proteína é constituído de numerosos determinantes antigênicos diferentes entre si e indica a possibilidade de se obter informação sobre as estruturas envolvidas na especificidade das proteínas através o isolamento e estudo de fragmentos contendo apenas um único determinante.

Do acervo de observações coligidas no estudo dos antígenos proteicos ressaltam duas conclusões principais: 1ª) a heterogeneidade dos determinantes antigênicos de uma molécula proteica exige que a pesquisa se restrinja a sistemas constituídos por: a) um determinante isolado; b) os anticorpos específicos de um único determinante; 2ª) o fato de que a estrutura terciária é de extrema importância para a especificidade sugere que se poderá obter informações sobre os resíduos envolvidos nessa especificidade através a comparação da estrutura de fragmentos contendo um único determinante. As nossas pesquisas (11-118), orientadas por essas conclusões têm como escopo final a comparação de estruturas que reagem cruzadamente. No presente trabalho relatam-se as experiências realizadas com o fito de verificar a possibilidade de isolamento, dos sôros anti-sôro albumina bovina de um anticorpo específico de um único determinante antigênico, comum às albuminas humana, bovina e equina.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos: As sôro-albuminas humana e bovina (SAH e SAB) cristalinas, foram obtidas respectivamente da Nut. Biochem. Co e Pentex, Inc. . A sôro-albumina equina (SAE), cristalizada 5 vezes, foi preparada, a partir de sôro de cavalos normais, pelo método de ADAIR e ROBINSON, conforme instruções fornecidas por KABAT e MAYER (120).

Antígenos marcados com I radioativo. As SAB e SAE foram marcadas com I^{131} de acôrdo com o método de BANERJEE e EKINS (121). Ambos os antígenos marcados, após passagem por uma coluna de "ionoresin", continham menos de 1% de I^{131} livre e apresentavam uma atividade específica de 15.000 impulsos/minuto/ugN proteína. As contagens foram feitas em um cintilômetro de pôço Philips.

Imune-sôros. Os imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti SAE foram obtidos de coelhos imunizados de acôrdo com o seguinte esquema: nas três primeiras semanas os animais recebiam uma injeção subcutânea semanal de 1 ml de uma mistura, em partes iguais, de uma solução salina do antígeno (20 mg/ml) e de adjuvante completo de FREUND (122). Uma semana após a última inoculação, administrava-se a êsses animais, durante 3 semanas consecutivas, cada dois dias, uma injeção endovenosa do antígeno (1 mg/ml) precipitado pelo alumen. Os animais eram sangrados a branco, por punção cardíaca, uma semana após a última injeção. Os sôros foram inativados a 56°C durante 30 minutos.

Enzimas. Os seguintes enzimas, sob a forma cristalina, foram obtidos de Sigma Co.: pepsina, tripsina, quimotripsina, papaina. A catepsina D, de origem bovina, foi extraída a partir de baços, conforme as indicações de PRESS, PORTER e CEBRA (123). As catepsinas D e E de coelho foram extraídas, respectivamente, do baço e da medula óssea dêsses animais, conforme

indicações de LAPRESLE e WEBB (124).

Reagentes. Tódos os reagentes utilizados, adquiridos no comércio, salvo alguns reagentes especiais, traziam especificação de reagentes analíticos. As procedências dos reagentes especiais foram as seguintes: Eastman Kodak, di-isopropil fluoro fosfato (DFP); dinitrofluorobenzeno (DN-FB). Abbot: ionoresin. Whatman: di-etilaminoetil-celulose e carboximetil-celulose, ambas com a capacidade de 1 meq/gm. Pharmacia Upsala: Sephadex G-200, Sephadex G-75.

Precipitação em meio líquido. Utilizamos o método de HEIDELBERGER e KENDALL, segundo instruções fornecidas por KABAT e MAYER (120). A quantidade de proteína dos precipitados foi determinada quer pela técnica do micro-kjeldahl (125), quer por técnicas espectrofotométricas utilizando o reagente do biureto (126) ou o reagente de LOWRY (127).

Precipitação em meio gelificado. As técnicas de imuno difusão foram realizadas em gel de agar a 1%, em meio salino isotônico de pH 7,2-7,4. A técnica de difusão simples, unidimensional, foi realizada conforme instruções de UDIN (128) e a de dupla difusão, conforme instruções de OUCHTERLONY (129). As imunoeletroforeses foram realizadas conforme as indicações de GRABAR e BURTIN (130), em placas de vidro de 12 x 8 cm, contendo uma camada de 5 mm de espessura de agar a 1%, tampão veronal, pH 8,4, $\mu = 0,0025$, gradiente de potencial 10 volts/cm, tempo de 1h e 20 m.

Fixação do Complemento. As reações de fixação do complemento foram executadas conforme as instruções de MAYER e colaboradores (131,132).

Hemólise passiva. Classificamos a técnica de hemólise passiva como direta quando a lise específica é desencadeada pela ação concorrente do complemento e dos anticorpos específicos para o antígeno artificialmente fixado à hematia. Esta técnica foi executada conforme as instruções fornecidas por RANGEL e REPKA (116). Classificamos a técnica como indireta quando a lise é obtida pela ação de anticorpos anti-globulina sobre os glóbulos sensibilizados com o antígeno e com anticorpos específicos. A técnica indireta foi realizada de acordo com as indicações fornecidas em RANGEL (118) e em RANGEL e PERINI (119).

Hemaglutinação passiva. A técnica de hemaglutinação passiva com hematias taninizadas foi executada de acordo com as instruções de BORDUAS e GRABAR (133).

Isolamento dos anticorpos responsáveis pela reação cruzada entre albuminas. Os anticorpos responsáveis pela reação cruzada entre albuminas foram isolados utilizando-se os seguintes métodos de isolamento específico de anticorpos.

a) - Método de GYENES e SEHON (134). O imuneabsorvente, constituído por SAH, por SAB ou por SAE, conjugada ao poliamino-poliestireno, foi preparado conforme indicações desses autores. Cerca de 30 gm (pêso úmido) do imuneabsorvente heterólogo eram misturadas com 50 ml de sôro imune e com algumas gotas de cloroformio. A mistura era deixada a 37°C durante meia hora, com agitação constante, e em seguida, em repouso a 0°C durante 18 horas. O excesso de sôro era decantado e o imuneabsorvente, colocado em uma coluna cromatográfica, era lavado durante 18 h com cerca de dois litros de solução salina fisiológica, de modo a que os efluentes apresentassem uma densidade ótica igual ou inferior a 0,020, em comprimento de onda de 280 mu. Os anticorpos, fixados ao imuneabsorvente eram eluídos a 0°C com tampão glicina-HCl, 0,1M, pH 1.0. Os e-

luatos eram recolhidos a 0°C e imediatamente neutralizados. A concentração proteica desses eluatos era estimada espectrofotometricamente a 280 mμ. Os eluatos com uma densidade ótica igual ou superior a 0,200 eram misturados, dialisados contra água destilada, e liofilizados. A fração IgG era isolada desses anticorpos a partir do material liofilizado, conforme é indicado abaixo.

b) Método de SINGER, FOTHERGILL e SHAYNOFF. A reação desses antígenos com a homocisteína-tiolactona, pelo método de SINGER, FOTHERGILL e SHAYNOFF (135), introduziu grupos sulfídricos na SAB, na SAH e na SAE. Os anticorpos foram isolados, nas condições descritas por esses autores, a partir dos precipitados específicos obtidos na equivalência. Após dissociação do precipitado específico a 0°C com tampão HCl-glicina 1M, pH 1,0, o antígeno era precipitado com reagente mercurial bivalente e removido por centrifugação. O reagente mercurial bivalente utilizado foi a bis-acetoxi-mercúrio-metil-dioxana preparada de acordo com as indicações fornecidas na publicação desses autores. Após remoção do antígeno, os anticorpos eram neutralizados com NaOH 1M, dialisados contra água destilada e liofilizados.

c) Método de AVRAMEAS e col. (136) O antígeno - SAH, SAB ou SAE - foi polimerizado através o uso de cloroformiato ou carbo-diimida, de acordo com as instruções fornecidas pelos autores. Os anticorpos foram isolados nas condições por eles descritas, dialisados contra água destilada e liofilizados.

Os anticorpos liofilizados, isolados por qualquer um dos métodos, foram dissolvidos em solução salina fisiológica (20 mg/ml). Após centrifugação da solução, porções de 10 ml foram cromatografadas em colunas (90 cm x 1,5 cm) de Sephadex G-200 equilibrado com salina fisiológica tamponada com fosfatos 0,05 M, pH 7,4. Os efluentes correspondentes ao pico com um Kd idêntico ao de imunoglobulinas da classe IgG foram iso-

lados, dialisados contra água destilada e liofilizados.

Nas experiências relatadas neste trabalho foram usados sobretudo anticorpos isolados conforme o método de GYENES e SEHON, que permitiu o isolamento de anticorpos reagindo cruzadamente com qualquer das albuminas em estudo. Tentativas feitas com o método de SINGER, FOTHERGILL e SHAYNOFF mostraram que a SAE, modificada pela ação da h-acetil-homocisteína-tiolactona, não precipita com os sôros anti-SAB e anti-SAH, de modo que não foi possível obter os anticorpos que reagem cruzadamente com SAE por este método. O método de AVRAMEAS e col. - por ser de elaboração recente - foi utilizado apenas em algumas ocasiões. A comparação de anticorpos purificados em Sephadex G-200, isolados através o uso dos métodos acima descritos, não revelou a existência de diferenças apreciáveis nas suas propriedades imunoquímicas.

Preparação dos complexos solúveis. Os complexos formados entre o antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas foram preparados a partir dos sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE. Estes imunesôros eram misturados em proporções equivalentes com o antígeno heterólogo e, após incubação a 37°C por 1 hora, conservados em geladeira por 24 horas. O precipitado específico formado, correspondente a 1 ml de sôro, era lavado três vezes com solução salina a 0°C e dissolvido em 3 ml de uma solução do mesmo antígeno, numa concentração correspondente a 10 vezes a utilizada para precipitação na equivalência.

Reações com antígenos marcados. As manipulações envolvendo o uso de antígenos marcados com iodo radioativo foram realizadas de acordo com as instruções gerais fornecidas por FARR (137). A mistura tamponada, contendo sôro normal de coelho (tampão SNC), e usada como diluente para o reagente, foi preparada de acordo com as indicações deste autor.

Isolamento do fragmento Inibidor (fragmento IH). O fragmento IH foi obtido a partir dos digestos da SAH pela catepsina D de coelho, conforme WEBB e LAPRESLE (108).

Isolamento do fragmento F₁. O fragmento F₁ foi obtido a partir dos digestos do fragmento IH pela tripsina, conforme as instruções de LAPRESLE e WEBB (109).

Preparação de imuneabsorventes contendo o fragmento IH ou o fragmento F₁. A preparação destes imuneabsorventes foi realizada por conjugação desses fragmentos à para-aminobenzilcelulose, conforme WEBB e LAPRESLE (108) e LAPRESLE e WEBB (109).

Isolamento dos anticorpos que reagem com o fragmento IH ou o fragmento F₁. Esses anticorpos foram isolados, através o uso dos imuneabsorventes descritos acima, em condições similares às indicadas para o isolamento dos anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas entre sôro-albuminas pelo método de GYENES e SEHON.

Cromatografia em celulose modificada. As cromatografias em celulose modificadas (DEAE e CM celulosas) foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas em SOBER et al (138). Os tampões usados nessas cromatografias consistiam de mistura de fosfatos primário e secundário de potássio ou sódio, nas proporções exigidas para obtenção do pH e força iônica requerida pela experiência. Para o isolamento da catepsina D do baço de bovinos foram usados os tampões indicados por PRESS, PORTER e CEBRA (123).

Cromatografia em Sephadex. As indicações de FLODIN (139) foram seguidas na realização das cromatografias em SEPHADEX.

Cromatografia em papel. De acordo com as necessidades as técnicas ascendente e descendente de cromatografia em pa-

pel foram executadas conforme as instruções de LEGETT BAILEY (140).

Determinação dos amino-ácidos portadores do grupo NH₂ terminal. As indicações de FRAENKEL-CONRAT, HARRIS e LEVY (141) foram seguidas para caracterização pela técnica de SANGER (77) dos amino-ácidos portadores do grupamento NH₂ terminal.

Ultracentrifugação analítica. As recomendações de SCHACHMAN (142) foram seguidas na realização das experiências de ultracentrifugação analítica e no cálculo das constantes de sedimentação.

Análise quantitativa de amino-ácidos. A determinação quantitativa da composição em amino-ácidos do fragmento IH foi realizada em aparelho automático (Auto Technicon, Beckman) segundo as instruções de SPACKMAN, MOORE e STEIN (145).

APRESENTAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Relações antigênicas entre as albuminas.

As sôro-albuminas humana, bovina e equina (SAH, SAB e SAE) possuem várias propriedades e constantes físico-químicas similares, permitindo pressupôr a existência de similaridades estruturais, implicando em relações antigênicas detectáveis pela ocorrência de reações cruzadas. A primeira parte de nossas investigações foi dedicada ao estudo das relações antigênicas entre essas albuminas com o fito de verificar se existia um notivo antigênico comum a SAH, a SAB e a SAE, e qual o grau de similaridade antigênica entre a representação dêsse motivo nas diferentes albuminas investigadas.

1.1. REAÇÕES ENTRE AS ALBUMINAS NATIVAS E OS IMUNE-SÔROS NÃO PURIFICADOS.

As reações entre cada uma das albuminas em estudo e os imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE foram estudadas pela técnica quantitativa de HEIDELBERGER e KENDALL, por imunodifusão em gel de agar e por provas de absorção específica.

1.1.1. Reações de precipitação em meio líquido.

Os resultados quantitativos das reações de precipitação em meio líquido, obtidos pela técnica de HEIDELBERGER e KENDALL, acham-se resumidos nas tabelas I, II e III.

A inspeção dessas tabelas evidencia que, na maioria dos casos, os imune-sôros reagem, em grau variável para cada sôro, com qualquer uma das albuminas em estudo, não existindo paralelismo entre os títulos observados com o antígeno homólogo e os obtidos com os antígenos heterólogos. Os dados obtidos na zona de excesso de anticorpo, em qualquer dos sistemas es-

TABELA I

Dados quantitativos referentes às reações de precipitação observadas entre os sôros anti-SAH e SAH, SAB e SAE

Sôro	Antígeno: SAH		Antígeno: SAB		Antígeno: SAE	
	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max
nº 1	4,0	11,2	0,60	3,5	0,67	3,7
nº 2	6,7	8,6	1,2	3,0	1,00	3,5
nº 3	3,8	9,0	0,7	4,8	0,63	4,5
nº 4	5,7	7,9	0,56	5,0	0,70	4,8
nº 5	10,0	13,6	1,3	7,7	1,70	8,0

TABELA II

Dados quantitativos referentes às reações de precipitação observadas entre os sôros anti-SAB e SAB, SAH e SAE

Sôro	Antígeno: SAB		Antígeno: SAH		Antígeno: SAE	
	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max
nº 1	2,0	8,0	0,40	3,8	0,45	3,6
nº 2	11,4	11,0	1,30	8,0	1,10	7,5
nº 3	7,0	14,0	1,10	5,0	1,20	4,7
nº 4	3,6	11,0	0,5	1,8	0,60	1,9
nº 5	4,5	8,6	0,0	0,0	0,0	0,0

TABELA III

Dados quantitativos referentes às reações de precipitação observadas entre os sôros anti-SAE e SAE, SAB e SAH

Sôro	Antígeno: SAE		Antígeno: SAB		Antígeno: SAH	
	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max	mg prot anticorpo por ml	relação molar A/Ag max
nº 1	6,60	10,0	0,92	4,9	0,80	5,0
nº 2	2,6	7,6	0,24	2,5	0,38	3,0
nº 3	12,2	7,6	1,30	7,8	1,10	7,7
nº 4	3,5	9,0	0,17	1,7	0,22	1,5
nº 5	7,6	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0

tudados, foram consistentes com a hipótese da existência de uma função linear entre a relação A/Ag do precipitado e a quantidade de Ag adicionado a 1 ml de imune-sôro. Admitindo-se um peso molecular de 70.000 para as albuminas (144) e de 145.000 para a gama-globulina (145) e extrapolando-se as relações molares observadas de modo a obter o valor correspondente quando $Ag=0$, pode-se concluir que as albuminas possuem cerca de 15 determinantes antigênicos, sendo que apenas alguns deles (2 a 8) estão envolvidos nas reações cruzadas. Essas conclusões estão em concordância com os dados consignados na literatura (146).

O número de determinantes antigênicos obtidos por extrapolação dos dados experimentais tem apenas um valor relativo. A interpretação de GOLDBERG ao fenômeno da precipitação (147), admitindo a existência de complexos solúveis em extremo excesso de anticorpo, permite conceber um número de determinantes antigênicos maior do que os encontrados pela extrapolação. Por outro lado, pode-se admitir que a combinação de uma molécula de anticorpo com um dos determinantes antigênicos torne estericamente impossível o acesso de outra molécula de anticorpo a outros determinantes antigênicos próximos.

1.1.2. Reações de precipitação em gel de agar.

As reações de precipitação entre cada uma das albuminas nativas em estudo e os imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE foram estudadas por imune-difusão, utilizando-se a técnica de OUCHTERLONY.

A maioria dos sôros examinados por dupla difusão contra os antígenos homólogos e heterólogos, apresentou resultados semelhantes aos esquematizados na Fig. 1. Pode-se observar nessa figura que as relações entre o antígeno homólogo e o heterólogo correspondem a uma imagem de reação cruzada. A interpretação clássica dessa imagem postula a existência de

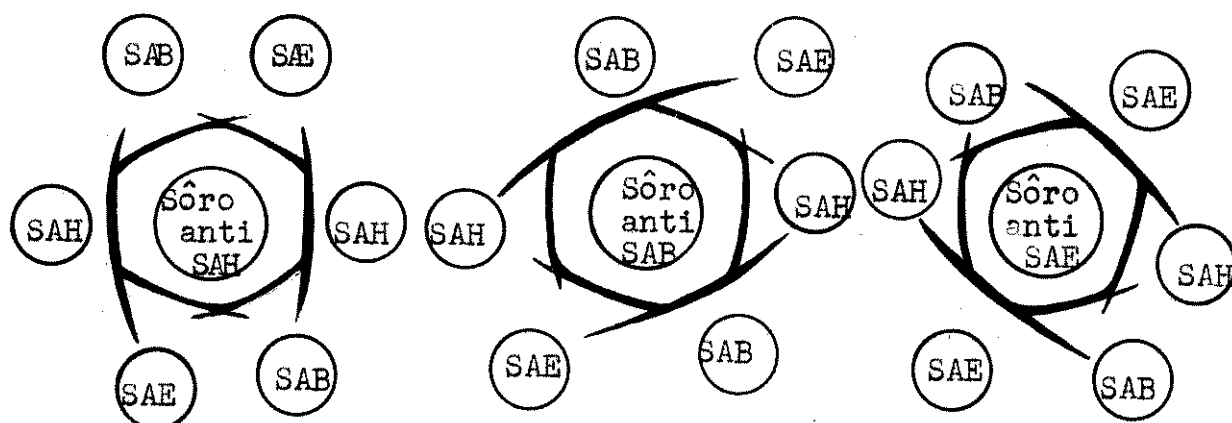


Fig.1 - Esquema das imagens observadas em gel de agar nas reações de imunodifusão entre as albuminas e os imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE.

dois tipos de anticorpos (148): um capaz de reagir com determinantes comuns aos dois antígenos e outro capaz de reagir com determinantes próprios ao antígeno homólogo. Essa interpretação está de acordo com os dados obtidos no estudo quantitativo da precipitação em meio líquido, indicando que apenas uma fração dos anticorpos presentes nos imune-sôros reagia com o antígeno heterólogo.

As linhas de precipitação correspondentes às reações do imune-sêro com antígenos heterólogos apresentam intensidades praticamente idênticas e se cruzam, diminuindo, porém, sensivelmente de intensidade após o cruzamento. Essa imagem sugere não só a presença de anticorpos capazes de reagir com determinantes comuns às três albuminas mas também de outros anticorpos que reagem com determinantes presentes apenas em duas dessas albuminas: na albumina homóloga e em uma ou outra das albuminas heterólogas. Esta interpretação, como se verá, foi confirmada pelas provas de absorção específica.

1.1.3 Reações de precipitação após absorção específica.

As experiências de absorção específica foram feitas precipitando o imune-sôro na equivalência com os antígenos homólogo ou heterólogo, conforme o caso. A seguir os sôros absorvidos foram testados com SAH, SAB e SAE pela técnica de imunodifusão em gel de agar e, em alguns casos, pela técnica de HEIDELBERGER e KENDALL.

Os resultados obtidos nessas experiências acham-se resumidos nas tabelas IV e V nas quais se poderá verificar que: 1) um imune-sôro absorvido com o antígeno homólogo não mais reagiu com os antígenos heterólogos; 2) a absorção de um imune-sôro com um dos antígenos heterólogos diminui o seu poder precipitante frente ao antígeno homólogo e ao outro antígeno heterólogo; 3) o poder precipitante de um imune-sôro frente ao antígeno homólogo encontra-se diminuído após absorção com ambos os antígenos heterólogos.

O conjunto dos resultados obtidos com as provas de precipitação indica que nos imune-sôros anti-albumina existem corpos pertencentes a, pelo menos, 3 diferentes tipos de especificidade:

- 1 - Anticorpos que reagiram com determinantes presentes apenas na albumina homóloga;
- 2 - Anticorpos que reagiram com determinantes comuns à albumina homóloga e a uma ou outra das albuminas heterólogas;
- 3 - Anticorpos que reagiram com determinantes comuns às três albuminas testadas.

Em consequência desses achados pode-se admitir a presença nas albuminas de pelo menos três motivos antigênicos diferentes (Fig.2):

- 1 - um motivo antigênico correspondendo a um conjunto de determinantes próprios, aparentemente, de uma espécie de albumina;
- 2 - um motivo antigênico contendo determinantes comuns a ape-

TABELA IV

Resultado das reações de precipitação, em gel de agar, dos i-mune-sôros anti-albumina prèviamente absorvidos com os antíge-nos homólogo ou heterólogo, e testado a seguir com SAH, SAB e SAE.

Sôro absorvido	Absorção com SAH testado com:			Absorção com SAB testado com:			Absorção com SAE testado com:		
	SAH	SAB	SAE	SAH	SAB	SAE	SAH	SAB	SAE
anti-SAH	-	-	-	++	-	+	++	+	-
anti-SAB	-	++	+	-	-	-	+	++	-
anti-SAE	-	+	++	+	-	++	-	-	-

A intensidade das linhas está indicada por:

- (-) ausência de precipitação
- (+) linha de precipitação acentuadamente reduzida em relação à reação análoga observada antes da absorção
- (++) linha de precipitação apenas discretamente reduzida em relação à reação análoga observada antes da absorção.

TABELA V

Resultados quantitativos das reações de precipitação dos imune-sôros após absorção com antígenos heterólogos.

Material	Quantidade de anticorpo (mg prot A) ppt na equivalência com:		
	SAH	SAB	SAE
Sôro anti-SAH nº 6:			
antes da absorção	1,00	0,20	0,18
Após absorção com SAB	0,80	0,0	0,02
Após absorção com SAE	0,83	0,04	0,0
Após absorção com SAB e SAE	0,84	0,0	0,0
Sôro anti-SAB nº 3:			
Antes da absorção	1,1	7,0	1,2
Após absorção com SAH	0,0	6,0	0,25
Após absorção com SAE	0,10	5,7	0,0
Após absorção com SAH e SAE	0,0	6,0	0,0
Sôro anti-SAE nº 3:			
Antes da absorção	1,1	1,3	12,2
Após absorção com SAH	0,0	0,3	11,1
Após absorção com SAB	0,1	0,0	10,8
Após absorção com SAB e SAH	0,0	0,0	11,2

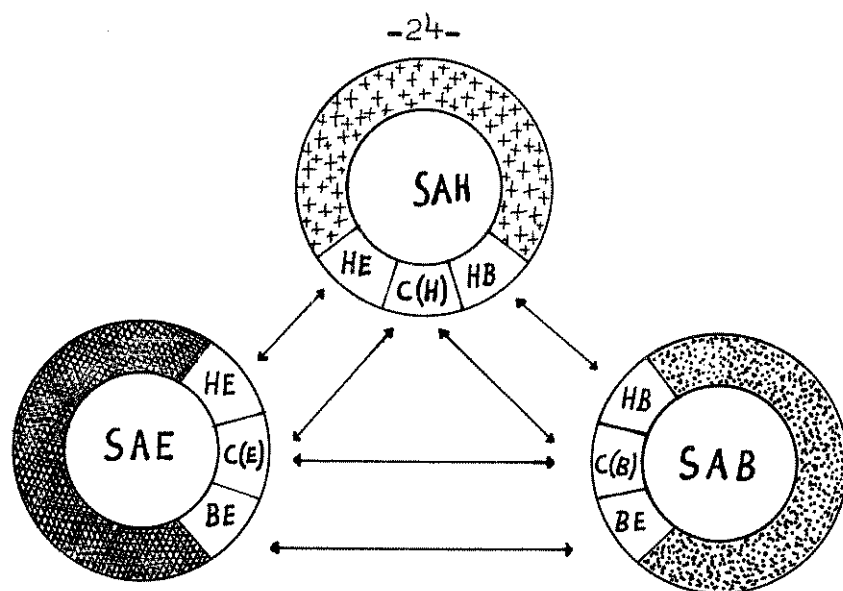


Fig. 2 - Representação esquemática das relações antigênicas entre SAH, SAB e SAE. A localização e as dimensões dos motivos antigênicos representados são arbitrárias. O motivo antigênico comum às albuminas em estudo está representado pelos símbolos C(H), C(B) e C(E).

nas duas das albuminas;

3 - um motivo antigênico correspondendo a determinantes comuns às três albuminas em estudo. Esta interpretação encontra apoio nos dados obtidos por outros autores (149).

1.2. REAÇÕES DA ALBUMINA EQUINA DESNATURADA (SAE Dn) COM OS IMUNE-SÔROS ANTI-SAE, ANTI-SAB E ANTI-SAH.

Estudos com haptenos mostraram que as reações cruzadas podem ocorrer não somente com antígenos possuidores de determinantes idênticos mas também com antígenos possuidores de determinantes com certo grau de similaridade estrutural. Em consequência desses achados, duas hipóteses foram aventadas para explicar a existência de reações cruzadas com antígenos completos: a hipótese de HOOKER e BOYD (150), admitindo a existência de determinantes idênticos nos antígenos que reagem

cruzadamente, e a hipótese de LANDSTEINER e VAN DER SHEER (151) que admite a existência de uma similaridade estrutural entre os determinantes desses antígenos.

As experiências anteriores evidenciaram a existência de um motivo antigênico comum às albuminas em estudo, representado esquematicamente pelos símbolos C(H), C(B) e C(E) quando integrando a composição antigênica de SAH, SAB e SAE, respectivamente. Não temos informações se esses motivos são idênticos entre si ou se apenas existe similaridade estrutural entre eles e, por esta razão os anticorpos capazes de reagir cruzadamente com esses motivos serão designados por anti-C(H), anti-C(B) e anti-C(E), quando provenientes dos imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE, respectivamente. Admitindo-se a identidade dos motivos C(H), C(B) e C(E) admitir-se-ia necessariamente que as reações de qualquer um desses motivos com os anticorpos anti-C(H), anti-C(B) e anti-C(E) teriam idênticas características. O encontro de diferenças entre essas reações permitiria pressupor a existência de diferenças estruturais entre aqueles motivos antigênicos.

Com o fito de investigar a existência de possíveis diferenças nessas reações, foram estudadas comparativamente as reações da SAE nativa e da desnaturada com os imune-sôros anti-SAE, anti-SAB e anti-SAH não purificados.

1.2.1. Preparação da SAE desnaturada.

A sôro-albumina equina foi submetida às seguintes condições: 100 mg de SAE foram dissolvidas em 10 ml de tampão acetato-HCl, pH 3,5, 0,1 M, contendo 0,8 mM de cisteína. Duas gotas de cloroformio foram adicionadas à mistura, que foi incubada a 37°C durante 15 dias. Após incubação, a mistura foi dialisada contra 100 ml de água destilada, durante 24 horas e a seguir contra 1 litro de solução salina fisiológica. O conteúdo final do saco de diálise foi rotulado SAE Dn. A água

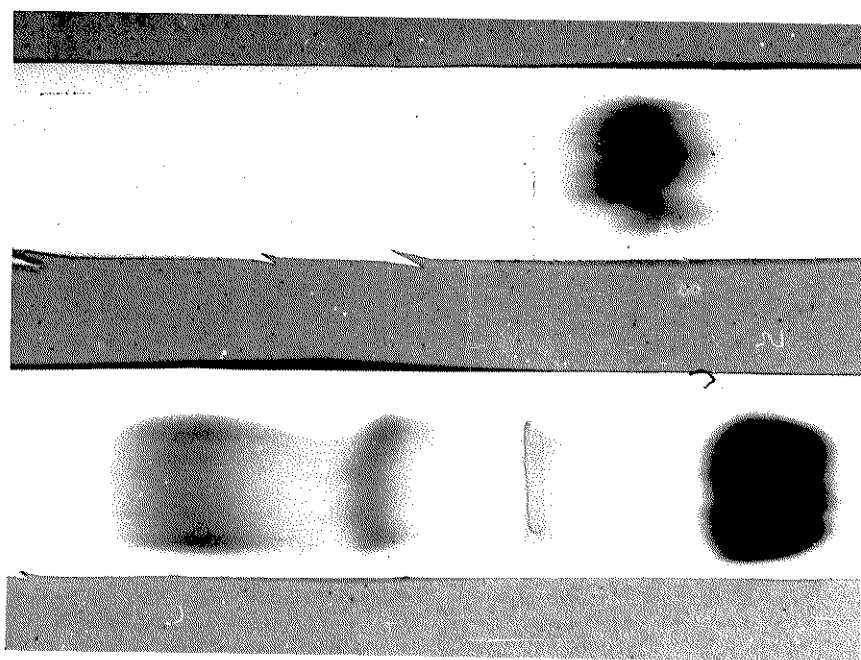


Fig. 3 Eletroforese da SAE-Dn (faixa superior) e de sôro normal de cavalo (faixa inferior) em papel de acetato de celulose (Oxoid).

de diálise foi liofilizada, o resíduo dissolvido em 5 ml de água destilada foi dessalificado e secado em vácuo. O resíduo, dissolvido em 5 ml de HCl 6N foi transferido para ampolas que foram seladas no vácuo e submetidas a 108°C por 18 horas. O conteúdo destas ampolas, após secagem no vácuo, a 40°C foi examinado por cromatografia de papel, usando-se butanol ácido acético água (4:1:4) como solvente. Constatou-se apenas a presença de ácido cisteico ou cisteína. A pesquisa de amino-ácidos portadores do grupo NH_2 terminal revelou tanto na SAE - Dn quanto na SAE nativa apenas a presença de 0,8 ml de DNP-ácido aspartico por mol de antígeno.

1.2.2. Eletroforese da SAE Dn.

Submetida à análise eletroforética, em papel acetato

de celulose, tampão veronal pH 8,6, 0,005 M, a SAE-Dn mostrou-se constituída de um único componente, de mobilidade correspondente a uma alfa globulina. (Fig. 3).

1.2.3. Reações de precipitação.

As reações de precipitação entre SAE-Dn e os sôros anti-SAE, anti-SAB e anti-SAH foram seguidas pelas técnicas de HEIDELBERGER e KENDALL pela imunodifusão em gel de agar.

Os resultados obtidos pela técnica quantitativa com um dos sôros anti-SAE examinados são mostrados na tabela VI. Pode-se observar nesta tabela que SAE-Dn foi capaz de remover todos os anticorpos dos sôros anti-SAE, inclusive aqueles responsáveis pela reação cruzada com SAB e SAH (anti-C(B)). O teste dos sobrenadantes mostrou outrossim que SAE-Dn era na realidade u'a mistura de antígenos, porquanto houve interpene tração das zonas de excesso de antígeno e de excesso de anticorpo.

Os resultados obtidos por imunodifusão mostram (Fig⁴) que SAE continha pelo menos dois componentes antigênicos que precipitavam com os sôros anti-SAE e que não precipitavam com os sôros anti-SAB e anti-SAH. Não se observou precipitação com os sôros anti-SAB e anti-SAH testados. Misturas em várias proporções desses sôros com a SAE-Dn continuavam a precipitar com SAE nativa, indicando não ter havido combinação apreciável entre SAE-Dn e os anticorpos anti-C(B) e anti-C(H).

Os dados experimentais apresentados indicam que o motivo antigênico C(E) estava presente na SAE-Dn porquanto este antígeno foi capaz de remover todos os anticorpos dos sôros anti-SAE, inclusive a fração responsável pelas reações cruzadas com SAB e com SAH. Este motivo, contudo, se encontra alterado pela desnaturação ou existe em apenas um certo número de moléculas de SAE-Dn, pois foi necessário empregar-se u-

TABELA VI

Resultados quantitativos das reações de precipitação entre um soro anti-SAE (nº52) e a SAE nativa ou a SAE-Dn.

Anti- geno (mg)	proteínas totais precipita- das	proteína de anti- corpo precipita- do	relação A/Ag	Teste do sobrenadante com:				
				SAE	SAE-Dn	SAB	SAH	Soro an- ti-SAE
SAE nativo	mg	mg						
0,025	0,51	0,48	19,4	+	+	+	-	-
0,050	0,88	0,83	16,6	+	+	-	-	-
0,100	1,58	1,48	14,8	+	+	-	-	-
0,150	1,95	1,80	12,0	+	-	-	-	-
0,200	2,32	2,12	10,6	+	-	-	-	-
0,300	2,56	-		-	-	-	-	-
0,400	2,46	-		-	-	-	-	+
0,600	1,58	-		-	-	-	-	+
1,000	0,37			-	-	-	-	+
SAE-Dn								
0,025	0,23	0,20	8,2	+	+	-	+	-
0,050	0,42	0,27	7,4	+	+	+	+	-
0,100	0,79	0,69	6,9	+	+	+	+	-
0,150	1,07	0,92	6,1	+	+	-	-	-
0,200	1,35	1,15	5,7	+	+	-	-	-
0,300	1,63	1,33	4,4	+	-	-	-	-
0,400	1,81	1,41	3,5	+	-	-	-	+
0,600	2,10	1,50	2,5	+	-	-	-	+
1,000	1,27	-		-	-	-	-	+

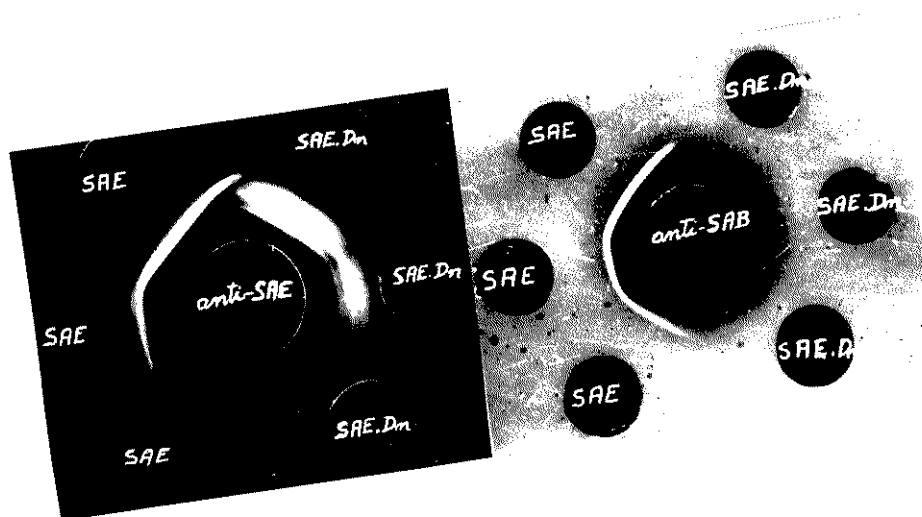


Fig. 4 Reações de precipitação de SAE nativa e SAE-Dn com os sôros anti-SAE e anti-SAB.

ma quantidade dêsse antígeno cêrca de 3 a 4 vezes maior do que a de SAE nativa para efetuar-se a remoção completa dêsses anticorpos. Êsse motivo apesar de subsistir em SAE-Dn, aparentemente foi incapaz de combinar-se com os anticorpos anti-C(B) e anti-C(H). De fato, SAE-Dn foi incapaz de precipitar com os sôros anti-SAB e anti-SAH, bem como de inibir a precipitação de SAE nativa por êstes sôros.

Estas observações sugerem que a reação C(E) x anti-C(E) difere das reações C(E) x anti-C(B) e C(E) x anti-C(H), fundamentando a hipótese segundo a qual os motivos C(E), C(B) e C(H) não são idênticos. Esta hipótese deve ser aceita com reservas, pois a despeito de SAE-Dn possuir apenas um único resíduo NH_2 terminal e da análise da água de diálise haver demonstrado não ter havido liberação de peptideos ou de amino-ácidos durante a desnaturação, a análise imunológica revelou a complexidade dêsse antígeno, evidenciando a presença de pelo

menos dois componentes antigenicamente diferentes. A natureza desses componentes é discutível. A inexistência de outro amino-ácido NH_2 terminal, além de 1 mol de ácido aspártico por mol de albumina, poderia permitir a interpretação de que tais componentes representassem peptídeos cíclicos. A presença de tais péptidos, contudo, assinalada por REICHMANN e COLVIN (152) nas albuminas bovina e humana, não foi confirmada por HUNTER e MC DUFFIE (153). Os dados existentes na literatura permitem supor que tais componentes representem diferentes formas de alteração da estrutura tridimensional da albumina. Em torno de pH 3,5 as albuminas sofrem transformações do tipo N-F, reversíveis (154), sendo que a forma F pode sofrer alterações irreversíveis devidas a reações várias, dentre as quais têm sido acentuadas as reações de dupla troca entre grupos dissulfeto (155). Em condições similares às usadas nas nossas experiências ocorrem polimerizações da molécula da albumina humana (156), provavelmente devidas a mecanismos semelhantes.

A heterogeneidade antigênica de SAE-Dn e, nas experiências com os sôros anti-SAE, a presença perturbadora de anticorpos dirigidos contra os motivos antigênicos próprios de SAE - podendo levar a fenômenos de co-precipitação dos anticorpos anti-C(E) - representam uma dificuldade importante à interpretação das experiências apresentadas. Em consequência, a hipótese, sugerida, da não identidade dos motivos antigênicos C(E), C(B) e C(H) deve ser controlada por experiências que visem demonstrar que os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas, isolados, reagem diferentemente com os antígenos homólogos e heterólogos não desnaturados.

1.3. REAÇÕES ENTRE AS SÔROALBUMINAS E OS ANTICORPOS ISOLADOS RESPONSÁVEIS PELAS REAÇÕES CRUZADAS:

Os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas foram especificamente isolados dos sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE, conforme indicado em Material e Métodos. Os anticor

pos isolados, purificados em coluna de Sephadex G 200, examinados à ultracentrifugação analítica, apresentavam um único pico de constante de sedimentação igual à 6,6S (Fig.5). À imuno-eletroforese essas soluções apresentavam apenas um único componente com mobilidade eletroforética correspondente a IgG (Fig.6).

1.3.1. Reações de precipitação em meio líquido.

As soluções de anticorpos purificados foram testadas contra os antígenos homólogo e heterólogo. Foram estudadas pela técnica quantitativa de HEIDELBERGER e KENDALL.

Em todos os casos estudados os anticorpos purificados comportaram-se conforme os esquemas da fig. 7. Cerca de 90 a 100 % das proteínas totais das soluções desses anticorpos eram precipitáveis, na equivalência, pelo antígeno homólogo ou pelo antígeno heterólogo utilizado para o isolamento específico desses anticorpos. O outro antígeno heterólogo - conforme o esperado - precipitava cerca de 10 a 30 % menos proteína de anticorpo e era incapaz de remover todos os anticorpos. A análise dos sobrenadantes demonstrou que todos os anticorpos presentes podiam ser removidos pela precipitação, na equivalência com o antígeno homólogo ou com o antígeno heterólogo que foi utilizado para o isolamento dos anticorpos.

1.3.2. Reações de precipitação em meio gelificado.

As reações de precipitação entre os anticorpos purificados e os antígenos homólogos ou heterólogos foram estudadas pela técnica de imunodifusão em gel de agar.

Os resultados obtidos acham-se esquematizados na figura 8. Em todos os casos examinados observou-se que a linha correspondente à reação do antígeno homólogo se prolongava para

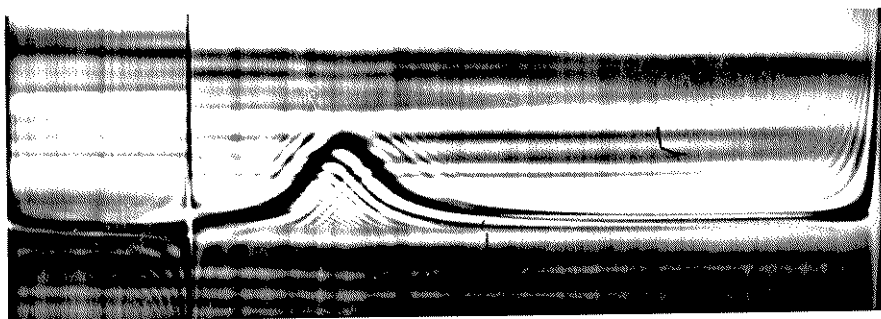


Fig. 5 - Aspecto à ultracentrifugação analítica de uma solução a 5% de anticórpors responsáveis pela reação cruzada anti-SAB x SAE. Fotografia tomada 40 minutos depois que a velocidade de 35.000 r.p.m. foi atingida. Diluente: NaCl 0,15M tampão com tampão fosfato 0,005M pH 7,4

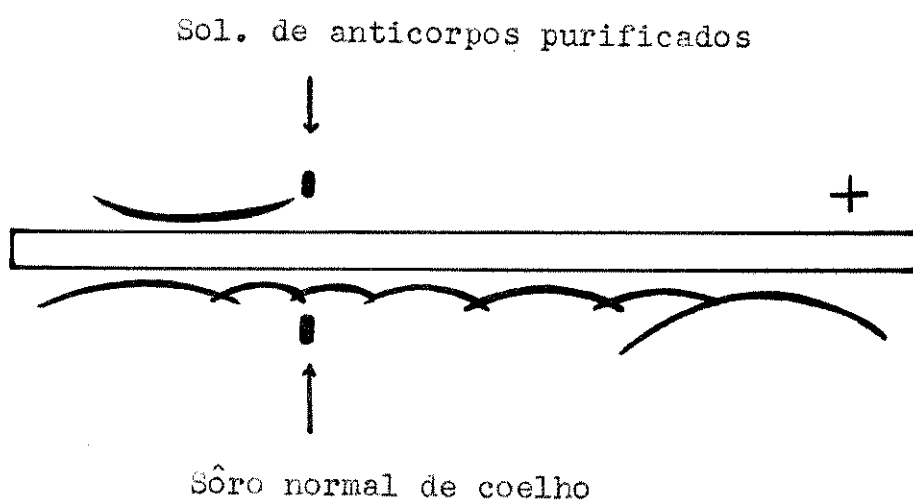


Fig. 6 - Esquema dos resultados observados à imunoelctroforese da solução de anticorpos responsáveis pela reação cruzada anti-SAB x SAE. Gel de agar 1%. Tampão veronal pH 8,4; 0,005M 5v/cm² -90 minutos. Na goteira central foi utilizado sôro de cavalo anti-sôro total de coelho.

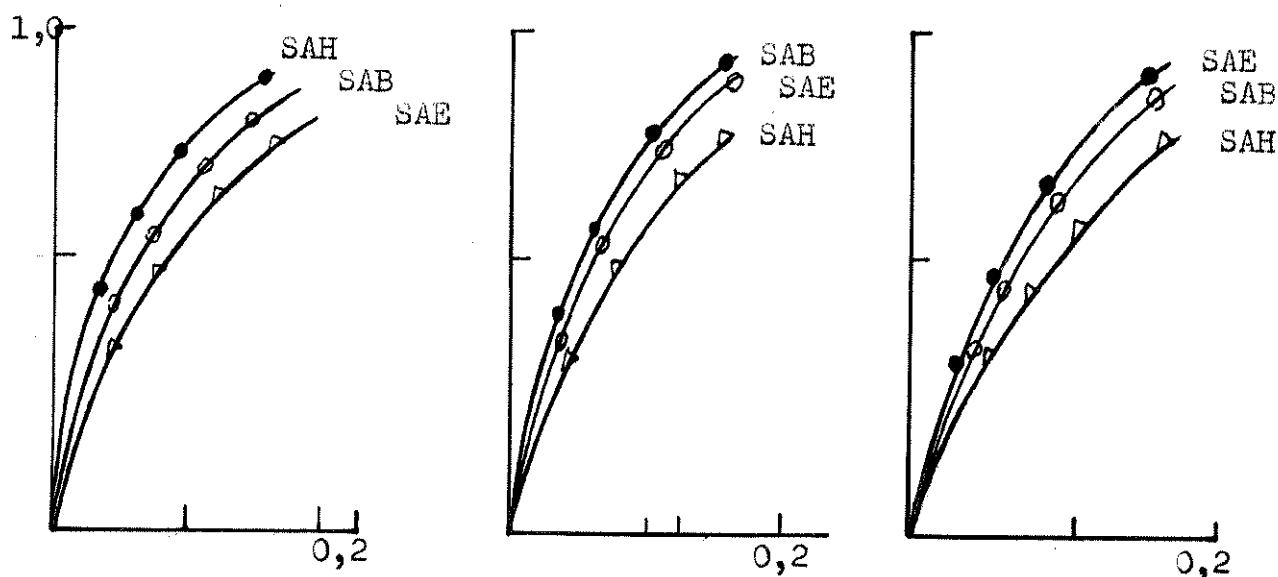


Fig. 7 - Reação de precipitação quantitativa entre os anticorpos purificados (1 mg prot/ml) e os antígenos homólogos (●=●), o antígeno heterólogo utilizado para o isolamento desses anticorpos (o-o) e o outro antígeno heterólogo (Δ-Δ)

- A - Anticorpos isolados a partir de sôros anti-SAH utilizando-se imunoabsorvente contendo SAB.
- B - Anticorpos isolados a partir de uma mistura de sôros anti SAB utilizando-se imunoabsorventes contendo SAE.
- C - Anticorpos isolados a partir de uma mistura de sôros anti SAE utilizando-se imunoabsorventes contendo SAB.

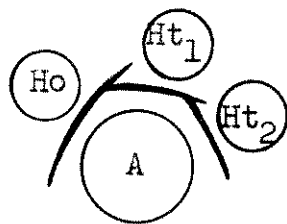


Fig.8 - Esquema dos resultados das reações de precipitação em gel de agar entre os anticorpos especificamente purificados (A) e o antígeno homólogo (Ho), o antígeno heterólogo utilizado para o isolamento dos anticorpos (Ht₁) e o segundo antígeno heterólogo (Ht₂).

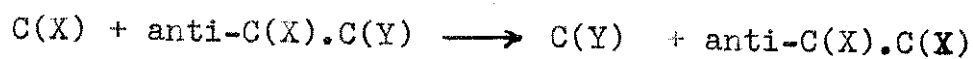
além do ponto de encontro com a linha de precipitação correspondente à reação do antígeno heterólogo. A interpretação clássica da figura observada postula a presença de pelo menos dois anticorpos de especificidade diferentes: um específico para determinantes comuns a ambos os antígenos e outro específico para determinantes exclusivos ao antígeno homólogo. No caso presente tal explicação não se ajusta aos fatos porquanto as experiências em meio líquido demonstraram que o antígeno heterólogo removeu completamente todos os anticorpos presentes.

O fato do prolongamento situar-se numa zona onde existem complexos solúveis do antígeno heterólogo com os anticorpos purificados sugere que tais complexos podem precipitar em presença do antígeno homólogo.

1.3.3. Reações de precipitação entre o antígeno homólogo e o complexo solúvel formado entre o antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pela reação cruzada.

Complexos solúveis formados entre os antígenos heterólogos e cada um dos imune-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE foram preparados, conforme indicado em Material e Métodos, e testados em experiências de dupla difusão com os antígenos homólogos e heterólogos.

Os resultados encontrados, esquematizados na fig. 9, indicam que tais complexos precipitam especificamente com o antígeno homólogo, sugerindo a existência de reações do tipo:



onde $\text{anti-}C(X).C(Y)$ simboliza o complexo formado entre os anticorpos responsáveis pela reação cruzada e o antígeno heterólogo $C(Y)$.

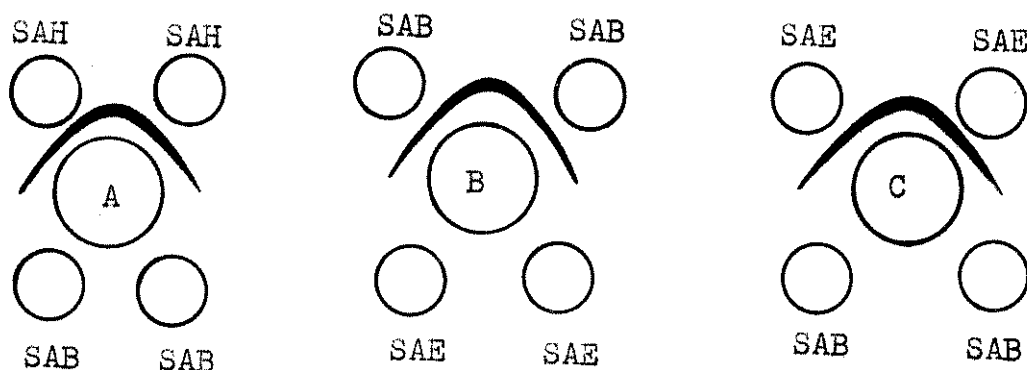


Fig. 9 - Esquema dos resultados das reações de precipitação entre os antígenos homólogos e o complexo solúvel (C.S) formado entre o antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pela reação cruzada.

- A- CS formado entre SAB e anticorpos dos sôros anti-SAH
 - B- CS formado entre SAE e anticorpos dos sôros anti-SAB
 - C- CS formado entre SAB e anticorpos dos sôros anti-SAE
-

A aceitação de tal hipótese implicaria na aceitação da existência de avidez maior dos anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas pelos antígenos homólogos do que pelo heterólogo e, conseqüentemente, que os motivos antigênicos comuns às albuminas em estudo não são idênticos.

Afim de verificar tal hipótese foram realizadas as experiências abaixo descritas.

1.3.4. Reações entre complexos solúveis e os antígenos homólogos ou heterólogos.

Complexos solúveis, preparados com antígeno marcado ou não com iodo radioativo, foram preparados conforme indicado em Material e Métodos, e a seguir foram diluídos de modo a se obter 2,4 ugNAc/ml. Quantidades crescentes de antígeno

homólogo ou heterólogo, marcado ou não com I^{131} , foram adicionados a porções de 1 ml de complexo solúvel diluído e o volume completado a 2,5 ml com tampão SNC. As misturas foram incubadas a 37°C, durante uma hora e posteriormente durante 18 horas na geladeira. Após incubação adicionava-se a cada mistura 2,5 ml de uma solução saturada de sulfato de amônio, previamente ajustada a pH 7,2 com hidróxido de sódio e resfriada a 0°C. As misturas foram deixadas em repouso, em banho de gelo, durante 30 minutos e, a seguir, o precipitado formado foi separado por centrifugação a 0°C, 500 G durante 30 minutos. Os precipitados foram lavados três vezes com solução tamponada de sulfato de amônio a 50 % de saturação, dissolvidos com algumas gotas de NaOH 1N e o volume ajustado para 2,5 ml com água destilada. A radioatividade dos sobrenadantes e dos precipitados foi determinada em porções de 2 ml. O antígeno, especificamente combinado ao anticorpo, foi calculado subtraindo-se os valores achados para o controle apropriado (contendo apenas ou antígeno marcado ou C.S. marcado) dos valores achados para o tubo contendo as misturas reagentes (antígeno mais complexo solúvel).

A fig. 10 mostra os resultados obtidos quando quantidades crescentes de antígeno homólogo ou heterólogo não marcados foram adicionadas a complexos solúveis formados entre SAE marcada (I*SAE) e os anticorpos responsáveis pela reação cruzada presente nos sêros anti-SAB. Pode-se ver que quantidades crescentes de I*SAE são encontradas no sobrenadante à medida que aumenta a quantidade de antígeno não marcado adicionada ao sistema. Esses dados indicam que a I*SAE combinada ao anticorpo é gradualmente substituída pelo antígeno homólogo ou heterólogo não marcados. Contudo essa substituição realizou-se em proporções diferentes, quando se tratava do antígeno homólogo ou do heterólogo. Pode-se verificar no exemplo da fig. 10 que para efetuar uma substituição de 50 % da I*SAE combinada necessitou-se de cerca de 10 vezes menos do antígeno homólogo, (SAB) do que do heterólogo (SAE).

Resultados basicamente idênticos foram obtidos adicionando-se antígenos marcados a complexos solúveis não marcados (Fig.11). Observou-se uma substituição gradual do antígeno combinado pelo antígeno marcado adicionado ao sistema. Esta substituição realizou-se igualmente em níveis diferentes para os antígenos homólogo e heterólogo.

As experiências acima indicam que o antígeno homólogo substitue o antígeno heterólogo combinado aos anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas. Afim de obter informações sobre se o antígeno homólogo poderia ser deslocado pelo antígeno heterólogo, foram realizadas as experiências abaixo indicadas.

Os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas com SAE foram especificamente isolados a partir dos sôros anti-SAB e purificados conforme indicado em Material e Métodos. Complexos solúveis formados entre SAB e êsses anticorpos isolados foram preparados e ensaiados em experiências semelhantes à relatada acima com os antígenos homólogos e heterólogos.

Os resultados obtidos (Fig.12) mostram que, dentro das condições experimentais usadas, o antígeno heterólogo não desloca o antígeno homólogo.

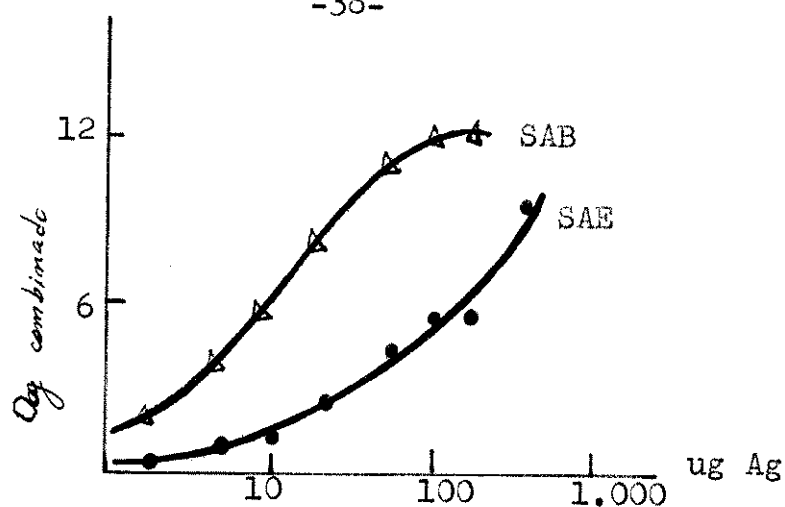


Fig. 10 - Reação entre o complexo solúvel I*SAE - anti-SAB e SAB ou SAE.

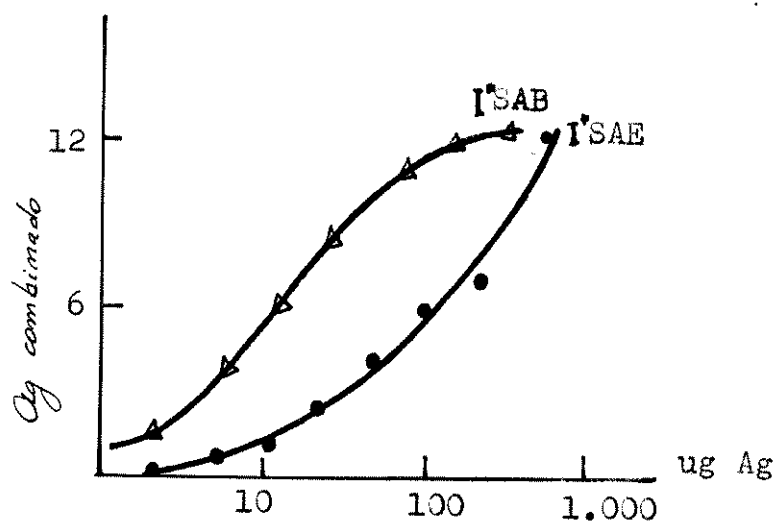


Fig. 11 - Reação entre o complexo SAE anti-SAB e I*SAB ou I*SAE

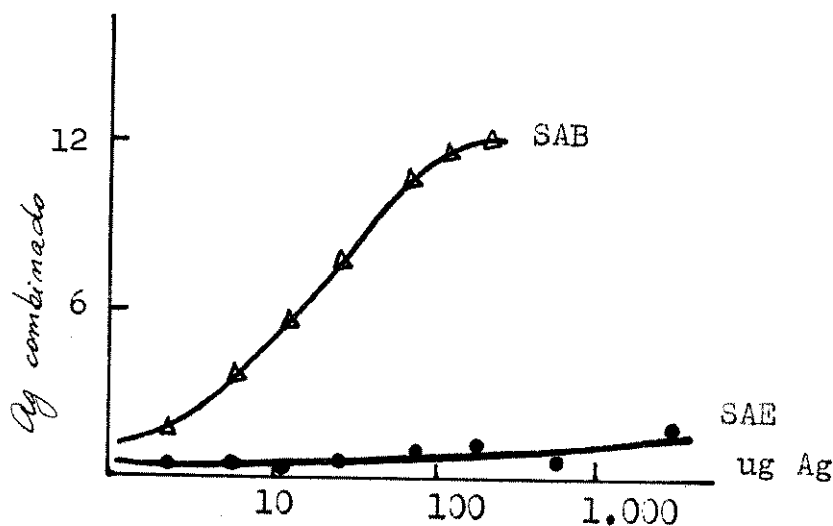


Fig. 12 - Reação do complexo solúvel formado entre I*SAB e os anticorpos especificamente purificados, com SAB ou SAE.

2. ESTUDO DA REAÇÃO CRUZADA ENTRE SAH, SAB E SAE COM O AUXÍLIO DE FRAGMENTOS DA MOLÉCULA DE SAH.

Os resultados apresentados nos itens anteriores indicam a existência de um motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE e os resultados obtidos no estudo das reações cruzadas entre SAB e SAE (112) sugerem que muito provavelmente esse motivo antigênico comum é constituído por vários determinantes diferentes entre si. Por conseguinte, afim de obter informações sobre as estruturas envolvidas nas reações cruzadas, torna-se imperativo: a) o isolamento de fragmentos contendo um único determinante comum a essas albuminas; b) o isolamento do anticorpo específico desse determinante.

As experiências abaixo indicadas foram orientadas no sentido de verificar se as estruturas presentes em fragmentos obtidos pela degradação enzimática da SAH fariam parte do motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE e se, com o auxílio desses fragmentos, seria possível isolar um anticorpo específico de um único determinante comum a essas albuminas.

2.1. Estudo de reação cruzada entre SAH, SAB e SAE com auxílio do fragmento IH da SAH.

A degradação da SAH pela catepsina D de coelho dá lugar à liberação de um fragmento designado Inibidor (fragmento IH), de peso molecular igual a 11.000 (108).

As experiências relatadas a seguir foram conduzidas com o fito de verificar se os determinantes presentes nesses fragmentos estariam envolvidos nas reações cruzadas entre SAH, SAB e SAE.

2.1.1. Reações do fragmento IH com os sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE e com os anticorpos anti-C(B).

O fragmento IH foi preparado conforme indicado em Material e Métodos. Os resultados da análise da composição de amino-ácidos deste fragmento foram idênticos aos indicados por LAPRESLE e WEBB (157). As reações do fragmento IH com os sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE e com os anticorpos anti-C(B) foram estudadas pelas técnicas de difusão em gel, de fixação do complemento e de hemaglutinação passiva com hematias taninizadas. Os anticorpos anti-C(B) foram obtidos como indicado, a partir dos sôros anti-SAB, através o uso de imuno-absorventes contendo SAE.

Os resultados obtidos indicaram que o inibidor não precipita nem fixa o complemento quando misturado, em proporções variáveis, com os sôros anti-SAE, anti-SAB e anti-SAE e com os anticorpos anti-C(B). Contudo êsses sôros e anticorpos foram capazes de hemaglutinar hematias sensibilizadas com o fragmento IH (Tabela VII). O fragmento IH é capaz de inibir parcialmente a reação de hemaglutinação entre os anticorpos anti-C(B) e hematias sensibilizadas com SAB (Tabela VIII).

Os resultados apresentados sugerem que o fragmento IH contém uma parcela dos determinantes comuns aos motivos C(H), C(B) e C(E). Afim de verificar tal hipótese, os anticorpos dos sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE capazes de reagir com o fragmento IH foram especificamente isolados e ensaiados com as albuminas sob investigação.

2.1.2. Isolamento e propriedades dos anticorpos que reagem com o fragmento IH.

O imunoabsorvente, constituído pelo fragmento IH conjugado à para aminobenzilcelulose, foi preparado conforme indicado em Material e Métodos. Êste imunoabsorvente foi utilizado para o isolamento dos anticorpos capazes de reagir com o fragmento IH. Os anticorpos serão designados anti-IH(H), anti-IH(B) e anti-IH(E) quando provenientes dos sôros anti-SAH, an

TABELA VII

Resultados das reações de hemaglutinação entre hematias sensibilizadas com o fragmento IH e os sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE e com os anticorpos anti-C(B). Título expresso pelo inverso da diluição mais alta capaz de hemaglutinar.

Sôro	Título
Anti-SAH nº 8	12.800
Anti-SAH nº 9	12.800
Anti-SAH nº 10	6.400
Anti-SAB nº 9	6.400
Anti-SAB nº 10	6.400
Anti-SAB nº 11	400
Anti-SAE nº 13	100
Anti-SAE nº 25	200
Anti-SAE nº 28	100
Anti-C(B) (1 mg prot/ml)	12.800

TABELA VIII

Inibição pelo fragmento IH da reação de hemaglutinação entre anti-C(B) e hematias sensibilizadas com SAB.

ug fragmento IH	Inverso da diluição sôro anti-C(B)							C.H.*
	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	
0	+	+	+	+	+	+	0	0
10	+	+	+	+	+	0	0	0
20	+	+	+	+	+	0	0	0
40	+	+	+	+	+	0	0	0
80	+	+	+	+	+	0	0	0
160	+	+	+	+	+	0	0	0
Contrôle das hematias não sensibilizadas	0	0	0	0	0	0	0	0

* Contrôles de hematias sensibilizadas pelo fragmento IH.

ti-SAB e anti-SAE, respectivamente. Os resultados relatados a seguir referem-se à fração IgG dêsses anticorpos, isolada por cromatografia em Sephadex G-200.

Nenhuma reação de precipitação ou de absorção do complemento pôde ser observada entre os anticorpos isolados e a SAH, SAB ou SAE ou o fragmento IH. No entanto, como pode ser verificado na tabela IX, os anticorpos isolados, qualquer que fosse a sua proveniência, hemaglutinaram hematias sensibilizadas com qualquer dêstes antígenos. A comparação dos títulos observados com soluções de anticorpos contendo idêntica concentração de proteínas totais evidencia que o título obtido varia com a proveniência do anticorpo e com o antígeno sensibilizando a hematia. Para os anticorpos anti-IH(H) e anti-IH(B) os títulos mais altos foram observados com SAB e SAH e os mais baixos com SAE e IH. Para os anticorpos anti-IH(E) os títulos mais altos foram obtidos com SAE e os mais baixos com SAH, SAB e IH.

TABELA IX

Resultados das reações de hemaglutinação entre os anticorpos isolados e hematias sensibilizadas com SAH, SAB, SAE ou IH. Títulos expressos pelo inverso da diluição.

Anticorpos (3,0 mg proteínas totais/ml)	Hematias sensibilizadas com:			
	SAH	SAB	SAE	IH
anti-IH(H)	64.000	32.000	4.000	8.000
anti-IH(B)	32.000	32.000	4.000	4.000
anti-IH(E)	8.000	8.000	32.000	4.000

2.1.3. Provas de absorção.

Afim de obter informações sôbre a especificidade dos anticorpos isolados foram realizadas provas cruzadas de absorção. O antígeno (SAH, SAB ou SAE) foi conjugado a hemáticas de carneiro, através o uso da benzidina bis-diazotada, nas condições descritas por RANGEL e REPKA (116) e por RANGEL e PERINI (119). As hemáticas sensibilizadas eram centrifugadas (500 G, 15m a 10°C) e 0,1 ml do sedimento obtido era adicionado a 1,0 ml de uma solução de anticorpos isolados (3,0 mg de proteínas totais/ml). Após agitação a mistura era incubada a 37°C durante uma hora e em seguida a 0°C durante 30 minutos e centrifugada. O sobrenadante era ensaiado, pela técnica de BORDUAS e GRABAR, contra hemáticas sensibilizadas com SAH, SAB ou SAE.

Os resultados obtidos nessas experiências acham-se apresentados na tabela X. Pode-se verificar nessa tabela que os anticorpos isolados não foram removidos completamente durante a 1ª absorção senão pelo antígeno homólogo. Nessas condições os antígenos heterólogos removeram apenas parcialmente êsses anticorpos. Após três absorções consecutivas, nas condições descritas, os antígenos heterólogos removeram completamente os anticorpos isolados.

Os dados apresentados sugerem que existem diferenças entre a reação homóloga e as reações heterólogas dos anticorpos anti-IH. Nas reações cruzadas apenas uma determinada proporção dêsses anticorpos estaria combinada ao antígeno, enquanto que na reação homóloga praticamente a totalidade dos anticorpos presentes estaria combinada. Esta interpretação implicaria na existência de diferentes constantes de equilíbrio para reações homólogas e para heterólogas. Se essa interpretação, for verídica as reações dêsses anticorpos com o antígeno homólogo só poderá ser inibida por concentrações relativamente altas do antígeno heterólogo.

TABELA X

Resultados das provas de absorção dos anticorpos isolados por SAH, SAB ou SAE. Títulos- expressos pelo inverso da diluição- observados nas reações de hemaglutinação passiva entre os anticorpos isolados e hemátias sensibilizadas com SAH, SAB ou SAE ou fragmento IH.

Anticorpos (concentração inicial: 3 mg prot.totais /ml)	Títulos obtidos com hemátias sensibi- lizadas com:			
	SAH	SAB	SAE	IH
Anti-IH(H)				
a) antes da absorção	64.000	32.000	4.000	8.000
b) após a absorção com SAH	0	0	0	0
c) após a absorção com SAB	400	400	400	400
d) após a absorção com SAE	1.600	1.600	1.600	800
e) após 3 absorções com SAB ou com SAE	0	0	0	0
Anti-IH(B)				
a) antes da absorção	32.000	32.000	4.000	4.000
b) após a absorção com SAH	400	400	400	400
c) após a absorção com SAB	0	0	0	0
d) após a absorção com SAE	1.600	1.600	1.600	800
e) após 3 absorções com SAB ou SAE	0	0	0	0
Anti-IH(E)				
a) antes da absorção	28.000	8.000	32.000	4.000
b) após a absorção com SAH	800	800	1.600	800
c) após a absorção com SAB	800	1.600	1.600	400
d) após absorção com SAE	0	0	0	0
e) após 3 absorções com SAH ou com SAB	0	0	0	0

Nota: os títulos expressos como 0 indicam ausência de hema-
glutinação nas reações do anticorpo diluído a 1/50.

2.1.4 Reações de inibição da hemaglutinação.

As reações de inibição da hemaglutinação foram realizadas, conforme indicações de BORDUAS e GRABAR (133), utilizando-se as soluções de anticorpos isolados acima ensaiadas. Aliquotas de 0,25 ml dessas soluções diluídas a 1/500 foram misturadas a 0,25 ml de diluições crescentes de antígeno e incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. A seguir adicionava-se a cada uma das misturas 0,05 ml de suspensão de hematias sensibilizadas com um dos antígenos.

A inspeção da tabela XI, onde são apresentados os resultados da inibição por SAH, SAB ou SAE das reações de hemaglutinação entre os anticorpos anti-IH(B) e os vários antígenos em estudo, mostra que as reações entre estes anticorpos e qualquer um dos antígenos (SAH, SAB, SAE ou IH) foram igualmente inibidos por 12,5ug de SAB (antígeno homólogo). No entanto uma quantidade de 32 vezes maior de qualquer dos antígenos heterólogos (SAE ou SAH) foi incapaz de inibir a reação desses anticorpos com o antígeno homólogo. Resultados basicamente idênticos foram obtidos nas experiências em que os anticorpos anti-IH(H) e anti-IH(E) foram utilizados: as reações homólogas ou heterólogas foram inibidas por 12,5 ug de antígeno no homólogo mas as reações homólogas não foram inibidas por uma concentração 32 vezes maior dos antígenos heterólogos.

Os dados obtidos nessas experiências fornecem argumentos em apoio da interpretação dada aos resultados anteriores (2.1.3), favorecendo a hipótese de que os determinantes de SAH, SAB e SAE envolvidos nas reações com os anticorpos isolados não são idênticos. O fragmento IH contém dois dos determinantes da SAH (108) de modo que é altamente provável que anticorpos pertencentes a dois diferentes grupos de especificidade estejam envolvidos nas reações entre os anticorpos isolados e as albuminas em estudo.

TABELA XI

Inibição, pelos antígenos homólogo ou heterólogos, da reação de hemaglutinação entre anticorpos anti-IH(B) e hemátias sensibilizadas com SAH, SAB ou SAE. Resultados expressos pela menor quantidade (ug) de antígeno capaz de inibir completamente a reação.

Antígeno	Hemátias sensibilizadas com:		
	SAH	SAB	SAE
SAH	100	400	100
SAB	12,5	12,5	12,5
SAE	100	400	50
Fragmento IH	100	400	25

2.2.1. Reações do fragmento F_1 com anticorpos presentes nos sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE.

O fragmento IH foi submetido à ação da tripsina e o fragmento F_1 foi isolado desses digestos de acordo com as indicações de LAPRESLE E WEBB (109). As reações do fragmento F_1 com os sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE e com os antieorpos isolados destes sôros através o uso do fragmento IH foram estudadas pelas técnicas de imuno-difusão, fixação do complemento e hemaglutinação passiva com hemátias taninizadas e sensibilizadas com SAH, SAB ou SAE.

Nenhuma reação de precipitação ou de fixação do complemento pôde ser observada entre o fragmento F_1 e os sôros anti-SAH, anti-SAB ou anti-SAE ou os anticorpos isolados. Igualmente não foi possível observar-se a reação de hemaglutinação entre esses anticorpos e hemátias sensibilizadas com o fragmento F_1 . Aparentemente esse fragmento não se adsorve à superfície de hemátias taninizadas.

O fragmento IH é capaz de inibir parcialmente as reações cruzadas entre os anticorpos isolados anti-IH(B) e hemátias sensibilizadas com SAH ou com SAE (Tabela XII).

Êsses dados permitem concluir que o fragmento F_1 contém apenas uma parcela dos determinantes envolvidos nas reações dos anticorpos isolados com SAH, SAB ou SAE.

TABELA XII

Inibição pelo fragmento F_1 da reação de hemaglutinação entre anticorpos anti-IH(B) e hemátias sensibilizadas com SAH ou com SAE.

Quantidade de F_1 (ug)	Quantidades mínimas de anti-IH capaz de reagir com:	
	SAH	SAE
0	0,2	1,6
5	0,8	6,4
10	1,6	12,8
20	3,2	25,6
40	6,4	25,6
80	6,4	25,6
160	6,4	25,6

2.2.2 Isolamento e propriedades dos anticorpos que reagem com o fragmento F_1 .

Os anticorpos dos sôros anti-SAB capazes de reagir com o fragmento F_1 foram isolados através o uso do imunoabsorvente constituído por êste fragmento conjugado à para-amino - benzil-celulose, nas condições indicadas em Material e Métodos. Os anticorpos isolados - designados anti- F_1 (B) - eram constituídos por imunoglobulinas da classe IgG (Fig.).

Os anticorpos anti-F₁ (B) não precipitaram e não fixaram complemento quando misturados em proporções variáveis com SAH, SAB, SAE ou IH. Contudo êsses anticorpos hemaglutinaram hemátias sensibilizadas com êsses antígenos (Tabela XIII).

TABELA XIII

Reações de hemaglutinação passiva entre anticorpos anti-F₁ (B) e hemátias sensibilizadas com SAH, SAB, SAE ou IH.

Anticorpo	SAH	SAB	SAE	IH
Anti-F ₁ (B) 3 mg/ml	25.600	51.200	6.400	6.400

Os títulos observados variaram conforme o antígeno utilizado na reação. No entanto, êsses anticorpos puderam ser completamente removidos após 3 absorções consecutivas com SAH, SAB ou SAE conjugadas a hemátias, nas condições descritas em parágrafo anterior (2.1.3), indicando que a especificidade desses anticorpos é comum às albuminas em estudo.

O complexo formado entre SAB e os anticorpos anti-F₁ (B) foram estudados por ultracentrifugação analítica. Uma solução do anti-F₁ (B) (10 mg/ml em NaCl 0,15 M tamponado com fosfatos 0,005 M pH 7,4) foi misturada em partes iguais com uma solução de SAB (1,8 mg/ml) no mesmo diluente. A mistura, incubada a 37°C durante uma hora e a seguir na geladeira por 24 horas, foi analisada em célula setorial simples a 52.640 rpm. A análise dos resultados obtidos revelou nessas misturas a presença de dois componentes: um com constante de sedimentação igual a 6,6S - correspondente a IgG livre - e outro com constante de sedimentação igual a 7,7S. A semi-área do 1º componente correspondeu a 0,7 da semi-área do único componente

observável na solução (5 mg/ml) de anticorpo anti- F_1 (B). Dêste modo pode-se concluir que 3,5 mg de anti- F_1 (B) encontrava-se em estado livre na mistura examinada. Como nessa mistura não se evidenciou a presença de Ag livre pode-se admitir que todo o antígeno (0,8 mg) encontrava-se combinado a 1,5 mg de anticorpo, constituindo o componente de constante de sedimentação igual a 7,7S. Este componente representaria por conseguinte o complexo de fórmula A.Ag, indicando assim que mesmo em excesso de anticorpo apenas um único determinante estava envolvido nas reações entre SAB e anti- F_1 (B).

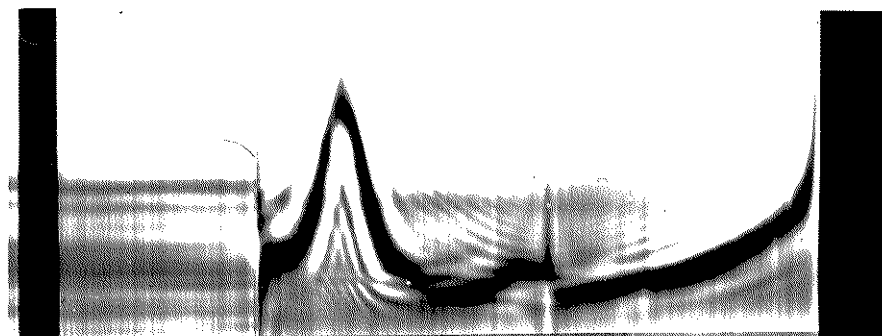


Fig. 13 - Aspecto à ultracentrifugação analítica de uma solução a 3 % de anticorpos anti- F_1 (B). Fotografia tomada após 30 minutos decorridos desde que a velocidade de 52.640 r.p.m. foi atingida.

DISCUSSÃO

A maioria dos sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE examinados foram capazes de reagir cruzadamente com as albuminas heterólogas ensaiadas. (Tabelas I,II,III). Após a precipitação, na equivalência, com um dos antígenos heterólogos, a capacidade dêstes sôros precipitarem um segundo antígeno heterólogo achava-se substancialmente reduzida (Tabela V) indicando que a maior parte dos anticorpos que reagiram cruzadamente eram específicos de um motivo antigênico comum às três albuminas. A existência dêsse motivo antigênico comum acha-se confirmada pelas experiências com anticorpos especificamente isolados com o auxílio de imuno-absorventes contendo o antígeno heterólogo. Êsses anticorpos precipitaram tanto SAH, como SAB ou SAE, confirmando que a maior parte da sua especificidade corresponde a um motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE.

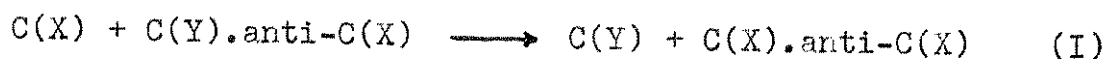
Não se pode inferir, dos dados de precipitação quantitativa, a extensão das semelhanças estruturais entre as proteínas em estudo. A extrapolação das relações molares A/Ag no precipitado específico permite concluir que, em grande excesso de anticorpo, nas reações homólogas, cerca de 8 a 15 moléculas de anticorpo se combinam com uma molécula de antígeno. Nas reações cruzadas apenas cerca de 2 a 8 mol. de A se combinam a 1 mol. de Ag. Êsses dados porém não permitem concluir sobre a extensão das semelhanças estruturais, pelas seguintes razões:

- 1 - A extrapolação foi realizada admitindo-se a validade do modelo matemático de HEIDELBERGER e KENDALL para interpretação do fenômeno da precipitação específica. Admitindo-se o modelo de GOLDBERGER (147) pode-se imaginar uma relação molar máxima A/Ag bem maior do que as encontradas, porquanto admite-se que parte dos complexos formados nessa zona são solúveis. A existência dêsses complexos solúveis tem sido assinalada (158);
- 2 - Pode-se supor que, em razão de um impedimento estérico,

a combinação de uma molécula de anticorpo com um determinante exclua a possibilidade de combinação de outra molécula de anticorpo com determinantes vizinhos. Dêsse modo a relação máxima A/Ag representaria a média de combinações estericamente possíveis;

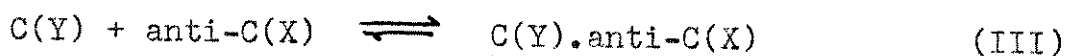
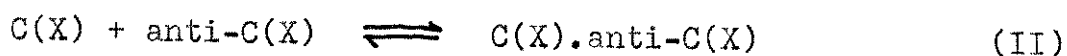
3 - As estruturas que integram o determinante antigênico representam apenas uma fração das estruturas do antígeno. A existência de determinantes internos (159) e a alteração da especificidade de um antígeno consequente a alteração de sua estrutura terciária (92) são exemplos indicadores da existência de extensas regiões do antígeno nativo inacessíveis ao reconhecimento imunológico.

As experiências com anticorpos especificamente purificados mostraram que êsses anticorpos eram mais ávidos do antígeno homólogo do que do heterólogo. Efetivamente, em experiências de imunodifusão, as interações dêsses anticorpos com os antígenos homólogo e heterólogo afiguraram-se como as de uma reação cruzada. A interpretação dêsse fato, diante dos resultados das provas de absorção, conduz a aceitação da existência de reações de precipitação entre o antígeno homólogo e o complexo solúvel formado pelo antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas. A existência dessas reações, comprovada pelas experiências de imunodifusão (1.3.3.), indica que num sistema, constituído por antígeno homólogo e complexo solúvel formado entre o antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pela reação cruzada, ocorrem reações de substituição como indicado abaixo:



onde C(X) e C(Y) representam os antígenos homólogo e heterólogo, respectivamente. O uso de antígenos marcados permitiu mostrar que a adição de um antígeno ao complexo solúvel formado entre êsse mesmo antígeno e os anticorpos responsáveis pela reação cruzada resulta sempre na substituição de uma parte do antígeno combinado ao anticorpo por moléculas do antígeno adi

cionado. A substituição do antígeno combinado ao anticorpo pelo antígeno adicionado ao sistema realizou-se, contudo, em níveis diferentes para os antígenos homólogo e heterólogo, sugerindo que as constantes de equilíbrio das reações homólogas representadas em (II) diferem significativamente das reações heterólogas representadas em (III)



A comparação dos dados obtidos nas experiências com os antígenos homólogo e heterólogo permite admitir que a relação de magnitude entre essas constantes é de tal ordem que a reação (I) é praticamente irreversível. Em apóio dessa conclusão as experiências (1.3.4) mostraram que, dentro das condições usadas não ocorre a substituição do antígeno homólogo pelo heterólogo.

A existência de diferenças mensuráveis nas reações (II) e (III) e a irreversibilidade aparente da reação (I) é uma indicação ponderável em favor da hipótese de que os motivos C(H), C(B) e C(E) não são idênticos. Esta hipótese permite interpretar satisfatoriamente os resultados das experiências realizadas com SAE-Dn. Este antígeno foi capaz de remover, dos sôros anti-SAE, os anticorpos que reagiam cruzadamente com SAB e com SAE (anticorpos anti-C(E)) e no entanto aparentemente, foi incapaz de reagir com os anticorpos presentes nos sôros anti-SAB e anti-SAH que reagiam com SAE (anticorpos anti-C(B) e anti-C(H), respectivamente.) O fato de que foi necessária uma dose de SAE-Dn cerca de 3 a 4 vezes maior do que a de SAE nativo para remover os anticorpos anti-C(E) pode ser interpretado como uma indicação de que o motivo C(E), na SAE-Dn, tinha uma reduzida capacidade de combinação com os anticorpos. Esta alteração do motivo C(E) teria acarretado uma redução acentuada das reações cruzadas a níveis aquém da sensibilidade dos métodos empregados para a sua detecção, devido

ao fato dos anticorpos anti-C(B) e anti-C(H) serem menos ávidos do antígeno do que os anticorpos homólogos (anti-C(E)).

Os anti-sôros anti-SAH, anti-SAB e anti-SAE contêm anticorpos capazes de reagir com o fragmento IH, isolado a partir de SAH. Os anticorpos anti-C(H), anti-C(B) e anti-C(E), especificamente isolados, foram igualmente capazes de reagir com o fragmento IH. Contudo este fragmento foi incapaz de inibir completamente as reações desses anticorpos com a SAH, indicando assim que os determinantes presentes naquele fragmento representam apenas uma parcela dos determinantes que compõem o motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE. Essa conclusão é coerente com o fato de que os anticorpos específicos dos determinantes presentes no fragmento IH (anticorpos anti-IH) diferem, nas suas propriedades, dos anticorpos anti-C. Ambos os anticorpos, especificamente isolados e purificados, são representados por imunoglobulinas da classe IgG. Contudo, enquanto os anticorpos anti-C precipitavam em presença de SAH, SAB e SAE, os anticorpos anti-IH não precipitavam nem fixavam complemento em presença desses antígenos. A precipitação e a fixação de complemento são fenômenos que dependem da formação de uma rede A/AG (lattice), cuja constituição implica na interação de antígenos multivalentes com anticorpos bivalentes (Cf. 120). A ausência de precipitação tem sido atribuída a existência de anticorpos incompletos e de antígenos com um número de valências incompatíveis com a formação de uma rede. Em conformidade com essa interpretação, SAH, SAB e SAE funcionariam como antígenos multivalentes em relação aos anticorpos anti-C e como antígenos uni ou bivalentes em relação aos anticorpos anti-IH. As experiências de WEBB e LAPRESLE (108) mostraram que os anticorpos anti-IH, isolados a partir dos sôros anti-SAH, reagem com dois determinantes de albumina nativa. Em concordância com esses achados, as experiências relatadas (2.1.2) mostraram que as reações entre SAH e os anticorpos anti-IH, isolados a partir dos sôros anti-SAH, anti-SAB ou anti-SAE eram parcialmente inibidos pelo fragmento F_1 , indicando que pelo menos 2 determinantes estão presentes no fragmento IH.

Com o auxílio do fragmento F_1 foi possível isolar-se dos sôros anti-SAB um anticorpo capaz de reagir com SAH, SAB e SAE. Esse anticorpo, representado por imunoglobulina da classe IgG, podia ser completamente absorvido por SAH, SAB e SAE, e não precipitava e não fixava o complemento quando em presença desses antígenos. A análise à ultracentrifugação da mistura em um excesso desse anticorpo com SAB evidenciou a presença de dois componentes, um com constante de sedimentação igual a 6,6S, correspondente a IgG livre, e outro com constante de sedimentação igual a 7,7S correspondente ao complexo de fórmula A.Ag (2.2.2). Esses dados indicam que esse anticorpo anti- F_1 (B) é específico de um único determinante comum a SAB, SAH e SAE.

A incapacidade dos anticorpos anti-IH e anti- F_1 precipitarem os antígenos em estudo ou fixarem o complemento quando em presença desses antígenos limitou sobremaneira a obtenção de dados quantitativos sobre as reações desses anticorpos. Os dados semi-quantitativos obtidos pela hemaglutinação passiva mostraram que, para uma mesma concentração aparente de anticorpos, o título varia conforme o antígeno utilizado na sensibilização dos glóbulos seja homólogo ou heterólogo. Os títulos foram sempre mais altos com hemátias sensibilizadas com o antígeno homólogo do que com o heterólogo. Em correspondência com esse fato, pequenas quantidades de antígeno homólogo inibiam completamente as reações homólogas e heterólogas, ao passo que uma quantidade 32 vezes maior de antígeno heterólogo era incapaz de inibir a reação homóloga (2.1.4). O paralelismo entre esses dados e as observações realizadas com complexos solúveis (1.3.4) sugere fortemente que os determinantes presentes em IH e comuns a SAH, SAB e SAE, não são idênticos. Todavia, a técnica utilizada para obtenção desses dados apresenta dois inconvenientes principais: 1º a labilidade da união entre o Ag e a hemátia taninizada, permitindo a presença de antígeno livre capaz de interferir nos resultados da hemaglutinação; 2º ausência de informações quanto à quantidade de anticorpo combinado ao antígeno fixado à hemátia. Embora estas restrições não invalidem os resultados obtidos comparati-

vamente, é óbvia a necessidade de informações sobre as quantidades de antígeno e anticorpo envolvidas naquelas reações.

Com o fito de estabelecer um método capaz de fornecer dados quantitativos sobre essas reações, foi desenvolvida a técnica da hemólise passiva indireta (118-119). Os resultados iniciais mostraram que hemátias sensibilizadas com SAH, SAB ou SAE, de modo a serem igualmente susceptíveis à lise quando submetidas à ação de uma quantidade idêntica de anticorpo homólogo, reagem diferentemente com uma solução de anti-F₁ (B) (Tabela XIV). Frente a hemátias sensibilizadas com SAE foi ne

TABELA XIV

Quantidade (mug N A) de anticorpo necessária à lise de 50% dos glóbulos sensibilizados com SAH, SAB ou SAE, pela técnica de hemólise passiva indireta (118).

Anticorpos	Hemátias sensibilizadas com:		
	SAH	SAB	SAE
Imune-sôro homólogo (anti-SAH, anti-SAB, ou anti-SAE)	9	9	9
Anticorpos anti-IH(B)	10	9	63

cessário utilizar-se uma concentração desses anticorpos cerca de 7 vezes maior do que a necessária para produzir um efeito comparável ao observado com hemátias sensibilizadas com SAB. Como esses anticorpos podem ser completamente absorvidos por hemátias conjugadas a SAE, os dados observados só podem ser interpretados admitindo-se que, nas condições da prova, apenas uma proporção dos anticorpos presentes se combina à SAE. Esses dados sugerem que o determinante F₁, presente na SAB

(determinante $F_1(B)$) não é idêntico ao determinante correspondente da SAE (determinante $F_1(E)$). Resultados em andamento sugerem que o determinante $F_1(H)$, da SAH, também não é idêntico a $F_1(B)$.

O conjunto dos resultados obtidos permite concluir que nas albuminas em estudo existe um motivo antigênico comum, designado esquematicamente por C(H), C(B) e C(E) quando pertencentes à estrutura antigênica de SAH, SAB e SAE, respectivamente. Os motivos C(H), C(B) e C(E) não são idênticos e possuem vários determinantes diferentes entre si. Essas conclusões são coerentes com as informações existentes sobre a estrutura primária das proteínas. A análise da sequência de amino-ácidos de algumas proteínas mostrou que não existem repetições de estrutura ao longo da cadeia polipeptídica. Dêste modo seria altamente improvável a existência de dois determinantes iguais numa mesma molécula proteica nos casos em que, como nas albuminas (153), esta molécula é constituída por uma única cadeia polipeptídica. Por outro lado a comparação da estrutura de uma proteína isolada de uma espécie animal com a estrutura da mesma proteína isolada de espécies diferentes mostrou a existência de zonas de similaridade estrutural relativamente extensas (160). É de se esperar que as sequências de amino-ácidos das sôro-albuminas humana, bovina e equina comportem igualmente várias zonas com identidade estrutural. Contudo, em razão das diferenças obviamente existentes nas estruturas primária e secundária dessas proteínas, seria improvável a existência na configuração tridimensional dessas proteínas, de regiões com estruturas idênticas. Por conseguinte é improvável o encontro de determinantes idênticos em proteínas pertencentes a espécies animais distintas.

A complexidade do motivo antigênico comum às albuminas em estudo requer que a área de investigação se restrinja ao estudo de um único determinante antigênico por vez. A possibilidade dêsse estudo encontra-se facilitada pelo isolamento do fragmento F_1 e do anticorpo anti- $F_1(B)$. Para que se possam realizar comparações de estrutura do determinante $F_1(B)$

com os determinantes $F_1(H)$ e $F_1(E)$ torna-se necessário o isolamento de fragmentos, de baixo peso molecular, contendo êsses determinantes. Trabalhos em andamento indicam a possibilidade de isolamento de tais fragmentos. O estudo comparativo das reações entre o anticorpo isolado e êsses fragmentos ou as albuminas em investigação encontra-se facilitado pela técnica da hemólise passiva indireta. O baixo peso molecular dos fragmentos representa uma facilidade para o estudo comparativo das estruturas envolvidas nessas reações, restringindo assim a desvantagem representada pelo reconhecimento da estrutura dos antígenos nativos.

Os sistemas utilizados no estudo dos determinantes antigênicos das proteínas são complexos. Os resultados obtidos utilizando-se proteínas de estrutura conhecida sugerem que vários determinantes estão envolvidos nas reações estudadas. Igual dificuldade tem sido observada no estudo dos polipeptídeos sintéticos. Os oligopeptídeos, não sendo antigênicos senão quando conjugados a proteínas, apresentam os mesmos inconvenientes apontados em relação aos haptenos (88). Por outro lado, os copolímeros antigênicos são de estrutura indeterminada e contêm vários determinantes diferentes entre si. A simplicidade do sistema sob investigação - constituído por um único determinante - permite que se depositem esperanças de que o seu estudo possa contribuir para obtenção de informações sobre um dos mais fascinantes problemas da Imunoquímica: a reação antígeno-anticorpo.

CONCLUSÕES

As relações antigênicas entre as sôro-albuminas humana, bovina e equina (SAH, SAB e SAE) foram estudadas, utilizando-se vários métodos imunoquímicos. Os resultados obtidos indicam que:

- 1) Existe um motivo antigênico comum à SAH, SAB e SAE.
- 2) As representações (C(H), C(B) e C(E)) dêsse motivo antigênico comum não são idênticas nas diferentes sôro-albuminas em estudo.
- 3) A maioria dos anticorpos que reagem cruzadamente com C(H), C(B) e C(E) são mais ávidos do antígeno homólogo do que do heterólogo.
- 4) Nas reações de precipitação em gel de agar ocorrem interações entre o antígeno homólogo e o complexo solúvel formado entre o antígeno heterólogo e os anticorpos responsáveis pelas reações cruzadas.
- 5) Em virtude dessas interações, nas experiências de imuno-difusão, o aspecto das reações entre os anticorpos que reagem cruzadamente (especificamente isolados) e os antígenos homólogo e heterólogo, assemelha-se ao de uma reação cruzada (identidade parcial).
- 6) O motivo antigênico comum à SAH, SAB e SAE é constituído por vários determinantes diferentes entre si.
- 7) Pode ser isolado, dos digestos da SAH submetida à ação de catepsina D de coelho, um fragmento - designado fragmento IH- que contém pelo menos dois dos determinantes que compõem o motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE.

- 8) Dos digestos do fragmento IH pode ser isolado um segundo fragmento - designado fragmento F_1 - que contém um único determinante do motivo antigênico comum a SAH, SAB e SAE.
- 9) As provas realizadas com os anticorpos isolados através o uso do fragmento F_1 sugerem que o determinante da SAH, da SAB e da SAE que reagem com êsses anticorpos não são idênticos.
- 10) O conjunto de informações obtidas no presente estudo favorece a hipótese de LANDSTEINER e VAN DER SHEER, segundo a qual os determinantes envolvidos nas reações cruzadas não são idênticos mas apenas estruturalmente similares.

REFERÊNCIAS

- 1) HUMPHREY, J.H. e WHITE, R.A. (1964) *Imunologia médica*, Edicione Toray, Barcelona.
- 2) EHRLICH, P. (1898) *Dtsch. med. Wschr.* 24, 597
- 3) EHRLICH, P. (1900) *Proc. roy. Soc., B*, 66, 424
- 4) DANYSZ, J. (1902) *Ann. Inst. Pasteur*, 16, 331
- 5) BORDET, J. (1899) *Ann. Inst. Pasteur*, 13, 225
- 6) BORDET, J. (1903) *Ann. Inst. Pasteur*, 17, 161
- 7) ARRHENIUS, S. (1904) *Arb. Reichsgesundh Amt*, 20, 559
- 8) ARRHENIUS, S. (1905) *Quantitative Laws in Biological Chemistry*, London
- 9) ARRHENIUS, S. und MADSEN, T. (1904) *Zbl. Bakt.*, 36, 612
- 10) ARRHENIUS, S. und MADSEN, T. (1902) *Fetskrif. Staatens Serum Inst. n° 3*
- 11) ARRHENIUS, S. und MADSEN, T. (1904) *Zbl. Bakt.*, 37, 1
- 12) OBERMEYER, F. und PICK, E.P. (1906) *Wien. Klin. Wachr.*, 19, 327
- 13) PICK, E.P. (1912) *Kolle und Wassermann "Handbuch der Pathogenen Mikroorganismus, II Aufl, Springer Verlag, Berlim*, 1, 685
- 14) LANDSTEINER, K. und PRASEK, E. (1914) *Z. ImmunForsch.*, 20, 211
- 15) LANDSTEINER, K. und LAMPL, H. (1917) *Z. ImmunForsch.*, 26, 133, 258
- 16) LANDSTEINER, K. (1917) *Z. ImmunForsch.*, 26, 122
- 17) LANDSTEINER, K. (1945) *The Specificity of serological reactions*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- 18) LANDSTEINER, K. (1930) *Naturwissenschaft*, 18, 653
- 19) CLUTTON, R.F., HARRINGTON, C.R. and MEAD, T.H. (1937) *Biochem. J.*, 31, 764
- 20) CLUTTON, R.F., HARRINGTON, C.R. and YUILL, M.E., (1938) *Biochem. J.* 32, 1111
- 21) HOPKINS, S.J. and WORMALL, A. (1933) *Biochem. J.*, 27, 740, 1706
- 22) KRAUS, R. (1897) *Wien. klin. Wschr.*, 10, 736
- 23) RAMON, G. (1922) *C.R. Soc. Biol.* 86, 711, 813, 661

- 24) DEAN, H.R. and WEBB, R.A. (1928) J. Path. Bact., 31, 89
- 25) WU, H, CHENG, L.H. and LI, C.P. (1927) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25, 853
- 26) WU, H. and SAH, P.P.T. (1929) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26, 737
- 27) HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F.E. (1929) J. Exp. Med., 50, 809
- 28) HEIDELBERGER, M., KENDALL, F.E. and SOOHOO, C.M. (1933) J. Exp. Med., 58, 137
- 29) HEIDELBERGER, M. SIA, R.H.P. and KENDALL, F.E. (1930) J. Exp.
- 30) HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F.E. (1935) J. Exp. Med., 61, 559, 563 ; *ibid.* 62, 467, 697
- 31) HEIDELBERGER, M. (1956) Lectures in Immunochemistry Academic Press, N.Y.
- 32) MARRACK, J.R. (1934) Spec. Rep. Ser. med. Res. Council London, n^o 194
- 33) MARRACK, J.R., HOCH, H. and JOHNS, R.G.S. (1951) Brit.J. Exp. Path. 32, 212
- 34) AVERY, O.T. and GOEBEL, W.F. (1929) J. Exp. Med., 50, 533
- 35) AVERY, O.T., GOEBEL, W.F. and BARBERS, F.H. (1932) J. Exp. Med., 55, 769
- 36) GOEBEL, W.F., AVERY, O.T. and BARBERS, F.H. (1934) J. Exp. Med., 60, 599
- 37) DOCHEZ, A.R. and AVERY, O.T. (1915) J. Exp. Med., 21, 114
- 38) AVERY, O.T., HEIDELBERGER, M. and GOEBEL, W.F. (1925) J. Exp. Med., 42, 709
- 39) AVERY, O.T. and HEIDELBERGER, M. (1923) J. Exp. Med., 38, 81
- 40) AVERY, O.T. and HEIDELBERGER, M. (1925) J. Exp. Med., 42, 367
- 41) HEIDELBERGER, M. and AVERY, O.T. (1923) J. Exp. Med., 38, 73
- 42) HEIDELBERGER, M. and AVERY, O.T. (1925) J. Exp. Med., 40, 301
- 43) HEIDELBERGER, M. and GOEBEL, W.F. (1927) J. Biol. Chem., 74, 613

- 44) NEUFELD und HANDEL (1909) Arb. Reichsgesund Amt. 34, 293
- 45) HEIDELBERGER, M. (1927) Physiol. Rev. 7, 107
- 46) HOTCHISS, R.D. and GOEBEL, W.F., (1937) J. Biol. Chem. 121,
195
- 47) REEVES, R.E. and GOEBEL, W.F. (1941) J. Biol. Chem. 139,
511
- 48) HEIDELBERGER, M. and REBERS, P.A. (1958) J. Am. Chem. Soc.
80, 116
- 49) HEIDELBERGER M. and SHRIVASTAVA, D.L. (1937) J. Exp. Med.,
65, 487
- 50) HEIDELBERGER, M., KABAT, E. and MAYER (1942) J. Exp. Med.,
75, 35
- 51) HEIDELBERGER, M. and HOBBY, (1942) Proc. Nat. Acad. Sci.,
28, 516
- 52) JONES, J.K.N. and PERRY, M.B. (1957) J. Am. Chem. Soc.,
79, 2787
- 53) HEIDELBERGER, M. and REBERS, P.A. (1960) J. Bact., 80
145
- 54) HEIDELBERGER, M. (1960) Fortschrf. Chem. Org. Naturstoffe
28, 503
- 55) STAUB, A.M., TINELLI, R., LUDERITZ, O. et WESTPHAL, O.,
(1959) Ann. Inst. Pasteur, 96, 303
- 56) STAUB, A. M. et DAVARPANA, C., (1956) Ann. Inst. Pasteur
91, 338
- 57) WESTPHAL, O. und LUDERITZ, O., (1960) Angew. Chem., 72,
881
- 58) BADDILEY, J. (1961) Immunochemical Approaches to Problems
in Microbiology, Ed. by O. Plescia and M. Heidelberger
Rutgers, The State University Press, p.91
- 59) MC CARTY, M. (1961) Ibid., p.112
- 60) KABAT, E., (1956) Blood Group Substances, New York, Academic Press.
- 61) KABAT, E. and BERG, D. (1952) Ann. N.Y. Acad. Sci., 55, 471
- 62) KABAT, E. and BERG, D. (1953) J. Immunol., 70, 514
- 63) MAURER, P., (1953) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 879
- 64) KABAT, E. (1957), J. Cellular Comp. Physiol. 50, Supl. 1,
79

- 65) KABAT, E. (1962) Fed. Proc., 24, 694
- 66) KARUSH, F. (1957) J. Am. Chem. Soc., 79, 3380
- 67) KARUSH, F. (1958) Ann N.Y. Acad. Sci., 20, 581
- 68) MAGE, R. and KABAT, E., (1963) Biochemistry, 2, 1278
- 69) KABAT, E. (1966) J. Immunol. 93, 115
- 70) CAMPBELL, J.H. and PAPPENHEIMER Jr., A.M. (1966) Immunochemistry, 3, 195, 213
- 71) LINDERSTROM-LANG, K., (1952) Lane Lectures, 115, Standford University Press, Palo Alto, California
- 72) BERNAL, J.D. (1958) Discussions Faraday Soc., 25, 7
- 73) OUDIN, J. (1966) J. Cell. Comp. Physiol. Suppl. 1, 67, 77
- 74) INGRAM, V.M. (1960) Genetics, ed. by H. Eldon Sutton, Josiah Macy Jr. Foundation, New York
- 75) KIMMEL, J.R. and SMITH, E.L. (1957) Advances in Ynzymol. 19, 267
- 76) OUDIN, J. et MICHEL, M. (1963) C.R. Acad. Sci., Paris, 257, 805 ; OUDIN, J. (1966) comunicação pessoal.
- 77) SANGER, F., (1956) Currents in Biochemical Research, ed. by Green, Interscience Publ. N.Y. p.434.
- 78) Cf. KEIL, B., (1962) Ann. Biochem., 31, 139
- 79) HILL, R.L., KIMMEL, J.R. and SMITH, E. L. (1959) Ann Rev. Biochem., 28, 97
- 80) KENDREW, J.C. et al., (1958) Nature, 181, 662
- 81) BLHUM, M.M., BODO, G, DINTZIS, H.M. and KENDREW, J.C. (1958) Proc. Roy. Soc. London, A 246, 369
- 82) BRAGG, W.L. and PERUTZ, M.F. (1954) ibid. A 225, 315
- 83) STAHMANN, M.A., LAPRESLE, C, BUCHANAN-DAVIDSON, D.J. and GRABAR, P. (1959) J. Immunol., 83, 534
- 84) HAUROWITZ, F., (1956), J. Cellular Comp. Physiol. 47, Suppl. 1
- 85) PORTER, R.R. (1960) The Plasma Proteins, ed. by F.W. Putnan, Academic Press, New York, I, 241
- 86) EISEN, H.N. and PEARCE, J.H. (1962) Ann. Rev. Microbiol. 16, 101
- 87) HAUROWITZ, F. (1962) Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., 27, 247
- 88) SRI RAM, J. and MAURER, P.H. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 83, 223

- 89) RAJEWSKY, K. (1966) Biochem. Biophys. Acta., 121, 51
- 90) FRAENKEL-CONRAT, H. (1959) Sulfur in Proteins, Academic Press, New York.
- 91) MAURER, P.H. and SRI RAM, J., (1958) Serological and Biochemical Comparisons of Proteins, ed. by W.H.Cole, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J. p.56
- 92) MILLS, J.R. and HABER, E.(1962) Fed. Proc., 21, 31
- 93) STULL, A. and HAMPTON, S.F. (1941) J. Immunol., 41, 143
- 94) LANDSTEINER, K. (1942) J. exp. Med., 75, 269
- 95) KLECZKOWSKI, A. (1945) Brit. J. Exp. Path.,26, 33
- 96) KAMINSKI, M. et GRABAR, P. (1949) Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 31, 684
- 97) LAPRESLE, C. (1955) Ibid., 37, 969
- 98) LAPRESLE, C., (1955) Ann. Inst. Pasteur, Paris, 89, 654
- 99) LAPRESLE, C., et DURIEUX, J. (1957) Ibid., 92, 62
- 100) LAPRESLE, C. et DURIEUX, J. (1957) Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 833
- 101) LAPRESLE, C. et DURIEUX, J. (1958) Ann. Inst. Pasteur, 94, 38
- 102) LAPRESLE, C. et SLIZEWICZ, P. (1958) Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1085
- 103) LAPRESLE, C., WEBB, T., KAMINSKI, M. et CHAMPAGNE, M. (1959) Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 695
- 104) LAPRESLE, C., KAMINSKI, M. et TANNER, C.E., (1959) J. Immunol., 82, 94
- 105) LAPRESLE, C. (1959) Ann. Inst. Pasteur, 97, 626
- 106) WEBB, T. and LAPRESLE, C. (1961) J. Exp. Med., 114, 43
- 107) LAPRESLE, C. et WEBB, T. (1960) Ann. Inst. Pasteur, 99 523
- 108) WEBB, T. and LAPRESLE, C. (1964) Biochem. J., 91, 24
- 109) LAPRESLE, C. and WEBB, T., (1965) Ibid. 95, 245
- 110) KAMINSKI, M. (1965) Progress in Allergy, 2, 79
- 111) RANGEL, H. and BIER (1961) Ann. Acad. Bras. Cien., 33 51
- 112) RANGEL, H. (1961) An. Microbiol. (supl) 2, 39
- 113) RANGEL, H (1962) Cienc. Cult., 14, 256
- 114) RANGEL, H. (1964) Prot. Biol. Fluids, 11, 114

- 115) RANGEL, H. (1965) Immunology, 8, 88
- 116) RANGEL, H and REPKA, D. (1965) Immunology, 8, 618
- 117) RANGEL, H. et LAPRESLE, C. (1966) Bioch. Biophys. Acts, 128, 372
- 118) RANGEL, H. (1968) Immunology, em publicação
- 119) RANGEL, H. and PERINI, A. (Enviada à publicação)
- 120) KABAT, E. and MAYER, M. Experimental Immunochemistry, Charles C.Thomas, Publisher, Springfield, Illinois
- 121) BANERJEE, R.N. and EKINS, R.P. (1961) Nature, London, 192, 746
- 122) FREUND, J., THOMSON, K.J., HOUGH, H.B., SOMMER, H.E., and PISANT, T.M. (1948) J. Immunol., 60, 383
- 123) PRESS, E.M., PORTER, R.R. and CEBRA, J. (1960) Biochem. J. 74, 501
- 124) LAPRESLE, C. and WEBB, T. (1962) Biochem. J. 84, 455
- 125) MARKHAM, R. (1942) Biochem. J., 36, 790
- 126) WEICHSELBAUM, I.E. (1946) Amer. J. Clin. Path. 10, 40
- 127) LOWRY, R., ROSEBROUGH, H., FARR, R. and RANDALL, O. (1957) Met. in Enzymology 3, 448
- 128) OUDIN, J. (1952) Meth. med. Res. 5, 335
- 129) OUCHTERLONY, O. (1958) Progress in Allergy, 5, 1
- 130) GRABAR, P. and BURTIN, P. (1964) Immuno-elektrophoretische Analyse, Elsevier, Amsterdam
- 131) MAYER, M., OSLER, A.G., BIER, O. and HEIDELBERGER, M. (1946) J. Exp. Med. 84, 535
- 132) MAYER, M., OSLER, A.G., BIER, O.G. and HEIDELBERGER, M. (1948) J. Immunol. 59, 195
- 133) BORDUAS, A.F. et GRABAR, P. (1953) Ann. Inst. Pasteur, 84, 903
- 134) GYENES, L. and SEHON, A.H. (1960) Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 1235
- 135) SINGER, S.J. FOTHERGILL, J.E. and SHAINOFF, J.R. (1960) J. Am. Chem. Soc., 82, 565
- 136) AVRAMEAS, S. et THERNYNCK, T. (1966) Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 262, 1175
- 137) FARR, R.S. (1958) J. Inf. Dis. 103, 239

- 138) SOBER, H.A., GUTTER, F.J., WICKOFF, M.M. and PETERSON, E.A.
(1956) J. Am. Chem. Soc., 78, 751
- 139) FLODIN, P. (1962) Dextran gels and their application in
gel filtration, Uppsala
- 140) LEGETT BAILEY, J. (1962) Techniques in protein chemistry
Elsevier Publishing Co., Amsterdam
- 141) FRAENKEL-CONRAT, H., HARRIS, J.I. and LEVY, A.L. (1955)
Methods in Biochemical analysis, Ed. by Glick Inter-
science Publishers, N.York, Vol.II, pg. 359
- 142) SCHACHMAN, H.K. (1959) Ultracentrifugation in Biochemistry
Academic Press, New York
- 143) SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE, S. (1958) J. Anal.
Chem., 30, 1190
- 144) FOSTER, J.F. (1960) The plasms proteins, Ed. by Putnan,
Academic Press, New York, Vol.I p. 179
- 145) JANEWAY, C.A., ROSEN, F.S., MERLER, E. and ALDER, C.A.
(1967) The gamma globulina, Little, Brown and Co.,
Boston
- 146) NAYLOR, G.R.E. and ADAIR, M.E. (1957) J. Immunol., 79, 130
- 147) GOLDBERG, R.J. (1952) J. Am. Chem. Soc., 74, 5715
- 148) OUCHTERLONY, O. (1964) Immunological methods, Ed. by J.
F. Ackroyd, Blackwell Sci. Publications, Oxford
- 149) WEIGLE, W.O. (1961) J. Immunol. 87, 599
- 150) HOOKER, S.B. and BOYD, W.C. (1934) J. Immunol., 26, 469
- 151) LANDSTEINER, K. and VANDER SHEER, J. (1940) J. Exp. Med.
71, 445
- 152) REICHMAN, M.E. and COLVIN, C. (1955) Can. J. Chem. 33, 163
- 153) HUNTER, M.J. and MC DUFFIE, F.C. (1959) J. Am. Chem. Soc.
81, 1400
- 154) FOSTER, J.E. and AOKI, K.J. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80,
1117
- 155) FOSTER, J.E. (1966) Comunicação pessoal.
- 156) SCHECHTER, I. and SELA, M. (1967) Biochemistry 6, 897
- 157) LAPRESLE, C. and WEBB, T. (1964) Volume du cinquanteaire
de la Societé de Chimie Biologique, Passon et Cie,
Paris, p. 157
- 158) FORSTER, O. and WEIGLE, W.O. (1963) J. Immunol. 90, 935

- 159) ISHIZAKA, T., CAMPBELL, D.H. and ISHIZAKA, K. (1960)
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 103, 5
- 160) DOOLITTLE, R.F., SCHUBERT, D and S.A. SCHARTZ, S.A.
(1967) Arch. Biochem. Biophys., 118, 456

ÍNDICE

	Página
Prefácio	III
Introdução	1
Material e Métodos	10
Apresentação e interpretação dos resultados	17
1. Relações antigênicas entre as albuminas	17
1.1 - Reação entre as albuminas nativas e os imune-sôros não purificados	17
1.2 - Reações da albumina equina desnaturada (SAE-Dn) com os imune-sôros anti-SAE, anti-SAB e anti-SAH	24
1.3 - Reações entre as sôro-albuminas e os anti-corpos isolados responsáveis pelas reações cruzadas	30
2. Estudo da reação cruzada entre SAH, SAB e SAE com o auxílio de fragmentos da molécula de SAH	39
2.1.- Estudo da reação cruzada entre SAH, SAB e SAE com o auxílio do fragmento IH da SAH	39
2.2 - Estudo da reação cruzada com o auxílio de fragmento F ₁	46
Discussão	50
Conclusão	58
Referências	60