

Curso de Pós-Graduação

IMUNOLOGIA

Imp.

td
"PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA PARCIAL DAS
IMUNOGLOBULINAS TIPO IgG DE Tayassu tajacu(L.)"

nt
MARIA SUMIKO ARITA

Tese de Mestrado apresenta
da ao Instituto de Biolo-
gia da Universidade Esta-
dual de Campinas.

Orientador

t
Prof.Dr. BENEDITO OLIVEIRA

Campinas - São Paulo

1978

UNICAMP



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: MARIA SUMIKO ARITA
Nº de Identificação:
Endereço para Correspondência: Dep. Bioquímica, IB - UNICAMP
Curso: PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
Nome do Orientador: Prof. Dr. BENEDITO OLIVEIRA
Título da Dissertação ou Tese: "PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA PARCIAL DAS IMUNOGLOBULINAS TIPO IgG DE Tayassu tajacu(L.)"
Data proposta para a Defesa: 8 de Agosto de 1978

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

17/07/78
Data

Maria Sumiko Arita
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de c teressados.

1/1
Data

assinatura do

a meus pais

a meus irmãos

a meus amigos

Professores,

Aldo Focesi Júnior e

Anibal Eugênio Vercesi

exemplos de pesquisadores, que pela amizade, valiosas su
gestões e total apoio serviram de estímulo para execução
deste trabalho, meu especial agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof.Dr. Benedito Oliveira, orientador desta tese, por sua criteriosa orientação científica.

Ao Prof.Dr. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof.Dr. Sergio Porto, Coordenador Geral dos Institutos da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof.Dr. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof.Dr. Paulo Emilio Vanzolini, Diretor do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pelo interesse e atenção dedicados à execução deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Ivan Mota de Albuquerque, Diretor do Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia da Organização Mundial de Saúde, pela leitura, crítica e sugestões apresentadas.

Aos Professores: Dra.Nilce Correa Meirelles e Dr.Hiroshi Aoyama, pelo espírito de colaboração, sugestões e revisões deste trabalho.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus professores, pelos ensinamentos.

Ao Sr. Manoel Bernardo da Silva, pela colaboração nos trabalhos de campo.

A Srta. Maria das Graças Borba, pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

A Srta. Maria Luiza de Souza, pelo serviço esmerado de datilografia.

A todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

O orientador e a autora externam os agradecimentos as seguintes instituições de pesquisa:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia da Organização Mundial de Saúde.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introdução	1
2. Material e Métodos	
2.1. Animais experimentais	5
2.2. Preparo do antígeno	5
2.3. Obtenção de sôro de coelho anti-sôro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.)	6
2.4. Imunização de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) com ovalbumina	7
2.5. Fracionamento de sôro imune de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) por cromatografia em DEAE-celulose	8
2.6. Filtração em gel	9
2.7. Precipitação específica em gel de ágar	10
2.8. Eletroforese em acetato de celulose	10
2.9. Análise imunoeletroforética	10
2.10. Cromatografia de afinidade	11
2.11. Digestão pela papaína	12
2.12. Purificação dos fragmentos obtidos pela digestão com papaína	12
2.13. Dosagem de proteínas	13
2.14. Hemaglutinação passiva	13
2.15. Anafilaxia cutânea passiva	14
2.16. Fixação de complemento	14
3. Resultados	
3.1. Análise eletroforética da resposta imune de <u>Tayassu tajacu</u> (L.)	17
3.2. Cromatografia em DEAE-celulose do sôro imune individual de <u>Tayassu tajacu</u> (L.)	17
3.3. Caracterização imunoeletroforética das frações obtidas por cromatografia de troca iônica, do sôro imune de <u>Tayassu tajacu</u> (L.)	20

- 3.4. Controle eletroforético em acetato de celulose, do fracionamento de sôro imune de Tayassu tajacu(L.) em DEAE-celulose 23
- 3.5. Filtração em gel de Sephadex G-200, do sôro total, pseudoglobulina e fração RC de Tayassu tajacu(L.) 23
- 3.6. Caracterização imunoeletroforética das proteínas IgG, obtidas de filtração em gel de Sephadex G-200 26
- 3.7. Imunodifusão dupla das frações A, C e RC obtidas de cromatografia em DEAE-celulose, e a população tipo IgG1, obtida de filtração em gel de fração RC. 28
- 3.8. Demonstração de atividade de anticorpo por precipitação específica em gel de ágar, nas frações A, C, sôro total de Tayassu tajacu(L.), e na fração IgG-RC (pico II da filtração de RC em gel de Sephadex). 32
- 3.9. Controle da digestão pela papaína da imunoglobulina IgG2 de Tayassu tajacu(L.) 32
- 3.10. Isolamento dos anticorpos do sôro imune de Tayassu tajacu(L.) por cromatografia de afinidade. 33
- 3.11. Hemaglutinação passiva de hemácias sensibilizadas com o antígeno, pelas frações A e C, sôro imune total e a fração IgG-RC 36
- 3.12. Anafilaxia cutânea passiva induzida na pele heteróloga de porco doméstico, pelas imunoglobulinas do sôro hiperimune de Tayassu tajacu(L.) 39

3.13. Fixação de complemento pelas imunoglobulinas presentes no sôro hiperimune de <u>Tayassu tajacu</u> (L.)	39
4. Discussão	44
5. Resumo	54
6. Conclusões	57
7. Bibliografia	58

ABREVIATURAS

ACP	- anafilaxia cutânea passiva
Ab	- anticorpo
Ab-a-OVA	- anticorpo anti-ovalbumina
CH 50	- quantidade de complemento requerido para 50% de lise
DEAE-celulose	- dietilamino-etil-celulose
DGPC	- IgG2C de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) submetida à ação da papaína.
Fração RC	- soro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) esvaziado de IgG2.
IgG2 A	- primeiro pico obtido por cromatografia em DEAE-celulose do soro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.).
IgG2 C	- segundo pico obtido por cromatografia em DEAE-celulose, do soro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.).
IgG-RC	- pico II da filtração em gel de Sephadex G-200, da fração RC.
OVA	- albumina de ovo.
Prot.	- proteína.
PAP	- resina de poliamino polistireno
PAP-OVA	- resina de poliamino polistireno acoplada ao antígeno por diazotação.
Ra-a-TAY (S)	- soro de coelho anti-soro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.).
ST	- soro total.
Soro I	- soro de coelho anti-IgG2 de <u>Tayassu tajacu</u> (L.).
Soro II	- soro de coelho anti-IgG2 de <u>Tayassu tajacu</u> (L.), absorvido com fragmento Fab.
TAY-a-OVA	- soro total de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) imunizado com ovalbumina.
TAY-SN	- soro de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) "normal".

1. INTRODUÇÃO

A complexidade do sistema imune deu origem a pesquisas orientadas de diferentes pontos de vista: genético, celular e molecular. A rápida evolução da biologia molecular propiciou apreciar-se mais de perto a magnitude da complexidade do sistema imunitário, capaz de sintetizar um número indefinido de moléculas de anticorpo e ainda assim reter sua estrutura básica constituída de duas cadeias polipeptídicas de 50 000 daltons (cadeias pesadas) e duas de 25 000 daltons (cadeias leves) arranjadas simetricamente, quase sempre unidas por pontes disulfeto, tipo molecular clássico derivado dos estudos pioneiros de PORTER (1959) e EDELMAN (1959).

As moléculas de anticorpo abriram perspectivas para estudos que levaram a importantes "pistas" com respeito aos mecanismos de estocagem de informação, expressão de informação e expressão do processo evolutivo; os inúmeros trabalhos realizados mostraram que a diversidade funcional corresponde uma diversidade de sequência de amino ácidos dos anticorpos e consequentemente o reflexo de uma codificação em nível genético. (HOOD, GRAY, SANDERS, 1967; KILLANDER, 1967, WANG, WILSON, HOPPER, NISONOFF, 1970; DORRINGTON & TANFORD, 1970; FRANGIONE & LAMM, 1970; GRUBB, 1970; KOSHWA & KUNKEL,

1971; SMITH, HOOD & FITCH, 1971; NATVIG & KUNKEL, 1973; CAPRA & KEHOE, 1975; KABAT, 1976; KLAPER & CAPRA, 1976; FOUGERAU, SCHIFF, MATHIEU, De PRÉVAL, BOURGOUIS, MOULIN & SERRA, 1976).

A heterogeneidade das moléculas de anticorpos de diversas espécies animais dá uma visão da origem genética evolutiva deste sistema. Esta heterogeneidade é o resultado de três tipos de variabilidade de sequência de amino ácidos; (1) variante isotípicas que são comuns a todos os indivíduos da mesma espécie e diferenciam classes e tipos de imunoglobulinas, e são produtos de diferentes gens estruturais; (2) variantes alotípicas que distinguem formas polimórficas de imunoglobulinas não presentes em todos os membros constituintes de uma dada espécie; (3) variantes idiotípicas que superpostas às outras duas, caracterizam anticorpos individuais e proteínas derivadas de patologias moleculares como o mieloma múltiplo (FRANGIONE, FRANKLIN, FUDENBERG and KOSHLAND, 1966; FRANGIONE, MILSTEIN & PINK, 1969; EDELMAN, CUNNINGHAM, GALL, GOTTLIEB, RUTTISHAUER & WAXDAL, 1970) e doença de cadeia pesada (FRANKLIN, LOWENSTEIN, BIGELOW and METZGER, 1964).

Evidências recentes indicam que a síntese de cada cadeia pesada ou leve de imunoglobulina é governada por dois gens diferentes, um que codifica a região constante C terminal e outro a região variável N terminal (Simpósio: Two genes-one polipeptide chain, 1972).

A região constante da cadeia polipeptídica pesada é constituída de regiões de homologia estrutural em número de três para a imunoglobulina G e em número de quatro para as cadeias pesadas das imunoglobulinas E e M, cada uma constituída de aproximadamente 70 resíduos de amino ácidos estabilizados por uma ponte disulfeto de modo a formar uma alça intra-cadeia. A geometria deste tipo molecular reflete profundas conseqüências na expressão de imunidade adquirida protetora, na hipersensibilidade do tipo imediato, interação com o sistema complemento ou com superfícies específicas. O controle da biossíntese do anticorpo, mostra que a estrutura do antígeno assume papel relevante, não só no que se refere à especificidade, mas na própria natureza química da imunoglobulina (SELA, 1969, 1970; NUSSENZWEIG & BENACERRAF, 1967).

No presente trabalho emprega-se como modelo, anticorpos de um animal artiodactilo da fauna sul americana da família Tayassuidae. Esta familia apresenta linha evolutiva independente desde o oligoceno, (FIG.1) e a possibilidade de análise de regiões moleculares críticas de imunoglobulinas funcionais de soros individuais em quantidade apreciáveis, torna tentadores estudos comparativos com moléculas "homólogas" obtidas de soro de exemplares da familia Suidae, linha evolutiva paralela derivada dos Tayassuidae no oligoceno, e extensivamente estudadas do ponto de vista molecular

(FRANEK & RIHA, 1964; HOOD, GRAY, SANDERS & DREYER, 1967; METZGER, NOVOTNY & FRANEK, 1971; NOVOTNY, DOLEJS & FRANEK, 1972; BEALE, 1974). São apresentados os resultados iniciais que caracterizam três populações de anticorpos que desencadeiam atividades biológicas diferentes.

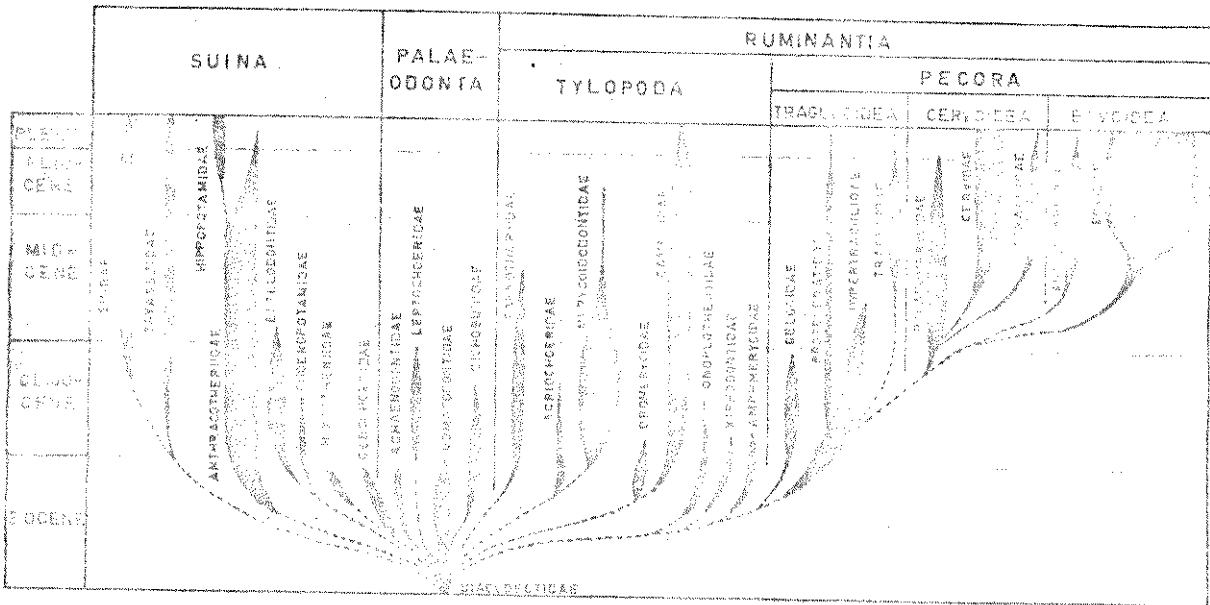


FIG.1 - Árvore filogenética dos grupo de animais Artio dactilos, segundo ROMER, 1966.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais utilizados.

Foram utilizados exemplares de Tayassu tajacu (LINNÉ, 1758)¹ do Bosque dos Jequitibás da Prefeitura Municipal de Campinas².

Os coelhos utilizados para imunização não eram espécimes de raça definida.

2.2. Preparo do antígeno.

O antígeno utilizado, foi a albumina de ovo cinco vezes cristalizada segundo KEKWICK (1936) e emulsificada em adjuvante de Freund completo.

Claras de ovo precipitadas com igual volume de solução saturada de sulfato de amônio pH 7,0

(1) Agradecemos ao Dr. Paulo Emilio Vanzolini, Diretor do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pelo levantamento da classificação dos animais utilizados.

(2) À Prefeitura Municipal de Campinas, nossos agradecimentos por fornecer os animais e franquear as dependências do Bosque dos Jequitibás, para execução de nosso trabalho de campo.

foram submetidas à centrifugação durante 10 minutos a 20 000Xg; o pH do sobrenadante foi alterado para pH 5,0 com ácido sulfúrico 9 N. Ao sobrenadante, foi adicionada solução saturada de sulfato de amônio pH 5,0, até atingir 75% de saturação. Após centrifugação a 20 000Xg por 40 minutos, o precipitado foi suspenso em água desionizada, num volume igual ao inicial. As recristalizações foram efetuadas adicionando-se volume igual de solução saturada de sulfato de amônio pH 5,0; após cinco recristalizações, o material foi dialisado contra água desionizada, até obtenção de reação de Nessler negativa e a seguir liofilizado.

O adjuvante foi preparado segundo FREUND (1956). Em um almofariz foram emulsificados 15 g de lanolina em 35 ml de nujol; adicionou-se então, 100 mg de B.C.G.³

2.3. Obtenção de sôro de coelho anti-sôro total de Tayassu tajacu(L.).

(3) Cortezia do Dr. Murillo A. Soares, Chefe de Secção de Vírus Epidermo-Dermotrôpicos do Instituto Butantan.

Os coelhos foram inoculados com soro total de *Tayassu*⁴, emulsificado em adjuvante de Freund completo, na concentração final de 10 mg de Prot./ml; nas doses de reforço, foi utilizado o soro total diluído em salina fisiológica na concentração de 1,0 mg de Prot./ml. O esquema de imunização empregado foi: 1a. inoculação - antígeno emulsificado em adjuvante de Freund completo (10 mg de Prot./animal), injetado via subcutânea nas quatro patas; 2a. inoculação - (três semanas após a primeira) - antígeno em adjuvante de Freund completo (10 mg de Prot./animal) injetado via intramuscular em quatro locais, junto à inserção muscular próxima às patas; 3a. inoculação - (quatro semanas após a primeira) - antígeno diluído em salina fisiológica (400 µg de Prot./animal), administrado via intradérmica em quatro locais no dorso depilado ao animal; após a terceira inoculação as que se seguiram foram executadas nas mesmas condições até que se obtivesse nos locais de inoculação intradérmica, reação inflamatória tipo Reação de Arthus (não foi feito exame para a interpretação histológica desta reação), sangrias eram realizadas, sempre que obtivesse reação inflamatória positiva; o sangue foi processado e os sôros catalogados e mantidos a -20°C.

(4) Denominação abreviada utilizada arbitrariamente, para designar de uma maneira sumária, dentro dos capítulos deste trabalho, os exemplares de *Tayassu tajacu* (LINNÉ, 1758).

2.4. Imunização de Tayassu tajacu(L.) com ovalbumina.

O esquema de imunização utilizado foi: 1a. inoculação - ovalbumina emulsificada em adjuvante de Freund completo (50 mg de Prot./animal de 40 a 50 quilos de peso), injetado via subcutânea nas quatro patas; 2a. inoculação (três semanas após a primeira) - antígeno diluído em salina fisiológica (10 mg de Prot./animal), injetado via intramuscular em quatro regiões próximas às patas; 3a. inoculação (quatro semanas após a primeira) antígeno diluído em salina fisiológica (400 µg de Prot./animal), injetado via intradérmica em quatro locais na pele do ventre do animal; se seguiram outras inoculações com intervalo de uma semana até se obter nos locais da inoculação intradérmica, reação inflamatória tipo Reação de Arthus; ao se obter reação inflamatória positiva foi feita a sangria. O sangue colhido foi processado e os sêros individuais catalogados e estocados a -20°C.

2.5. Fracionamento de sêro imune de Tayassu tajacu(L.) por cromatografia em DEAE-celulose.

A resina de DEAE-celulose (DE-52 Whatman) foi equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8,0. O sêro imune de Tayassu (40 ml) foi dialisado durante 18 horas contra o tampão de equilíbrio da resina. Após a

diálise o soro foi centrifugado à 40 000Xg por 20 minutos; o precipitado (Euglobulina), foi dissolvido em tampão 0,1M pH 8,0 e estocado a -20°C . O sobrenadante (Pseudoglobulina), foi passado através de coluna de DEAE- celulose (5,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura). Foi utilizado fluxo descendente de 30 ml/hora. As frações eluídas em fosfato 5mM pH 8,0 e NaCl 1 M, foram coletadas em coletor GILSON, num volume de 5,0 ml/tubo e as leituras realizadas em comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ II, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

2.6. Filtração em gel.

Para a filtração em gel, foi utilizada a coluna de vidro de procedência Pharmacia Upsalla (2,5 x 100 cm) "empacotada" com Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), entumescido em tampão fosfato 0,05 M pH 8,0 ; o volume útil de gel foi de 451 ml. Foram aplicados 2,0 ml de material, contendo 160 mg de proteína, previamente dialisada contra o tampão de equilíbrio do gel; as frações foram eluídas com o mesmo tampão. A coluna foi calibrada com Azul de Dextran, IgG de Coelho e Soro Albumina Bovina. Conhecidos os parâmetros V_0 , V_t e V_e , foram determinados os valores de K_{av} para a IgG e albumina, segundo LAURENT and KILLANDER (1964), utilizando-se a expressão:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av} = coeficiente de partição entre fase líquida e gel;

V_o = volume total eluido com uma substância que é completamente excluída do gel (volume "morto").

V_e = volume de eluição de cada uma das frações cujos valores estão compreendidos entre V_o e V_t (volume eluente).

V_t = volume total do leito de gel.

2.7. Precipitação específica em gel de ágar.

As técnicas de imunodifusão dupla, foram realizadas em gel de ágar (Ion Agar Oxoid nº 2) à 1%, em meio isotônico pH 7,2, segundo OUCHTERLONY (1958).

2.8. Eletroforese em acetato de celulose.

A eletroforese em acetato de celulose, foi realizada utilizando tampão veronal 0,05 M pH 8,0, fitas de 2,5 x 7,0 cm, gradiente de potencial de 35,7 volts/cm durante 45 minutos. As fitas foram coradas e submetidas à densitometria.

2.9. Análise imunoeletrorética.

A imunoeletrorforese foi realizada se gundo GRABAR e WILLIAMS (1953), em placas de vidro de 8,0 x 12,0 cm, contendo uma camada de 3 mm de ágar (Ion Ágar Oxoid nº 2) à 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8,6, com gradiente de potencial de 10 volts/cm, durante 2 horas. As placas foram sêcas e então coradas com negro de amido.

2.10. Cromatografia de afinidade.

Como suporte insolúvel foi utilizado poliaminopolistireno (PAP), acoplado por diazotação ao antígeno (ovalbumina) segundo GYENES e SEHON (1963) nas condições descritas por WEBB e LAPRESLE (1964).

Ao PAP foi adicionado ácido nitroso à 0°C, sob agitação constante; a presença de grupamento diazônio foi detectada com beta-naftol à 1% em solução alcoólica; após teste positivo, a resina foi lavada consecutivamente com as seguintes soluções: acetato de sódio 5%, uréia 5%, cloreto de sódio 0,15M e tampão fosfato 0,1 M pH 8,0. Após a lavagem, foi realizado teste com papel de amido para verificar a presença de ácido nitroso livre.

O acoplamento da resina com o antígeno foi realizado a 0°C, dissolvendo-se a ovaalbumina diretamente sobre a resina tratada, e o pH ajustado para 9,0 com hidróxido de sódio 0,5 N; a mistura foi deixada a 0°C, durante 24 horas sob agitação constante; os eventuais grupamentos diazônio livres, foram bloqueados com excesso de glicina. A resina de PAP acoplada ao antígeno (PAP-OVA), foi lavada com tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, para retirar o excesso de glicina e hidróxido de sódio.

Através da coluna de PAP-OVA, foram passados 10 ml de soro imune de Tayassu, contendo 80 mg de prot./ml, à temperatura de 5°C. O efluente foi coletado em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 e a resina lavada exclusivamente com o mesmo tampão. Os anticorpos foram eluídos em tampão Glicina-HCl 0,1 M pH 2,0, e rapidamente neutralizados com hidróxido de sódio 5 N.

2.11. Digestão pela papaína.

A digestão pela papaína foi efetuada segundo as condições descritas por PORTER (1959).

As imunoglobulinas IgG2 de Tayassu purificadas por cromatografia em DEAE-celulose, foram submetidas à digestão pela papaína (Worthington Biochemical Corporation) na relação enzima/substrato de 1:100 mg em presença de cisteína 0,1 M volume final de 10 ml e pH

ajustado para pH 7,0. Os tempos de incubação a 37°C, utilizados foram de 2, 5 e 15 minutos, 2 e 16 horas. A reação enzimática foi interrompida com iodoacetato 0,1 M pH 8,0, e o digesto submetido à análise imunoeletrorforética.

2.12. Purificação dos fragmentos obtidos pela digestão com papaína.

O digesto total (150 mg) dialisado em tampão fosfato 5 mM pH 8,0, foi aplicado em coluna de DEAE-celulose (DE-52 Whatman) equilibrada no tampão inicial de diálise; nestas condições foi obtido um primeiro pico de densidade ótica; a coluna foi "lavada" exaustivamente neste tampão e em seguida foi passada solução de NaCl 1 M, com a qual se obteve um segundo pico.

2.13. Dosagem de proteínas.

O teor de proteínas foi determinado pelo reativo de Biureto, segundo DITTEBRANDT (1948) e pela absorvância em comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro Zeiss PMQ II.

2.14. Hemaglutinação passiva.

A reação de hemaglutinação passiva foi realizada, utilizando hemácias de carneiro taninizadas segundo BOYDEN (1951), e sensibilizadas com antígeno de acordo com as instruções de BORDUAS e GRABAR (1953). Foi utilizada solução de ovalbumina na concentração de 200 µg de proteína para cada mililitro de suspensão de hemácias a 2,5%. Porções de 0,05 ml dessas hemácias foram misturadas a 0,5 ml de sôros imune diluidos, e incubadas à temperatura ambiente. Os controles foram: C1= hemácias taninizadas e sensibilizadas mais salina; C2 = hemácias taninizadas e não sensibilizadas mais sôro diluído a 1:500; C3 = hemácias não taninizadas mais sôro diluído a 1:500.

2.15. Anafilaxia cutânea passiva⁵.

As experiências de anafilaxia cutânea passiva (ACP), foram realizadas basicamente segundo OVARY (1958). Na pele ventral de porco doméstico com 15 dias de idade de 2 a 3 quilos, foram injetados intradermicamente, 0,1 ml de proteína com atividade de anticorpo,

(5) Agradecemos à diretoria do Instituto Biológico de Campinas, e em especial ao Dr. Wilson de Oliveira Viana pela cessão dos animais utilizados nesta prova.

contendo 0,5 a 1,0 mg de Prot./ml. Após três horas, foi inoculado por via endovenosa, o antígeno diluído em Aral de Evans a 1% na concentração de 500 µg de Prot./ml. Como controles foram utilizados salina fisiológica e soro albumina bovina na concentração de 1 mg/ml.

2.16. Fixação de complemento.

Para a realização da experiência de fixação de complemento, utilizou-se concentrações constantes de proteínas IgG2A, IgG2C e IgG-RC (150 µg/ml) com atividade de anticorpo. O antígeno foi utilizado em diferentes concentrações. Como fonte de complemento, utilizou-se soro obtido de 20 a 30 cobaias normais, liofilizado e armazenado a -20°C . O título do complemento foi expresso em unidades de CH 50/ml, conforme KABAT e MAYER (1964).

O sistema indicador foi constituído de hemácias de carneiro e hemolisina previamente titulada: o sangue estéril de carneiro, misturado em volumes iguais de solução de Alsever, foi preservado a 5°C e utilizado como fonte de hemácias. No momento do uso, as hemácias foram lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato 0,15 M pH 7,2. As suspensões preparadas foram padronizadas de modo que, quando diluídas vinte vezes em água desionizada, se obtivesse absorbância de 0,420, em comprimento de onda de 550 nm, no espectrofotômetro

Colemann Jr., utilizando-se tubos de 10 x 120 mm. O tampão utilizado para as experiências de lise específica, foi o tampão veronal 0,15 M pH 7,4, contendo cálcio, magnésio e gelatina a 0,1%.

Para a determinação da porcentagem de lise, incubaram-se volumes iguais de hemácias padronizadas e hemolisina, a 37°C por 30 minutos, obtendo-se hemácias sensibilizadas. As proteínas com atividade de anticorpo, contendo 150 µg de Prot./ml. foram misturadas com ovalbumina em diferentes concentrações, e hemácias sensibilizadas. Os controles foram constituídos de complemento e antígeno e complemento e anticorpo, sendo o branco da reação constituído de hemácias sensibilizadas e tampão veronal. Todas as misturas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, as misturas foram mantidas em banho de gelo e o complemento foi adicionado aos tubos de reação com exceção do branco. Após incubação a 37°C durante 45 minutos, o grau de lise foi determinado através de leitura de absorbância a 550 nm.

3. RESULTADOS

3.1. Análise eletroforética da resposta imune de Tayassu tajacu(L.)

Por eletroforese em acetato de celulose seguida de densitometria (Fig.2), pode-se observar no soro imune de Tayassu, um desdobramento da região de beta globulina em três componentes, arbitrariamente designados beta a, beta b e beta c; na região de gamaglobulina é nítida a presença de pelo menos duas populações proteicas, por nós denominadas de gama a e gama b contendo respectivamente 7 e 15% das proteínas totais presentes no soro. No soro do animal não tratado com o antígeno já existe indício de desdobramento na região de gamaglobulina.

3.2. Cromatografia em DEAE-celulose do soro imune individual de Tayassu tajacu(L.)

A figura 3, mostra uma análise cromatografica típica da fração pseudoglobulina de soro imune de Tayassu em DEAE-celulose, equilibrado em tampão fosfato 5 mM pH 8,0. Foram obtidos dois picos de densidade ótica, denominados A e C, em tampão fosfato 5 mM pH 8,0. Pouca proteína foi eluida da coluna depois de

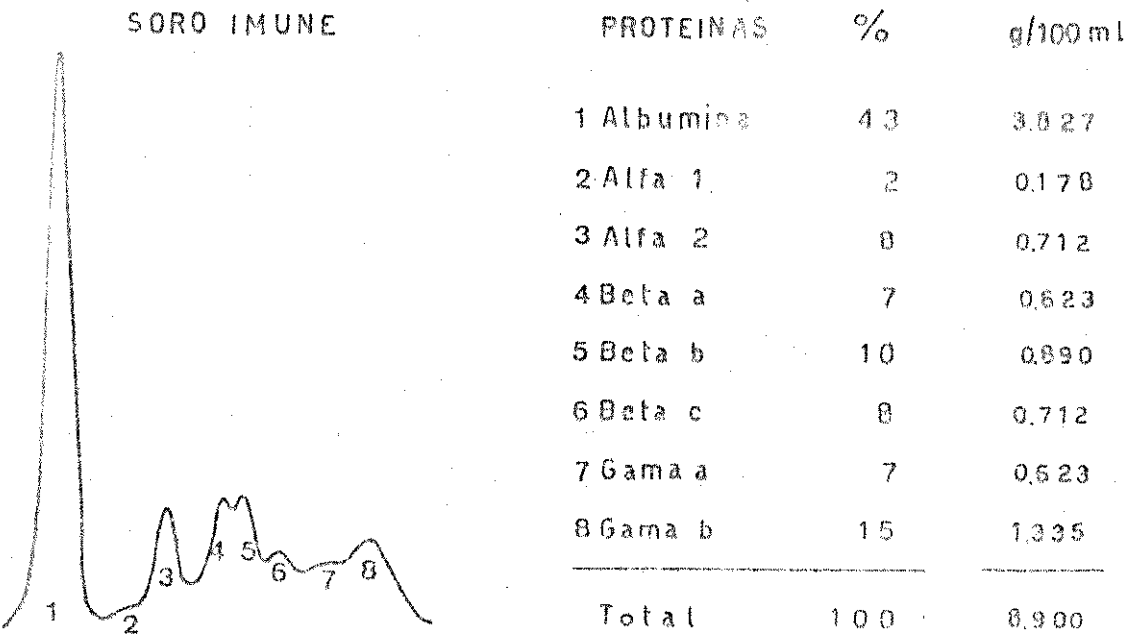
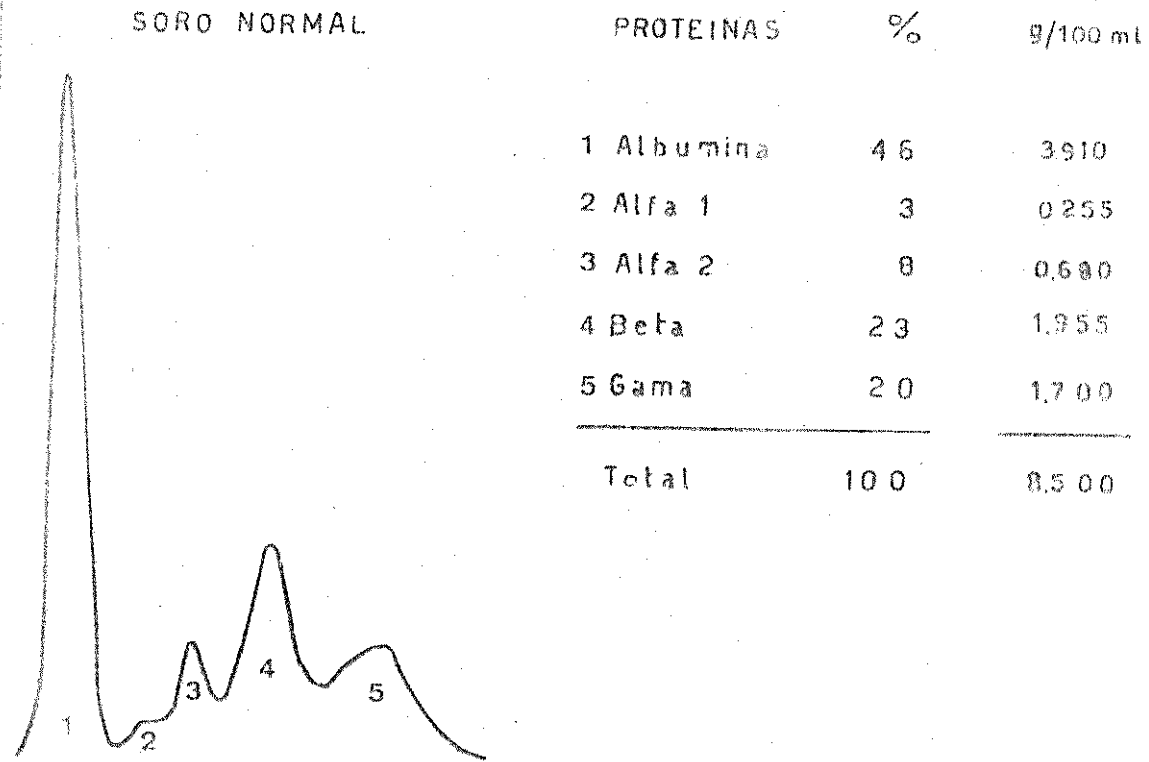


FIG.2 - Traçado densitométrico da eletroforese em acetato de celulose do soro imune de Tayassu(TAY-a-OVA), e do soro de animal não imunizado (TAY SN). No soro imune se verifica o desdobramento da região beta em três componentes(a, b, c) e da região gama em pelo menos dois bem distintos

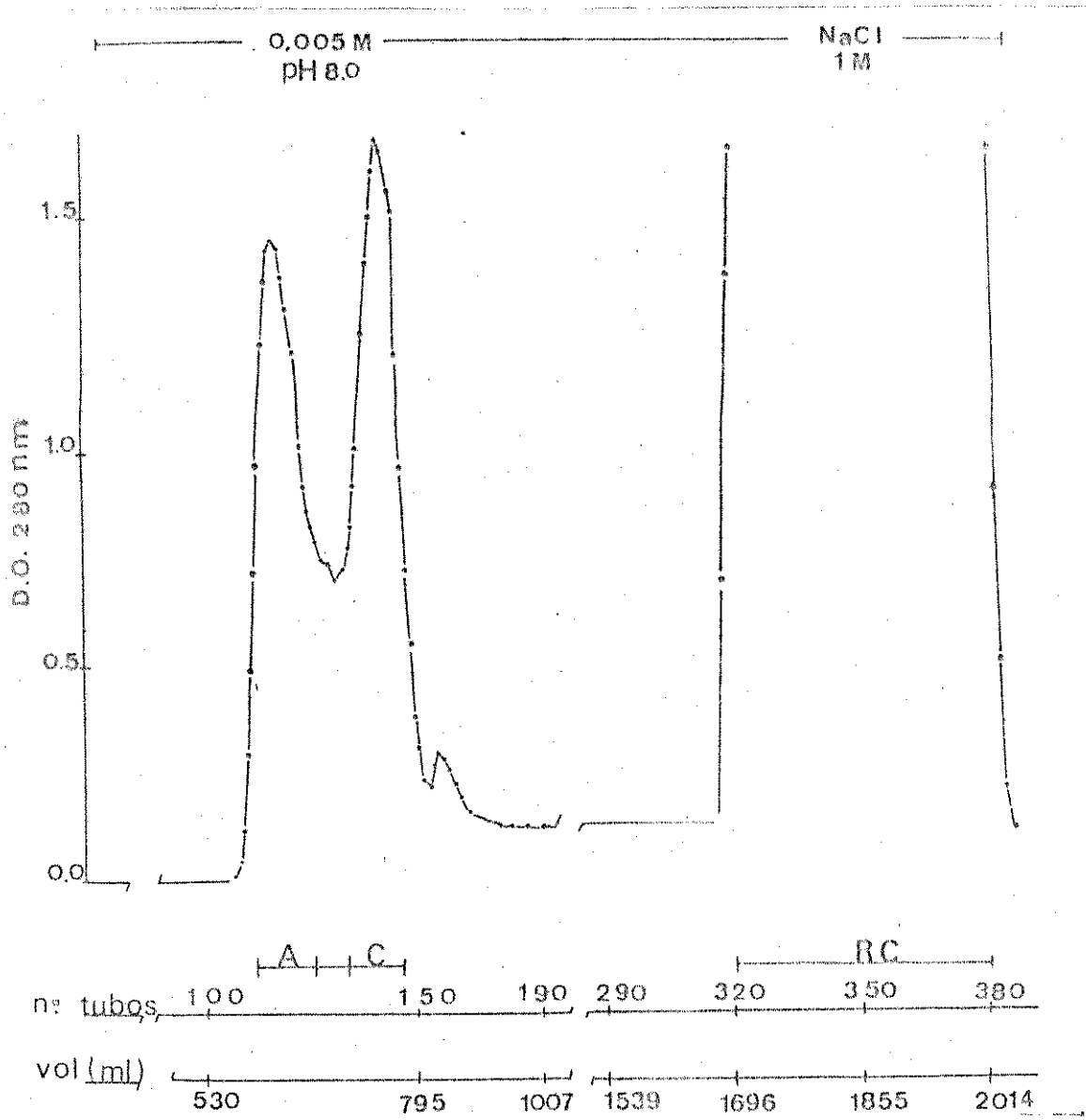


FIG.3 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose (5,0 x 40,0 cm), equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8,0 (condutividade 800 uS/cm à temperatura ambiente) da fração pseudoglobulina de soro de Tayassu, imunizado com ovalbumina. Observar o desdobramento na região de gama no tampão inicial, correspondente aos "pools" IgG2A e IgG2C; a fração RC representa o total das proteínas reti- das na coluna e eluidas em NaCl 1 M.

fração C. Após a densidade ótica ter caído a níveis constantes, foi aplicada à coluna, solução de cloreto de sódio 1 M, para remover as proteínas adsorvidas à resina no tampão inicial; essas proteínas foram denominadas fração RC. As frações A e C foram obtidas também de cromatografia em DEAE-celulose de sôros individuais de animais não imunizados.

A heterogeneidade molecular observada na fração eluída em fosfato 5 mM, indica por analogia ao sistema cobaia (WHITE, JENKINS and WILKINSON, 1963; BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; OSLER, OLIVEIRA, SHIN and SANDBERG, 1969; OLIVEIRA, OSLER, SIRAGANIAN e SANDBERG, 1970), a presença de duas populações moleculares de comportamento cromatográfico tipo IgG2.

3.3. Caracterização imunoeletroforética das frações obtidas por cromatografia de troca iônica, do soro imune de Tayassu tajacu (L.)

As diferentes frações obtidas pela cromatografia de troca iônica, foram analisadas (Fig.4) utilizando-se como reagente soro de coelho imunizado com soro total de Tayassu; um arco de precipitação homogêneo foi obtido nas frações A e C, apresentando mobilidade eletroforética compatível com aquela das gamaglobulinas caracterizadas como IgG2A e IgG2C em cobaia. No soro to-

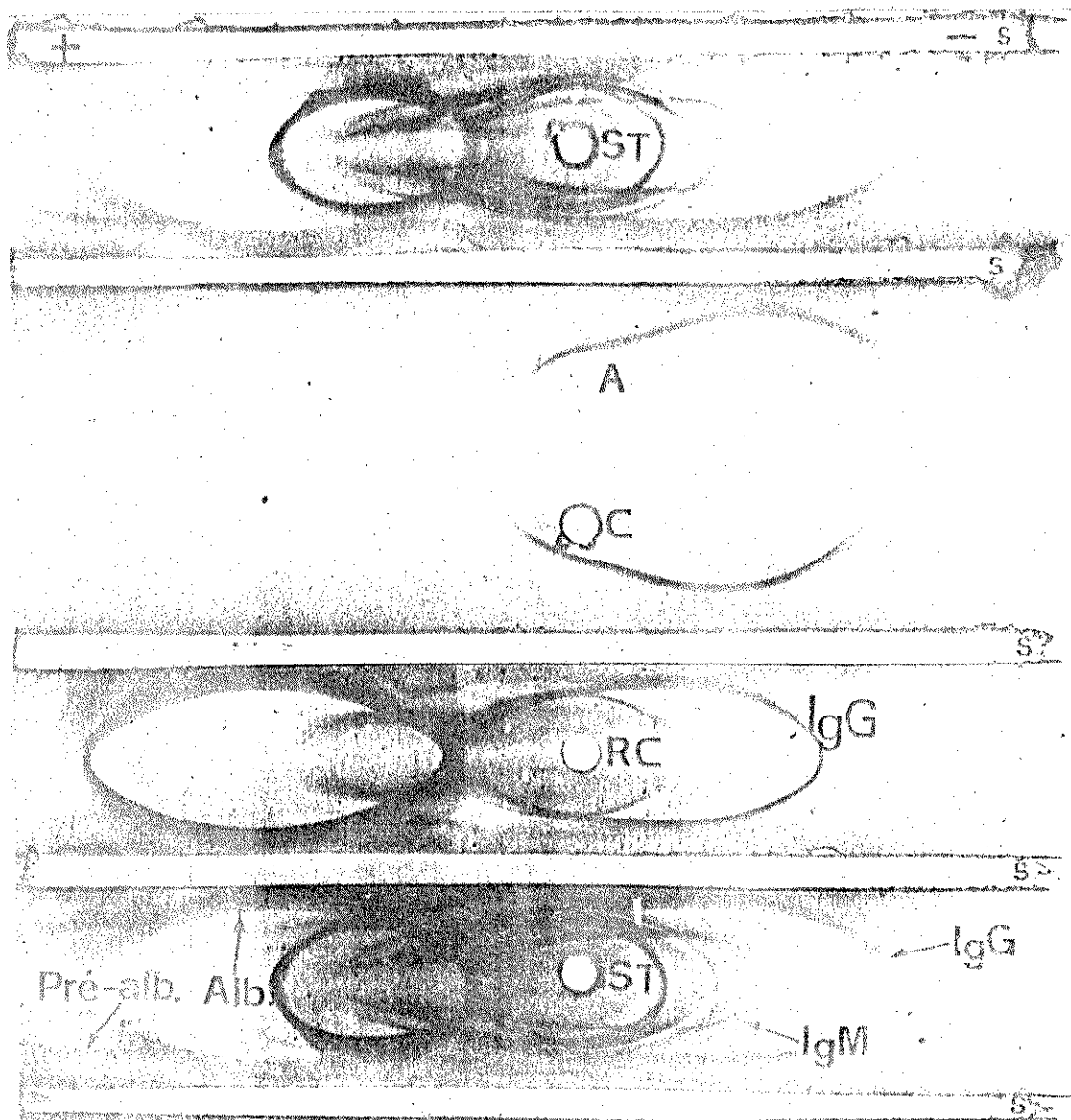
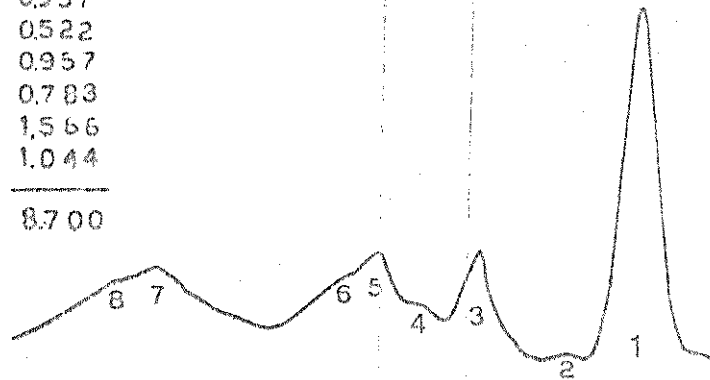


FIG.4 - Análise imunoeletroforética das frações A, C, e RC obtidas por cromatografia em DEAE-celulose, utilizando-se nas canaletas o sôro de coelho anti-sôro total de Tayassu tajacu(L.) (S=Ra-a-TAY); este anti-sôro reconhece diferentes proteínas séricas de Tayassu; (ST= sôro total de Tayassu) o mesmo anti-sôro distinguiu apenas um arco de precipitação no caso de A e C, o que demonstra o grau de pureza dessas frações; observar a diferente mobilidade eletroforética das populações A e C e aquela tipo IgG contida na fração RC. Estão indicadas as populações moleculares, IgG, IgM, Albumina e Pré-albumina, presentes no sôro de Tayassu.

PROTEÍNAS	%	g/100 ml	TAY-a-OVA
1 albumina	31	2,697	
2 alfa 1	2	0,174	
3 alfa 2	11	0,957	
4 beta a	5	0,522	
5 beta b	11	0,957	
6 beta c	9	0,783	
7 gama a	18	1,566	
8 gama b	12	1,044	
total	100	8,700	



PROTEÍNAS	%	g/100 ml	FRAÇÃO RC
1 albumina	37	3,145	
2 alfa 1	3	0,255	
3 alfa 2	12	1,020	
4 beta a	5	0,425	
5 beta b	11	0,935	
6 beta c	13	1,105	
7 gama a	19	1,615	
total	100	8,500	

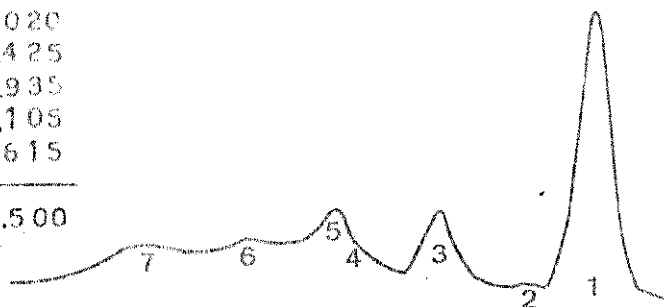


FIG.5 - Densitometria da eletroforese em acetato de celulose do soro imune de Tayassu e da fração RC. Na fração RC, a região equivalente à gamaglobulina de mobilidade eletroforética lenta (IgG2), praticamente corresponde à linha de base, o que fornece subsídio para interpretar a fração RC, como soro total esvaziado de gamaglobulinas lentas (IgG2).

tal esvaziado do IgG2 (fração RC), podemos notar a presença de um arco de precipitação de mobilidade eletroforética compatível com aquela descrita como IgG1 na cobaia (BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; OLIVEIRA, OSLER, SIRAGANIAN e SANDBERG, 1970).

3.4. Controle eletroforético em acetato de celulose, do fracionamento de soro imune de Tayassu tajacu(L.) em DEAE-celulose.

Na figura 5, observa-se que a fração RC, obtida de cromatografia em DEAE-celulose do soro de Tayassu anti-ovalbumina (esvaziada em gamaglobulinas tipo IgG2), quando submetida à eletroforese em acetato de celulose, mostra um perfil densitométrico indicativo da ausência de gamaglobulinas na região da gama lenta. No soro imune, observa-se um nítido aumento na região de gama rápida, região esta de migração eletroforética coerente com aquela das gamaglobulinas IgG1.

3.5. Filtração em gel de Sephadex G-200, do soro total, pseudoglobulina e fração RC de Tayassu tajacu(L.)

Os valores de Kav determinados para IgG e Albumina são comparáveis àqueles descritos na lite

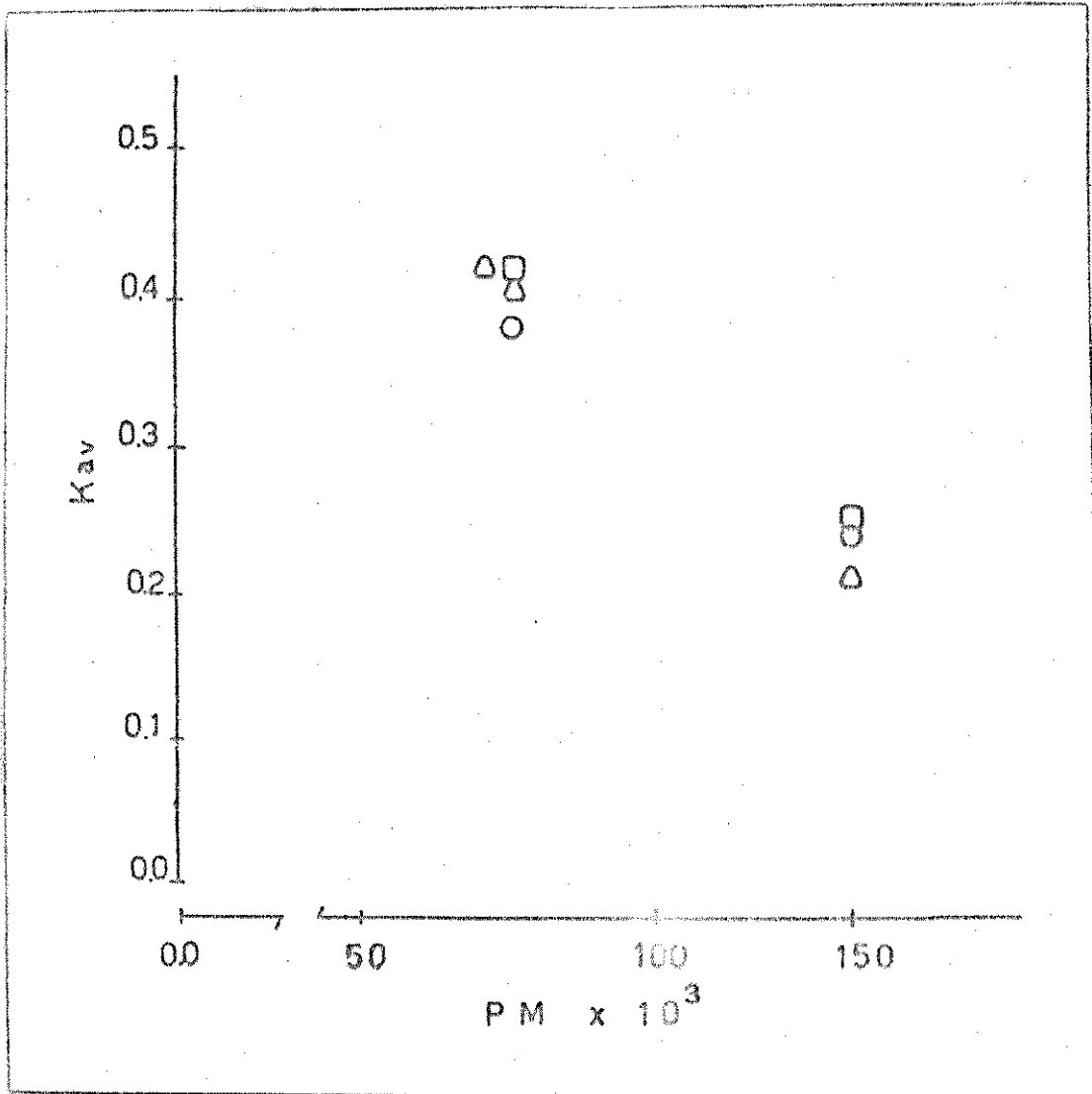


FIG.6 - Valores de K_{av} para IgG, Albumina e Hemoglobina em gel de Sephadex G-200. (\circ) valores determinados neste trabalho; (\square) valores obtidos de LAURENT e KILLANDER, 1964; (Δ) dados experimentais de DETERMANN e GELOTTE, 1964.

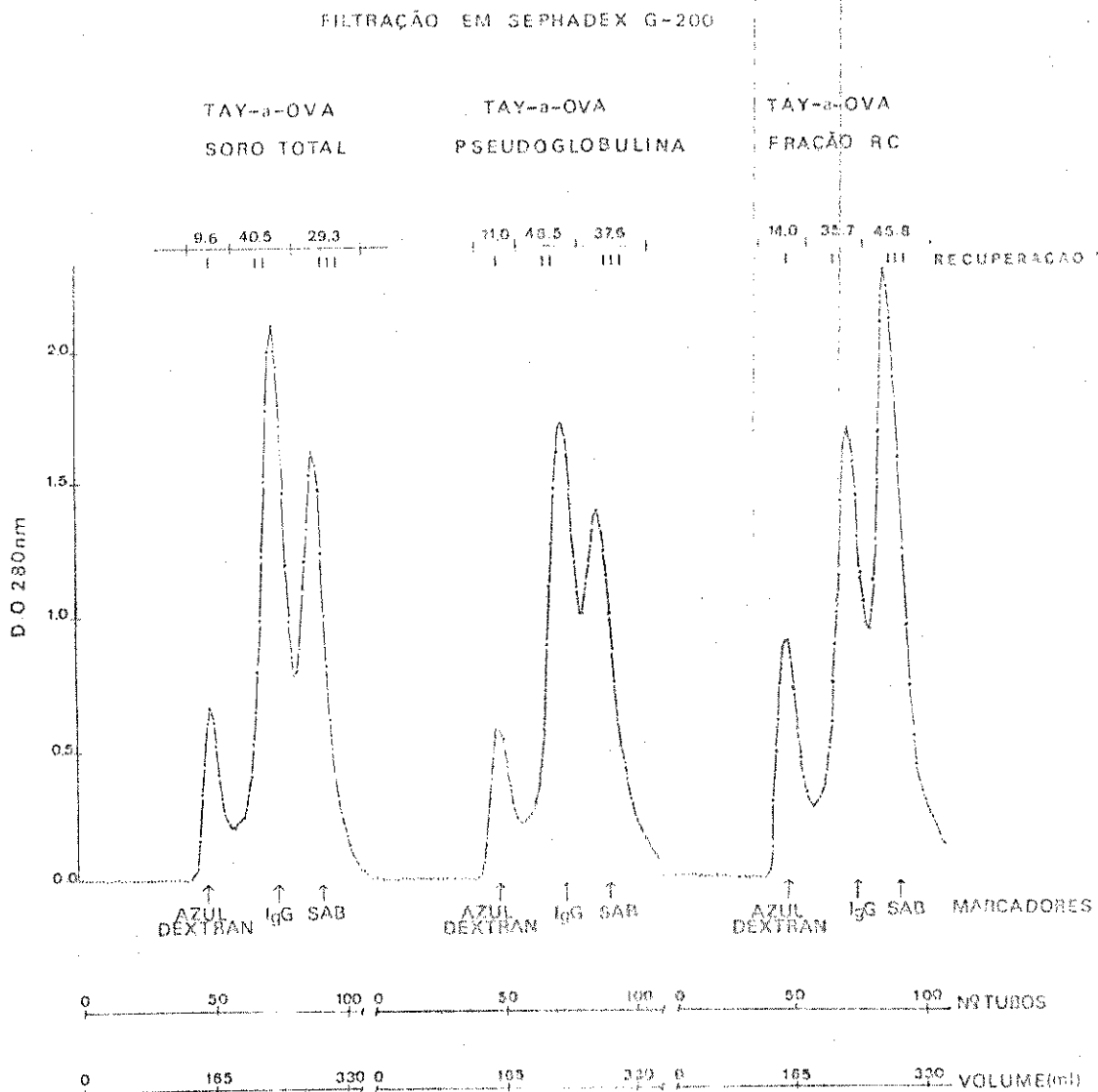


FIG.7 - Filtração em gel de Sephadex G-200, equilibrado em tampão fosfato 0,05M pH 8,0; utilizou-se coluna (2,5 x 90,0cm) tipo Pharmacia Upsalla, com fluxo ascendente de 8 a 10 ml/hora. Esta coluna foi calibrada com os marcadores Azul de Dextran (para a determinação de volume "morto", IgG de coelho purificada e albumina bovina de procedência Pentex. É comparada a filtração em gel (nas

mesmas condições experimentais) do soro total, fração RC e pseudoglobulina de Tayassu; a recuperação é expressa em termos de percentagem de unidade de densidade ótica recuperada em relação ao "input" na coluna. Notar que o soro total esvaziado de IgG2 (fração RC) ainda contém outra população de IgG que corresponde àquela detectada por imunoeletroforese na fração RC (Fig.4).

ratura (Fig.6) por LAURENT & KILLANDER, 1964.

A filtração em gel de soro total, pseudoglobulina e fração RC de Tayassu, é mostrada na figura (7). Nos três casos, pelo menos três picos de densidade ótica, denominados I, II e III, são evidentes. Os picos I, II e III podem ser interpretados como IgM, IgG e Albumina, respectivamente, pelos seus volumes de eluição. A fração RC submetida à filtração em gel, mesmo após ter sido esvaziada de IgG2 pela cromatografia em DEAE-celulose (Figs 3 e 4), mostra um pico de densidade ótica num volume compatível com IgG.

3.6. Caracterização imunoeletroforética das proteínas IgG, obtidas de filtração em gel de Sephadex G-200.

A análise imunoeletroforética das proteínas caracterizadas como IgG na filtração em gel, evidenciou dois tipos principais de imunoglobulinas IgG: um

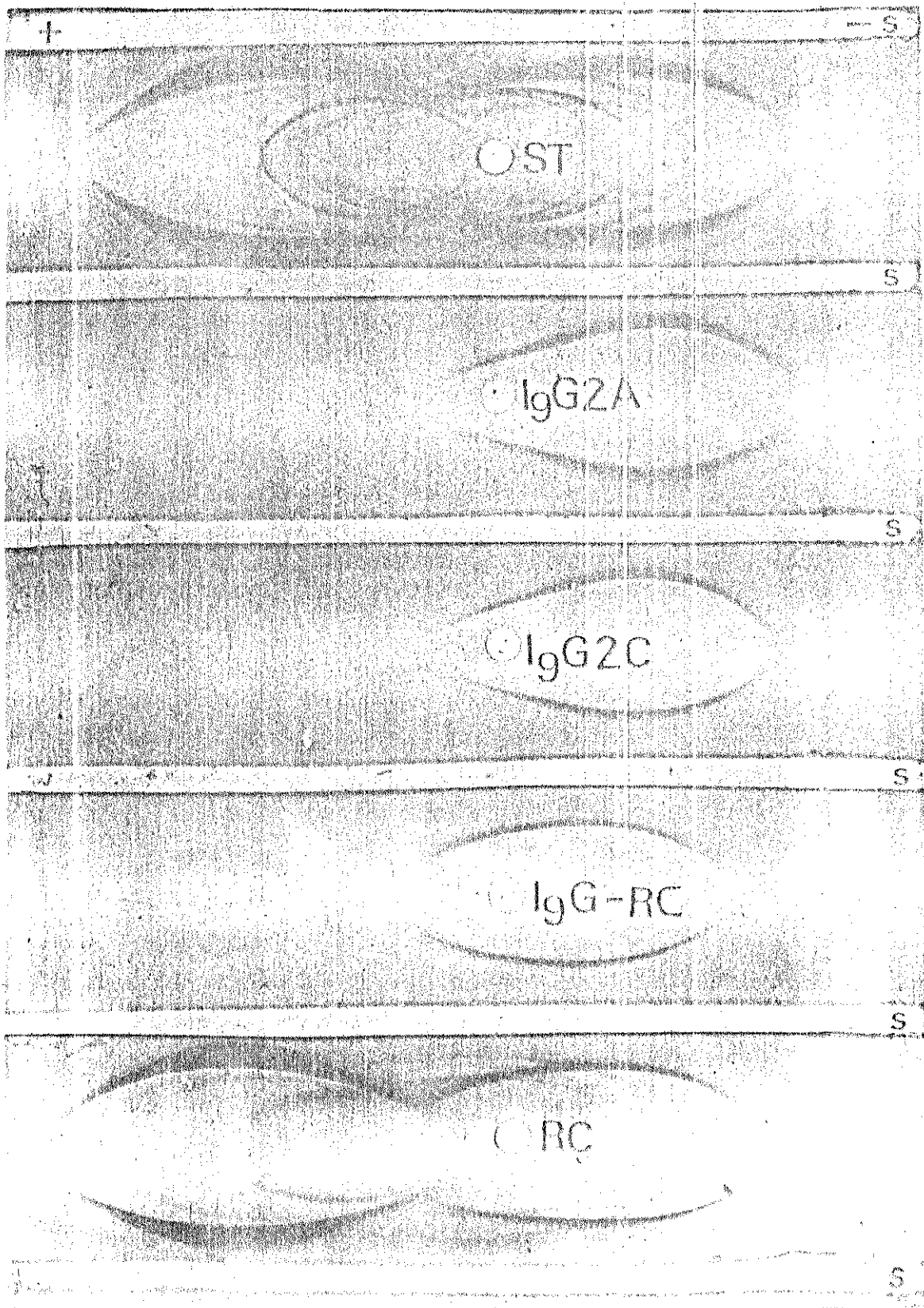


FIG.8 - Análise imunoelctroforética das proteínas tipo IgG, obtidas por cromatografia em DEAE-celulose e filtração em gel, reveladas por soro de coelho anti-soro total

de Tayassu. Observar a nítida diferença de mobilidade eletroforética entre a proteína IgG-RC e aquelas IgG2A e IgG2C obtidas de cromatografia em DEAE-celulose. ST=soro total de Tayassu; IgG2A= fração obtida em cromatografia em DEAE-celulose do soro total de Tayassu; IgG2C= fração de cromatografia em DEAE-celulose do soro total de Tayassu; IgG-RC= pico II da filtração em gel de Sephadex G-200, da fração RC; RC= soro total de Tayassu esvasiado de IgG2.

tipo IgG2 presente na fração pseudoglobulina e soro total e outro tipo IgG1 correspondente ao pico II da filtração em gel de RC (Fig.8). Na fração RC é evidente a mobilidade eletroforética tipo IgG1 como descrita no sistema cobaia (BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963).

3.7. Imunodifusão dupla das frações A, C e RC obtidas de cromatografia em DEAE-celulose, e a população tipo IgG1, obtida de filtração em gel de fração RC.

As experiências de imunodifusão dupla (Figs. 9 e 10), mostram identidade entre as frações A e C obtidas de cromatografia de pseudoglobulina de Tayassu imunizado com ovalbumina. Foi evidenciada um "esporão" entre as frações C e RC (Fig.9) e as frações A e IgG-RC (Fig.10), o que evidencia relação antigênica de identidade parcial entre as imunoglobulinas tipo IgG2 e tipo IgG1 de Tayassu.

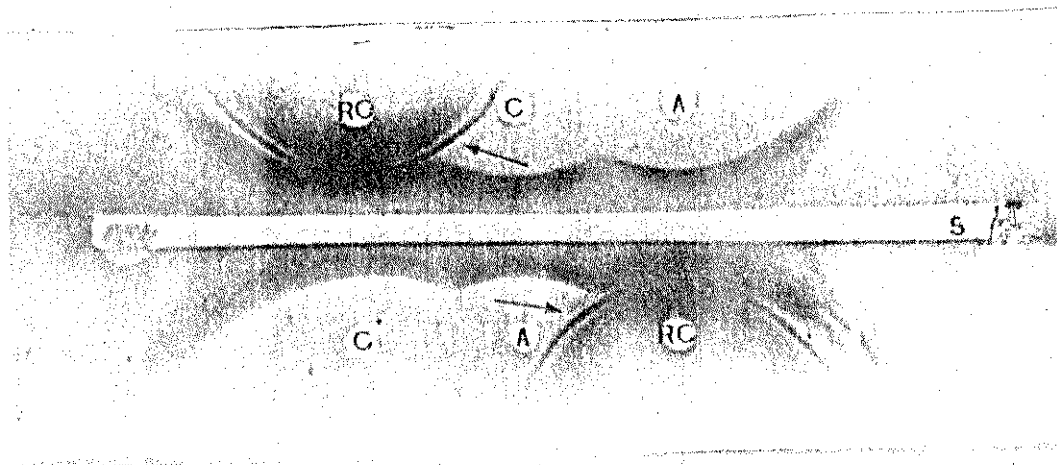


FIG.9 - Análise por imunodifusão dupla(OUCHTERLONY,1958) de IgG2A, IgG2C e fração RC, reveladas pelo soro de coelho anti-soro total de Tayassu(S); observe a relação de identidade entre IgG2A e IgG2C, e identidade parcial entre IgG2A e RC.

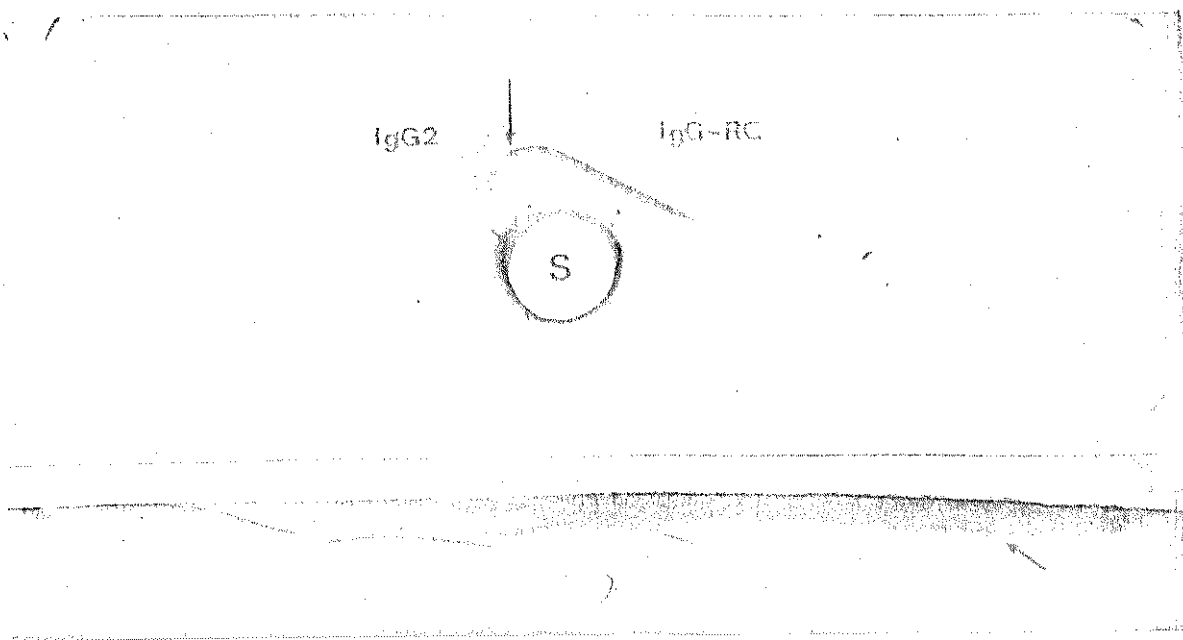


FIG.10A- Imunodifusão dupla (OUCHTERLONY,1958) de IgG2A e IgG-RC (obtida da filtração em gel da fração RC),utilizando-se no poço central soro de coelho anti-soro total

de Tayassu(S). A presença de um "esporão", demonstra relação de identidade parcial entre IgG-RC e IgG2A. FIG.10B
Identidade antigênica parcial entre as populações moleculares de mobilidade IgG2 e IgG1 do soro total de Tayassu imunizado com ovalbumina e revelado com soro de coelho anti-soro total de Tayassu (S=Ra-a-TAY). Observar o esporão que indica relação de identidade parcial entre as populações de mobilidade eletroforética tipo IgG2 e aquela semelhante de IgG1.

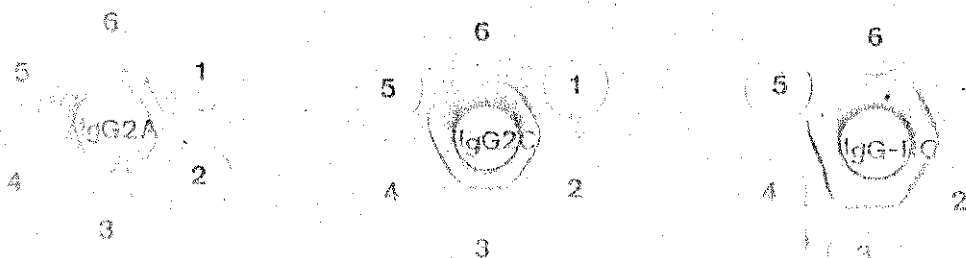


FIG.11 - Imunodifusão dupla (OUCHTERLONY, 1958) de IgG2A, IgG2C e IgG-RC (pico II da filtração de RC em gel de Sephadex) com ovalbumina; notar a atividade de anticorpo precipitante nas três populações. Estão indicadas as concentrações do antígeno testado (1= 100µg/ml; 2=200µg/ml; 3=500µg/ml; 4=1mg/ml; 5=1,5mg/ml; 6=2mg/ml).

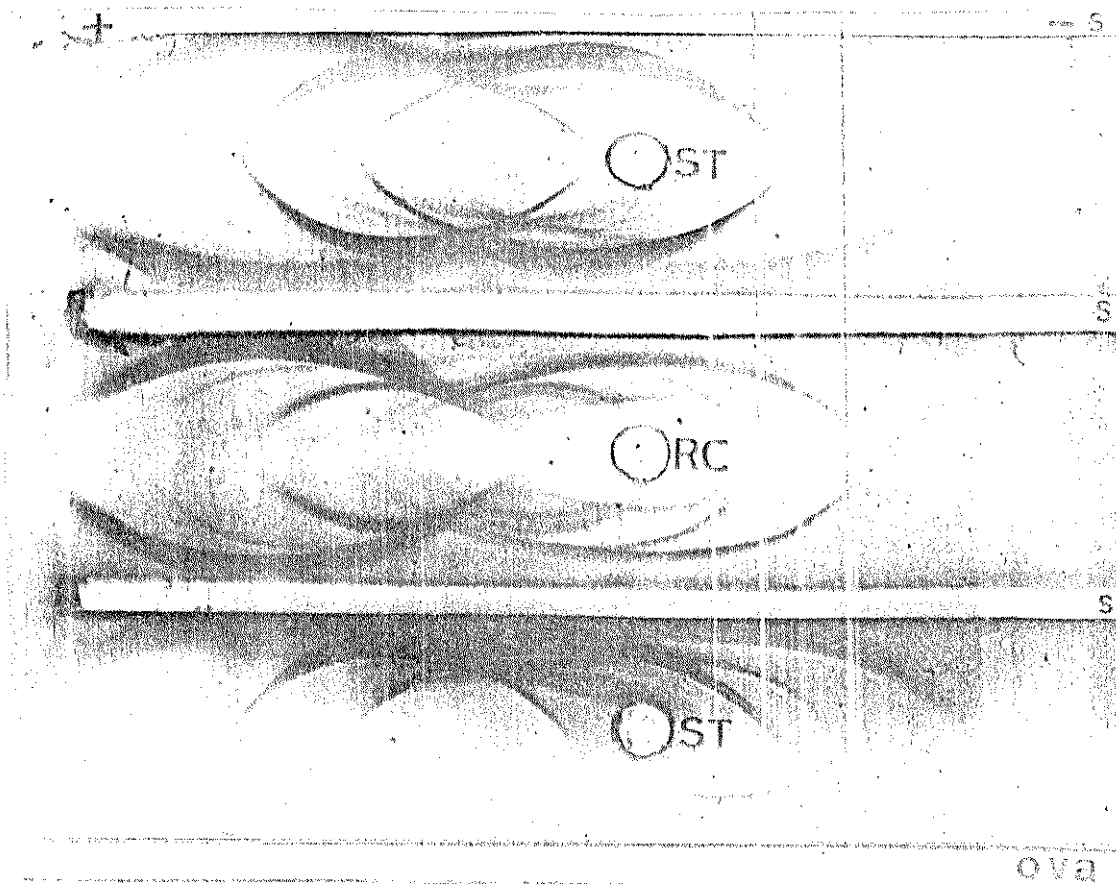


FIG.12 - Análise imunoeletroforética do soro imune de Tayassu(ST) com antígeno (OVA, 500µg/ml); observar um arco de precipitação visível na região compatível com anticorpos de mobilidade eletroforética idêntica à IgG1; não foi observado arco de precipitação com o antígeno na região de migração de IgG2. Como controles, nas mesmas condições experimentais, foram analisados o soro imune total de Tayassu(ST) e a fração RC obtida do fracionamento deste anti-soro em DEAE-celulose revelados por soro de coelho anti-soro total de Tayassu (S=Ra-a-TAY).

3.8. Demonstração de atividade de anticorpo por precipitação específica em gel de ágar, nas frações A, C, soro total de Tayassu tajacu(L.), e na fração IgG-RC (pico II da filtração de RC em gel de Sephadex).

A atividade de anticorpo no soro total, frações A, C e IgG-RC, foi demonstrada utilizando-se as técnicas de imunodifusão dupla em gel de ágar e imunoeletroforese (Figs.11 e 12). Na imunodifusão dupla o antígeno foi empregado nas concentrações de 0,1; 0,2 ; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg de Prot./ml. A imunoeletroforese do soro de Tayassu anti-ovalbumina, utilizando-se na canaleta o antígeno, mostrou um arco de precipitação na região de mobilidade compatível com a presença de imunoglobulinas IgG1 (Fig.12), não se observando reação de precipitação na região correspondente à migração de imunoglobulinas tipo IgG2.

3.9. Controle da digestão pela papaína da imunoglobulina IgG2 de Tayassu tajacu(L.)

Na figura 13, é mostrada a cromatografia típica de digestão durante 15 minutos pela papaína, aplicado em coluna de DEAE-celulose. A fração correspondente ao fragmento Fab, não interage com a parte ativa da resina na concentração de fosfato 5 mM pH 8,0, e passa

livremente pela coluna; os fragmentos Fc e Fc' são eluídos da coluna em NaCl 1 M. A figura 14, mostra o controle imunoeletroforético de uma digestão papaínica de 15 minutos, podendo observar-se a relação de não identidade entre o fragmento Fab e o fragmento Fc, bem como identidade parcial entre os fragmentos Fc e Fc', revelados por soro de coelho anti-soro total de Tayassu (soro I, Fig.14). Em tempos de digestão de 2 e 16 horas, o fragmento Fc', não foi revelado por este anti-soro, indicando que nestes tempos de digestão, o mesmo foi degradado em pequenos peptídeos. O soro I absorvido com fragmento Fab (soro II, Fig.14), perde conseqüentemente a capacidade de reconhecer os determinantes antigênicos contidos em Fab, reconhecendo apenas os determinantes antigênicos classe específicos localizados nos fragmentos Fc e Fc'.

3.10. Isolamento dos anticorpos do soro imune de Tayassu tajacu(L.) por cromatografia de afinidade.

As imunoglobulinas com atividade de anticorpo presentes no soro imune de Tayassu, foram isoladas por cromatografia de afinidade, utilizando-se poliaminopolistireno acoplado ao antígeno por diazotação. (Ver material e métodos). A análise imunoeletroforética, (Fig.15), demonstrou que as proteínas eluídas do imuno-adsorvente em meio ácido, era constituída de uma mistura de

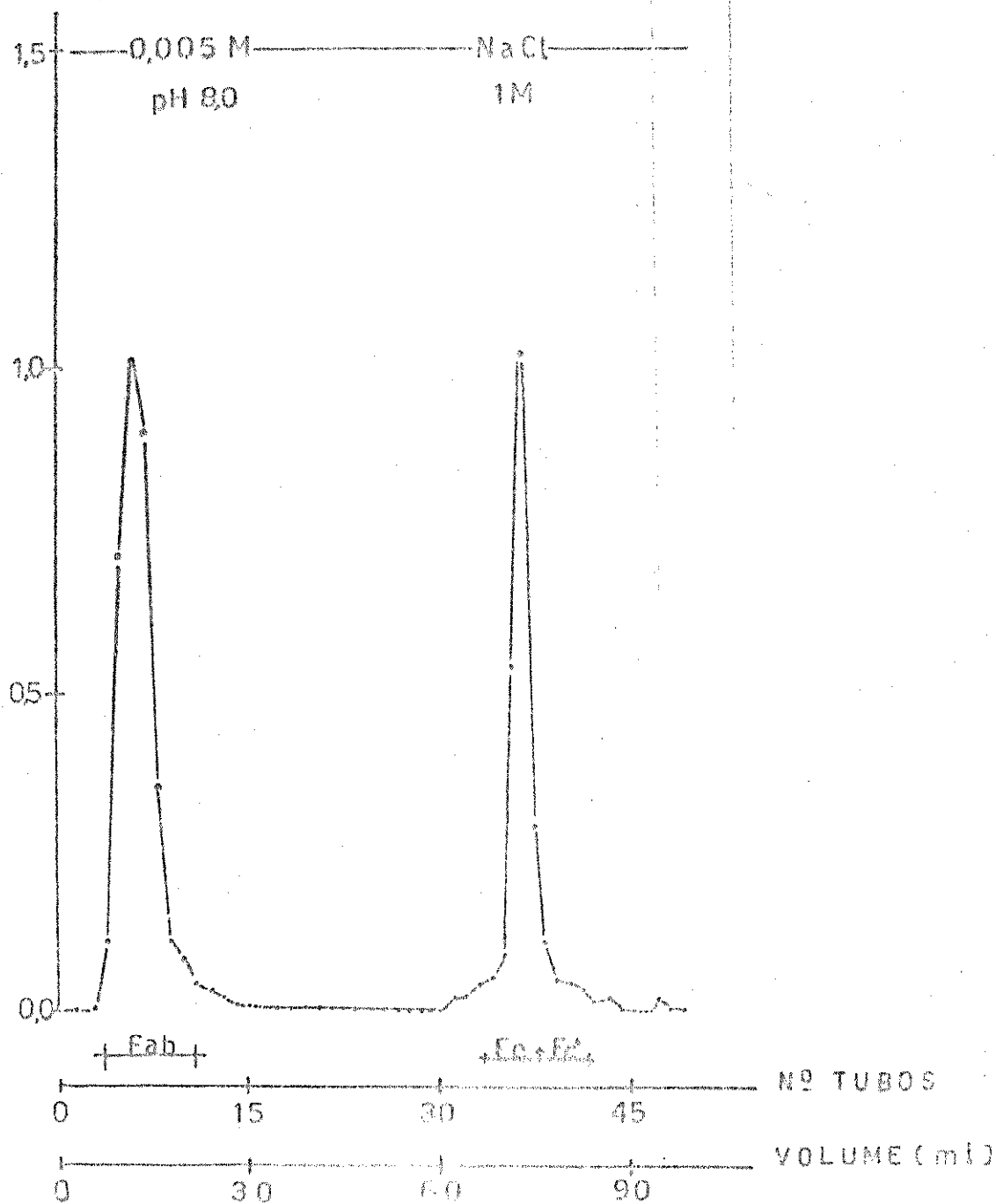


FIG.13 - Cromatografia do digesto obtido pela ação da papaína (tempo de digestão 15 minutos) em DEAE - celulose, equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8,0, coluna de (1,0 x 20,0 cm); o fragmento Fab, praticamente não interage com a resina neste pH e força iônica, passando livremente pela coluna; o material restante (Fc + Fc') foi eluído com NaCl 1 M.

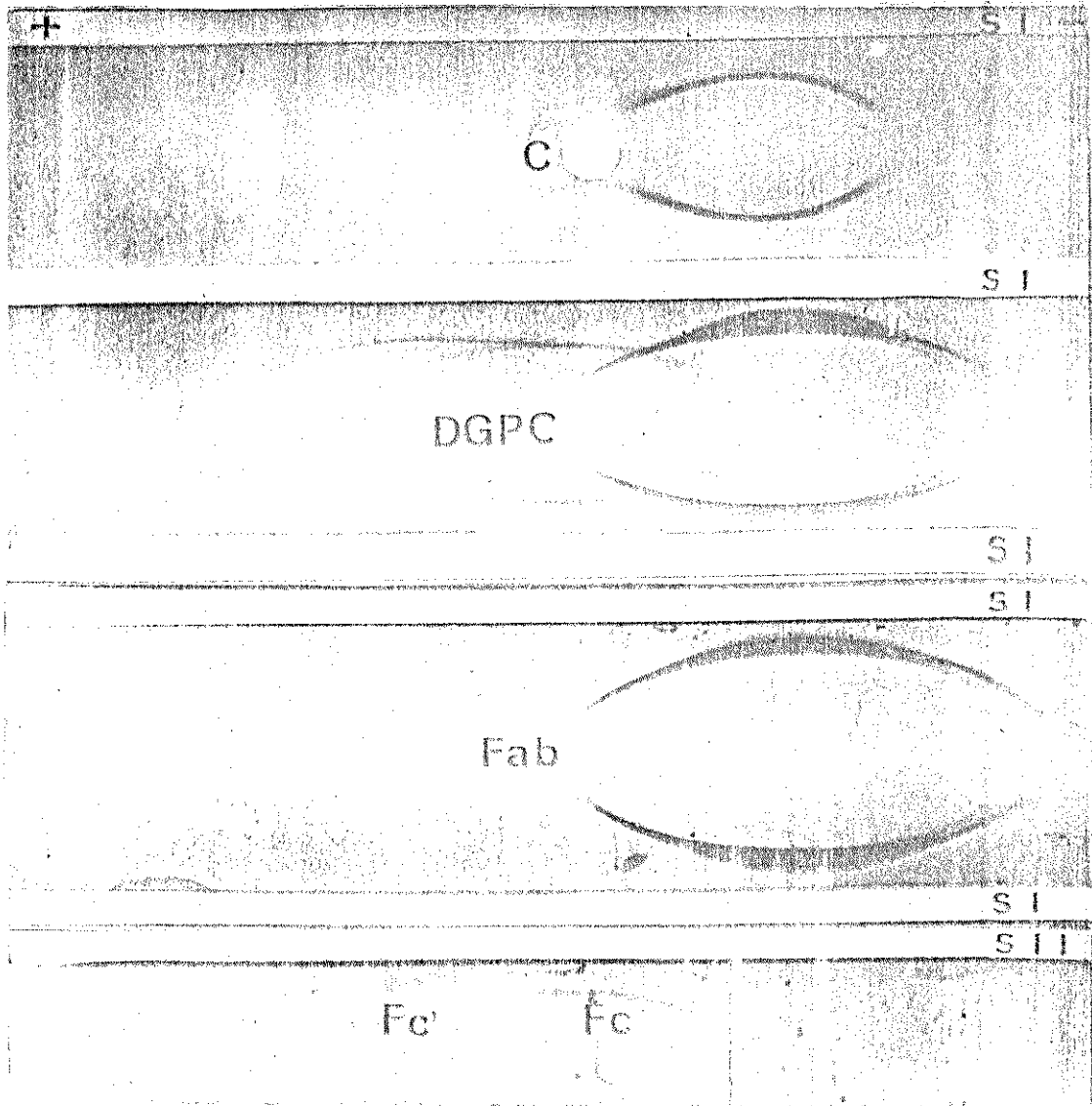


FIG.14 - Análise imunoelctroforética da digestão papaí-
nica de IgG2 de Tayassu, revelada com soro de coelho an-
ti-IgG2 de Tayassu(soro I) e com soro de coelho anti-IgG2
de Tayassu, absorvido com fragmento Fab (soro II). Obser-
var a presença dos fragmentos Fab, Fc e Fc' no digesto
total. Após a absorção do soro I com fragmento Fab (obti-

do de cromatografia em DEAE-celulose do digesto total , (Fig.13) o mesmo não é capaz de reconhecer os determinantes antigênicos presentes em Fab; em C, é indicada a molécula nativa antes da digestão, e em DGPC, o digesto total.

anticorpos IgG1 e IgG2. Pelo teste de imunodifusão dupla (Fig.16), ficou demonstrado que as proteínas eluídas da coluna de imunoabsorvente, não perderam a capacidade de reconhecimento específico, mesmo após a ação de ácido (tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,0).

3.11. Hemaglutinação passiva de hemácias sensibilizadas com o antígeno, pelas frações A e C (obtidas de cromatografia em DEAE-celulose de soro hiperimune de Tavassu tajacu(L.) (anti-ovalbumina), soro imune total e a fração IgG-RC (pico II da filtração de RC em gel de Sephadex).

O soro total como as frações A, C e IgG-RC, foram capazes de aglutinar hemácias sensibilizadas com o antígeno (Tabelas I e II). O maior título obtido, em termos de anticorpos hemaglutinantes foi aquele da fração IgG-RC que representa a população molecular de anticorpos de mobilidade IgG1.

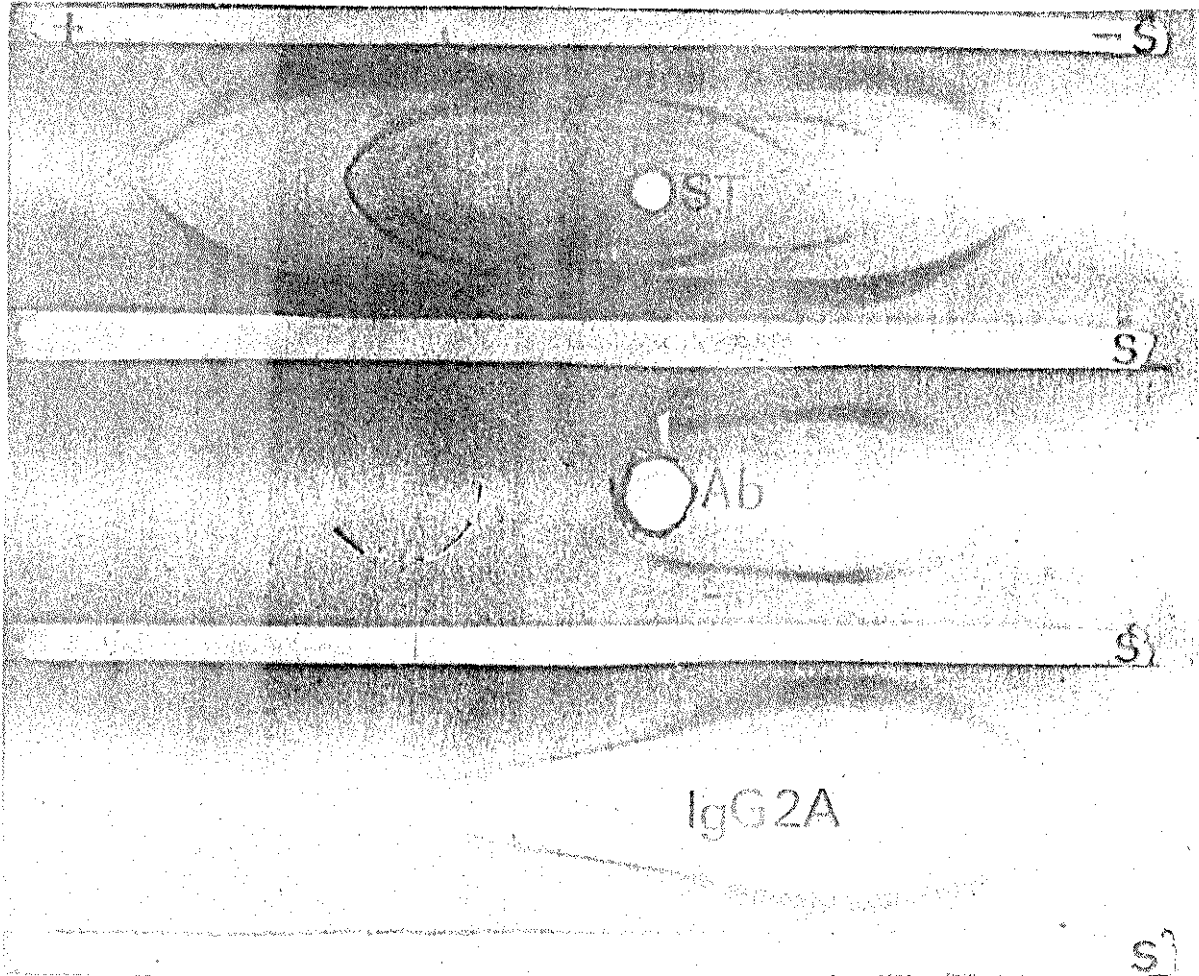


FIG.15 - Análise imunoeletroforética do anticorpo isolado (Ab-a-OVA) pelo procedimento de cromatografia de afinidade utilizando-se como suporte insolúvel PAP-OVA (ovalbumina acoplada por diazotação ao poliaminopolistireno, segundo GYENES e SEHON, 1960). A fração IgG2A utilizada como controle, demonstra que o anticorpo isolado tem mobilidade eletroforética característica de gamaglobulina. O exame do arco de precipitação, correspondente ao material eluído da coluna de imunoabsorvente, indica tratar-se de população heterogênea de anticorpos. Nas canale-

tas foi aplicado sôro de coelho anti-sôro total de Tayassu aplicado à coluna de imunoabsorvente; Ab= anticorpo eluído em meio ácido; IgG2A = primeiro pico de densidade ótica obtido da cromatografia de sôro imune total de Tayassu em DEAE.celulose.

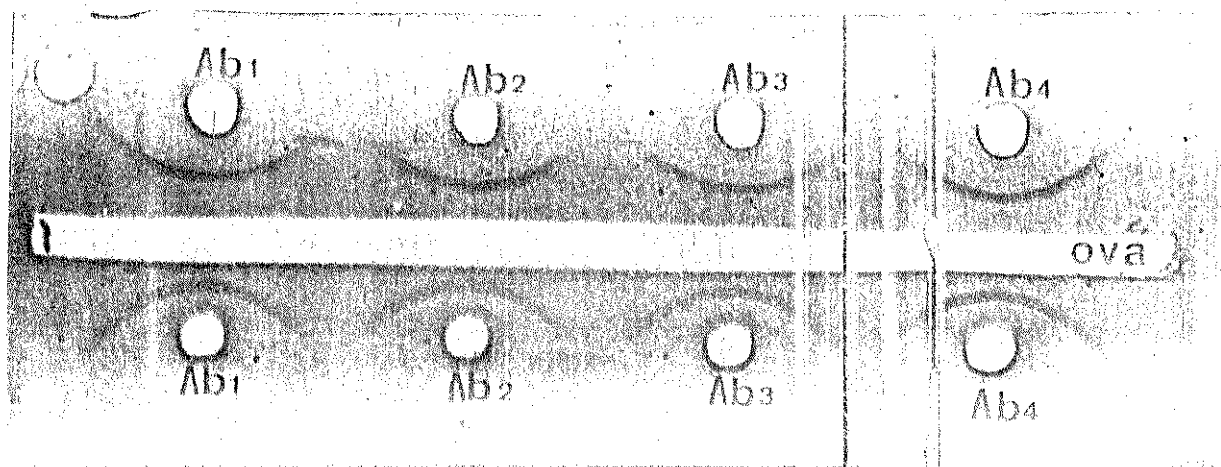


FIG.16 - Imunodifusão dupla (OUCHTERLONY,1958) do eluato da cromatografia de afinidade. Os anticorpos obtidos de diferentes cromatografias (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4), não perderam a capacidade de reconhecimento específico, mesmo após eluição em meio ácido (tampão Gly-HCl 0,1M pH 2,0). Foi aplicada na canaleta a ovalbumina na concentração de 500µg/ml.

3.12. Anafilaxia cutânea passiva (ACP) induzida na pele heteróloga de porco doméstico, pelas imunoglobulinas do soro hiperimune de Tayassu tajacu(L.)

A tabela III, mostra que o soro de Tayassu imunizado com ovalbumina, é capaz de sensibilizar a pele heteróloga de porco doméstico (nas condições descritas em material e métodos). Dentre as imunoglobulinas separadas pode-se verificar que aqueles de mobilidade característica de IgG2 (IgG2A e IgG2C) não são capazes de desencadear a reação de ACP na pele heteróloga de porco doméstico; a imunoglobulina capaz desta atividade está contida na fração IgG-RC; foi considerada positiva a reação de 10 mm na pele.

3.13. Fixação de complemento pelas imunoglobulinas presentes no soro hiperimune de Tayassu tajacu(L.)

Os resultados representados na figura 17, demonstraram que as imunoglobulinas IgG2A e IgG2C são capazes de ativar o sistema complemento de cobaia pela via clássica; as imunoglobulinas tipo IgG1 de Tayassu não tem esta propriedade. Esta figura mostra ainda que ao se expressar o complemento fixado em função da concentração de antígeno, obtem-se como esperado, uma curva se

melhante àquela da precipitação em meio líquido (MAYER, OSLER, BIER & HEIDELBERGER, 1948). Os resultados obtidos expressos desta maneira, mostram que o anticorpo IgG2A é mais eficiente que o anticorpo IgG2C no desencadeamento da ativação da via clássica de interação com o complemento.

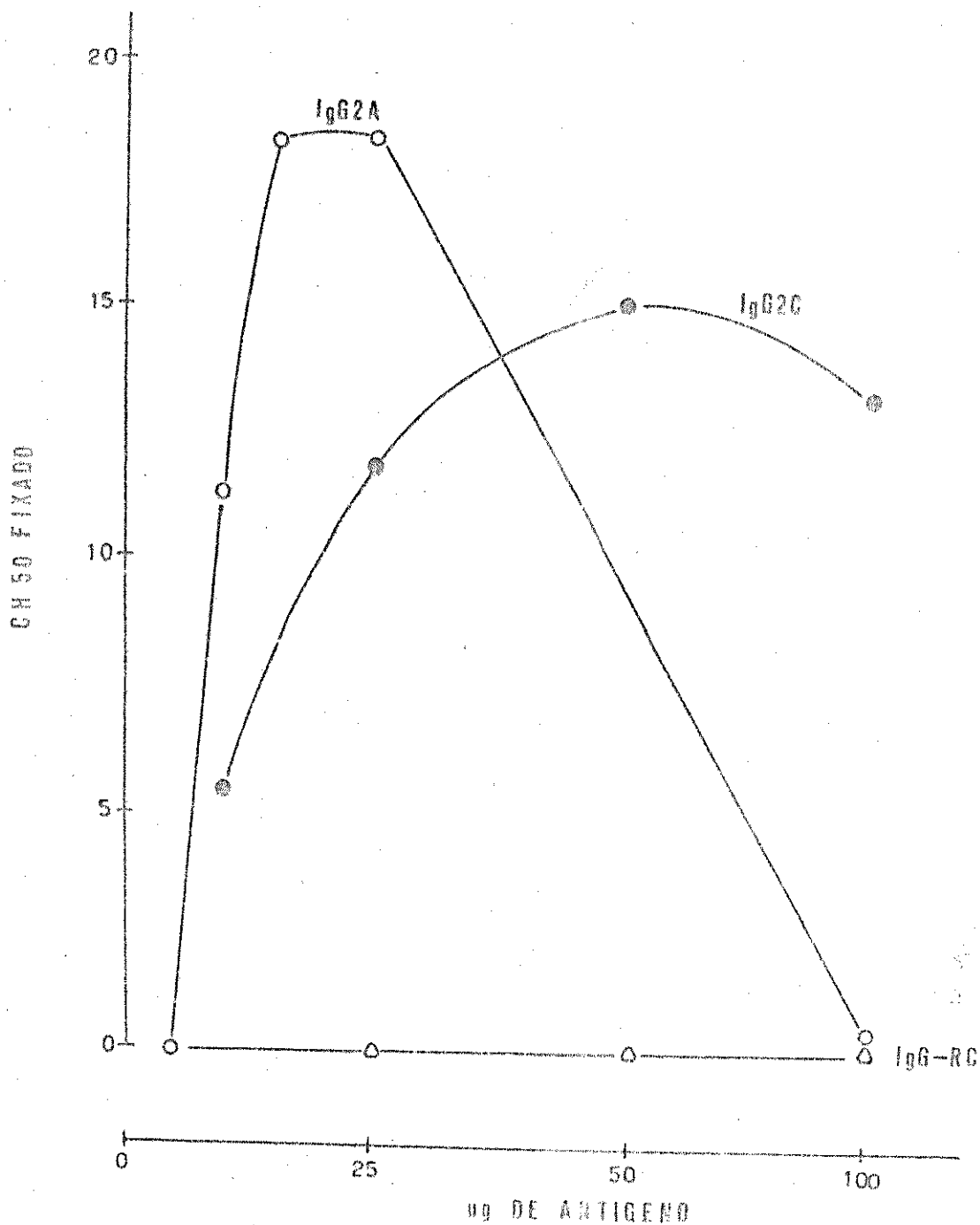


FIG.17 - Fixação de complemento pela via clássica das imunoglobulinas IgG2A, IgG2C e IgG-RC. Esta figura mostra a fixação de complemento em função da concentração de antígeno, mantendo-se constante a concentração de anticorpo (150ug de Prot.Ab/ml), quantificado em termos de anticorpo precipitante. Observe-se que o anticorpo IgG2A(○) é capaz de fixar complemento com maior eficácia que o anticorpo IgG2C(●) e que o anticorpo contido na fração IgG-RC(Δ) não é capaz de interagir com o sistema complemento pela via clássica (DAWOOD, ARITA, OLIVEIRA, resul-

TABELA I

Hemaglutinação passiva de hemácias sensibilizadas em ovalbumina, devida ao soro imune TAY-a-OVA e IGG-RC (IgG1) *

ARAÚJO, A.L.; ARITA, M.S. e OLIVEIRA, B. +

Soro Imune	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	Diluições dos séros imune a 1: Controles		
										C1	C2	C3

TAY-a-OVA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IGG-RC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

C1 = hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C2 = hemácias taninizadas não sensibilizadas + soro diluído a 1:500

C3 = hemácias + soro diluído a 1:500

(*) IGG-RC = pico II da filtração em gel da fração RC obtida de cromatografia em DEAE-celulose de soro imune; mobilidade eletroforética compatível com IgG1 de cobaita.

(+) Resultados não publicados.

TABELA II

Hemaglutinação passiva de hemácias sensibilizadas com ovalbumina
devida à fração IgG2* do soro TAY-a-OVA e às sub-populações A e C*

ARAÚJO, A.L.; ARITTA, M.S. e OLIVEIRA, B.†

Frações	Diluições dos séros imune a I :										Controles		
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	C1	C2	C3		

IgG2	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

A (IgG2A)	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

C (IgG2C)	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

C1 = hemácias taninizadas e sensibilizadas + salina

C2 = hemácias taninizadas não sensibilizadas + fração do soro diluído a 1:100

C3 = hemácias + fração do soro diluído a 1:100

(*) Frações obtidas de cromatografia em DEAE-celulose de soro imune (TAY-a-OVA).
 (†) Resultados não publicados.

TABELA III

Anafilaxia cutânea passiva em pele heteróloga induzida por imunoglobulinas de *Tayassu* sp, imunizado com ovalbumina (TAY-a-OVA)

Material inoculado	Mobilidade eletroforética	Concentração de proteínas por local (0,1 ml)	ACP *
Sôro total (TAY-a-OVA)		100 µg	+
Fração A **	IgG2	80 µg	-
Fração C **	IgG2	100 µg	-
Fração IgG-RC **	IgG1	50 µg	+
S A B		100 µg	-
NaCl 0,15 M			-

(*) Reação de ACP executada segundo Ovary, (1958) com período de latência de três horas; o Azul de Evans à 1% mais o antígeno (500 µg de Prot./ml) em volume de 2,0 ml, foram inoculados via endovenosa; por via intradérmica, as frações testadas foram injetadas via intradérmica na pele heteróloga (0,1ml fração/1cent) Foi considerada positiva a reação de 10mm na pele do porco doméstico, de vinte dias de idade e pesando em torno de 3 quilos.

(**) Frações A e C obtidas de cromatografia em DEAE-celulose e fração IgG-RC (pico II da filtração de RC em gel de Sephadex.

4. DISCUSSÃO

É muito importante desenvolver-se esquema de imunização que leve a uma síntese relativamente alta de anticorpos tipo IgG1; êste anticorpo está presente em concentração baixa em soros "normais" de animais classicamente utilizados em modelos experimentais de estudo da estrutura química - atividade biológica de imunoglobulinas como o camundongo e a cobaia. No soro "normal" de cobaia e camundongo, a concentração de anticorpos IgG1 é cêrca de dez vezes menor que a de IgG2 (BINAGHI, 1973).

A análise da resposta imune de Tayas su através de eletroforese, mostra desdobramento na região de gamaglobulina que se acentua na hiperimunização; é nítida a discriminação de pelo menos duas populações na região de gamaglobulina acompanhada de aumento no teor de gamaglobulinas mais rãpidas em relação ao anôdo (Fig. 5); as gamaglobulinas de migração mais rãpida se localizam em zona de mobilidade eletroforética compatível com aquela da imunoglobulina IgG1 de cobaia, o que pode ser visualizado na figura 4. Assim, a eletroforese em acetato de celulose de soros individuais de Tayassu, indica que o esquema de imunização utilizado para este animal, leva a um incremento preferencial na síntese de imunoglobulinas tipo IgG1, o que favorece nesta espécie animal,

estudos comparativos entre populações moleculares comprometidas com a expressão de diferentes tipos de atividade biológica, tema atual que tem sido motivo de inúmeros trabalhos realizados em outros sistemas imunobiológicos (BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; NUSSENZWEIG, BENACERRAF, 1964a, 1964b, 1966, 1967; UTSUMI, 1969; LAMM, LISOWSKA, BERNSTEIN e NUSSENZWEIG, 1967; SANDBERG, OSLER, SHIN e OLIVEIRA, 1970; LESLIE, MELAMED e COHEN, 1971; FRANGIONE, FRANKLIN, FUNDENBERG e KOSHLAND, 1966; De PRÉVAL, PINK e MILSTEIN, 1970; SVASTI e MILSTEIN, 1970; PERRY e MILSTEIN, 1970; COLOMB, PORTER, 1975; OVARY, SALUK, QUIJADA e LAMM, 1976).

As frações A e C obtidas por cromatografia em DEAE-celulose do soro de Tayassu (Fig.3), quando reveladas por soro de coelho anti-soro total de Tayassu, exibiram cada uma, um único arco homogêneo de precipitação, mostrando migração eletroforética de IgG2A e IgG2C de cobaia (OLIVEIRA, SANDBERG, SIRAGANIAN e OSLER, 1970); a fração RC (esvaziada das proteínas de mobilidade eletroforética IgG2) mostrou na região de gama um arco nítido de precipitação de mobilidade eletroforética semelhante àquela de IgG1 de cobaia (BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; OSLER, OLIVEIRA, SHIN e SANDBERG, 1969; OLIVEIRA, SANDBERG, SIRAGANIAN e OSLER, 1970).

Os resultados obtidos revelam que o sistema Tayassu responde ao estímulo antigênico, sintetizando pelo menos três proteínas de mobilidade eletroforé

tica de IgG, facilmente separáveis por cromatografia de troca iônica.

A filtração em gel de Sephadex G-200 do soro total, pseudoglobulina e fração RC, seguida do controle imunoelctroforético (Figs.7 e 8), mostrou que as três populações moleculares A, C e IgG-RC (pico II da filtração em gel de fração RC) colhidas em volume idêntico àquele do marcador (IgG de coelho purificada) indicativo de peso molecular característico de IgG, podem ser interpretadas como IgG2A, IgG2C e IgG1 em correspondência com as imunoglobulinas de cobaia (BENACERRAF, OVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; OLIVEIRA, SANDBERG, SIRAGANIAN e OSLER, 1970).

Quando testadas por imunodifusão dupla, imunoelctroforese e hemaglutinação, estas proteínas mostraram atividade de anticorpo (Tabs.I e II, Figs.11 e 12). Na figura 12 a ausência aparente do arco de precipitação correspondente à IgG2 face ao antígeno, poderia ser explicada por título relativamente mais baixo de anticorpo-IgG2 nessas condições experimentais.

O tratamento ácido com tampão glicina-HCl)0,1M pH 2,0 em baixa temperatura, aparentemente não interferiu na atividade de combinação dos anticorpos específicos, eluidos de coluna de imunoabsorvente utilizando PAP-OVA como suporte insolúvel (Fig.16). O rendimento do método pode ser considerado bom, comparável com aqueles obtidos com o uso de outros suportes como a Sepha

rose 4B, PAB-celulose (WEBB & LAPRESLE, 1964), Bromoacetil celulose (ROBBINS, HAIMOVITCH & SELA, 1967) e antigo proteico polimerizado com gluteraldeido (AVRAMEAS e TERNINCK, 1969).

Os fragmentos Fab, Fc e Fc' característicos de degradação proteolítica pela papaína, a mobilidade eletroforética da molécula nativa, seu coeficiente de sedimentação (POSKUS, DELLACHA e PALADINI, resultados não publicados) composição global de amino ácidos (MARANGONI, ARITA, POSKUS e OLIVEIRA, resultados não publicados) atividade de reconhecimento específico do antígeno, serviram de critério para qualificar as três populações proteicas A, C e IgG-RC purificadas do soro de Tayassu, como anticorpo IgG2A 7S, IgG2C 7S e IgG1 (Tab.IV).

A atividade hemaglutinante das frações A, C e IgG-RC testadas com hemácias de carneiro sensibilizadas com ovalbumina, demonstra que a fração IgG-RC apresenta título maior em anticorpos hemaglutinantes, o que vem corroborar os resultados obtidos de densitometria de soro imune e fração RC (Fig.5), que mostra um nítido aumento de IgG rápida no soro do animal imunizado.

A heterogeneidade de anticorpos IgG é relatada em várias espécies animais (BLOCH, MORSE and AUSTEN, 1968; NUSSENZWEIG, MERRYMAN & BENACERRAF, 1963; BENACERRAF, CVARY, BLOCH e FRANKLIN, 1963; SILVERSTEIN, THORBECKE, KRANER & LUKES, 1963; HARRINSON & MAGE, 1967; ESTEVES, SANT'ANA, ANNES e BINAGHI, 1964; PORTER e ALLEN,

1972). Heterogeneidade molecular de anticorpos no soro imune do porco doméstico - animal artiodactilo, de evolução paralela àquela dos Tayassuidae desde o oligoceno (Fig.1) - foi descrita na região de IgG (SETCAVAGE e KIM,1976), com evidência de populações moleculares interpretadas como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (KALTREIDER & JOHNSON 1972a 1972b). Na cobaia foi descrita heterogeneidade molecular na região de IgG2 (NUSSENZWEIG, LAMM e BENACERRAF, 1966; KOYAMA e MIYAJIMA, 1967; OLIVEIRA, SANDBERG, SIRAGANIAN e OSLER, 1970). O perfil de eluição cromatográfica de soro imune individual de diversos exemplares de Tayassu (Fig.3), realça a heterogeneidade descrita na cromatografia de soro imune de cobaia (OLIVEIRA, SANDBERG, SIRAGANIAN e OSLER,1970); o pico correspondente à população molecular IgG2C é mais pronunciado e apresenta concentração de anticorpo comparável àquela correspondente aos anticorpos contidos em IgG2A; na cobaia, baixa atividade de anticorpos foi detectada na fração IgG2C; estes resultados fornecem subsídios experimentais, não propiciados pelo sistema cobaia, que facilitam em muito, estudos estruturais que possam explicar o polimorfismo encontrado nessa região. Uma interpretação baseada no exame de digestão pela papaína de IgG2A e IgG2C de cobaia (que exibiram identidade de estrutura antigênica) seria a de que estas populações moleculares, difeririam entre si nos respectivos fragmentos Fab; interpretação semelhante pode se inferir dos resultados obtidos por SELA,

FABELA IV
Imunoglobulinas tipo IgG de Tayassu sp

Preparação	Caracterização Eletroforética (1)	Peso Molecular (2)	Coefficiente de Sedimentação (3)	Fixação de Complemento (4)	ACP (5)	Composição global em A.A. semelhante a de IgG (6)
A	IgG2	150 000	7S	+	-	+
C	IgG2	150 000	7S	+	-	+
RC	IgG1	150 000	ND	-	+	ND

- (1) Mobilidade eletroforética em tampão veronal 0,05 M pH 8,0, utilizando como suporte gel de ágar à 1%.
- (2) Peso molecular determinado segundo o volume de eluição na filtração em gel de Sephadex G-200 do marcador utilizado. (valores de Kav determinados).
- (3) Valores determinados por POSKUS, E.; DEBLACHA, J.M. e PALADINI, A (resultados não publicados), no Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires.
- (4) Fixação de complemento pela via clássica, realizado segundo MAYER, M. (1964).
- (5) Anafilaxia cutânea passiva na pela heteróloga de porco doméstico segundo OVARV (1958)
- (6) Composição global de amino ácidos, comparada com aquela descrita na literatura, LAMM, M.E. (1969) determinada por MARANGONI, S.; ARITA, M.S.; POSKUS, E. e OLIVEIRA, B. (resultados não publicados).

GIVOL e MOZES, 1963; SELA, 1966, 1970; SELA e MOZES, 1969; SELA, SCHECHTER e BORÉK, 1967, que separaram duas populações de anticorpos IgG de coelho, que mostraram relação antigênica de identidade, e que por digestão pela papaína liberaram fragmentos Fab tipo II e tipo I relacionados com a mobilidade eletroforética da molécula nativa (I III I ou II III II, nomenclatura dos fragmentos Fab e Fc adotada nos estudos pioneiros de PORTER, 1959). Em anticorpos de cobaia anti-hapteno, foi demonstrada na região de gamma2, que frações de mobilidade mais lenta contém uma menor proporção de moléculas L (portadora de cadeia leve tipo lambda) do que as de migração mais rápida (NUSSENZWEIG, LAMM e BENACERRAF, 1966). Diferenças significativas de mobilidade eletroforética de cadeias leves foram encontradas em anticorpos de coelhos imunizados com peptídeos sintéticos e que estão relacionados com a mobilidade eletroforética das moléculas nativas (MOZES, ROBBINS & SELA, 1967). Em condições em que a heterogeneidade de cadeia leve não interfere (cadeias pesadas isoladas após sulfitólise oxidativa) foi descrita no soro de porco doméstico (METZGER, NOVOTNY e FRANEK, 1971) heterogeneidade na região de IgG devida à identificação de pelo menos três tipos de cadeia pesada denominadas gama a, gama b e gama c. Heterogeneidade devida à cadeia pesada, foi descrita em populações moleculares de camundongo, denominadas IgG2a e IgG2b, antigênicamente distintas, mostrando diferenças estruturais na região da dobradiça;

a IgG2a contém três pontes dissulfeto inter-H e a IgG2b contém quatro (De PRÉVAL, PINK e MILSTEIN, 1970). Cadeias polipeptídicas H e L de anticorpos de cobaia de diferentes especificidades mostraram diferente mobilidade tanto na região de gama 2 como na de gama 1, quando examinadas por eletroforese em disco na presença de uréia e em pH alcalino (ARON, LAMM, 1967).

Considerando o conjunto dos resultados apresentados, mais os resultados obtidos, somados àqueles de mapas diagonais de IgG2A e IgG2C de soro imune de Tavassu (POSKUS, MARANGONI, ARITA e OLIVEIRA, resultados não publicados) nos parece que pelo menos no caso de Tavassu, a heterogeneidade descrita na região de gama 2, possa ser o reflexo de dois fatores superpostos: heterogeneidade em termos de cadeias leves kappa e lambda mais peculiaridades estruturais localizadas na cadeia pesada. Caso o progresso de nosso trabalho suporte essa hipótese, justificar-se-ia averiguar esta situação estrutural no sistema cobaia e, também em outros equivalentes no sentido de testar a possibilidade de estarmos diante de um evento biológico de maior amplitude.

A metodologia descrita neste trabalho não foi orientada para se detectar em Tavassu, heterogeneidade na região de mobilidade eletroforética onde migram as imunoglobulinas denominadas IgG1.

A evidência de que os anticorpos de Tavassu, capazes de sensibilizar pele heteróloga estão

contidos na fração IgG-RC, enquanto que os anticorpos tipo IgG2 não tem essa propriedade (Tab.III) distingue os anticorpos IgG2 e IgG1, em termos de atividade biológica. Entretanto nossos resultados não permitem qualificar os anticorpos IgG1 como heterocitotópicos (BECKER, 1971) pois não temos evidências experimentais de que eles sejam capazes de se fixar no tecido homólogo.

A atividade de interação com o sistema complemento pela via clássica, mostrou-se uma propriedade discriminatória entre as populações IgG2A e IgG2C de Tayassu (Fig.17). Na cobaia não foi evidenciada heterogeneidade em termos de atividade biológica entre as populações IgG2A e IgG2C; como as evidências atuais indicam que a função de ativação do sistema complemento é uma propriedade relacionada com a cadeia pesada, argumentamos que as populações IgG2A e IgG2C devam apresentar nuances estruturais na cadeia H, possivelmente responsáveis por essa diferença de comportamento biológico. Tendo em vista a diferente fixação de complemento face à mesma concentração de antígeno mostrada por essas duas sub-populações moleculares, impor-se-ia um estudo quantitativo do consumo de componentes individuais em cada caso.

Não executamos ensaio para testar se as imunoglobulinas IgG2A 7S, IgG2C 7S e IgG1 de Tayassu, são capazes de ativar o sistema complemento pela via alternada (OSLER, SHIN e SANDBERG, 1969; SANDBERG, OLIVEIRA e OSLER, 1969; SANDBERG, SHIN, OSLER e OLIVEIRA, 1970 ; OLIVEIRA, 1973).

No porco doméstico, animal artiodactilo de convergência filogenética com família Tayassuidae no oligoceno (ROMER, 1966) embora tenha suas imunoglobulinas bastante exploradas (FRANEK & RIHA, 1964; HARRINSON & MAGE, 1967; FRANEK & NOVOTNY, 1969; METZGER, NOVOTNY e FRANEK, 1971; NOVOTNY, DOLEJS e FRANEK, 1972; PORTER & ALLEN, 1972; KALTREIDER & JOHNSON, 1972a, 1972b; BEALE, 1974; SETCAVAGE & KIM, 1976) pouco ainda se conhece das regiões moleculares dessas imunoglobulinas envolvidas no desencadeamento de processos imunológicos.

A importância de comparações filogenéticas dentro da linha evolutiva dos Tayassuidae é evidenciada pelos trabalhos de WETZEL, (1975).

5. RESUMO

1. A resposta imune de Tayassu tajacu(L.), segundo o esquema descrito, leva a uma síntese preferencial de imunoglobulinas tipo IgG1.
2. Por cromatografia em troca iônica e filtração em gel foram separadas três populações de anticorpos designadas, frações A, C e IgG-RC, com mobilidade eletroforética característica das imunoglobulinas IgG2A, IgG2C e IgG1 de cobaia.
3. A precipitação específica em gel de ágar, imunoeletroforese e hemaglutinação passiva, mostraram ser estas proteínas capazes de reconhecimento específico do antígeno.
4. Em função de seu comportamento em cromatografia de troca iônica, sua mobilidade eletroforética, precipitação específica, coeficiente de sedimentação, peso molecular e análise global de amino ácidos, estas três populações moleculares podem ser qualificadas de anticorpos IgG2A 7S, IgG2C 7S e IgG1.
- 5 Os anticorpos específicos de Tayassu tajacu(L.), isolados do soro imune por meio de cromatografia de afinida

de, mostraram-se resistentes ao tratamento ácido, utilizado para eluição da coluna de imunoadsorvente.

6. A técnica de hemaglutinação passiva, demonstrou título maior de anticorpos hemaglutinantes na região de IgG1, o que corrobora os resultados da análise eletroforética da resposta imune de Tayassu tajacu(L.).

7. A degradação proteolítica dos anticorpos tipo IgG2 de Tayassu tajacu(L.), apresentou os fragmentos Fab, Fc e Fc' característicos da digestão pela papaína de imunoglobulinas extensamente estudadas do ponto de vista estrutural tais como a IgG2 de cobaia e a IgG de coelho; os fragmentos Fab foram separados por cromatografia de troca iônica. A susceptibilidade à proteólise nas condições realizadas, não permitiu distinguir peculiaridades de estrutura antigênica ou de mobilidade eletroforética que pudessem servir como critério diferencial das proteínas purificadas.

8. A heterogeneidade observada nos anticorpos IgG2 de Tayassu tajacu(L.), é mais pronunciada que aquela descrita nas imunoglobulinas de cobaia.

9. Em termos de fixação de complemento pela via clássica, os anticorpos IgG2A são mais eficientes que aqueles pertencentes à população molecular denominada IgG2C. Os anticorpos IgG1 não são capazes de ativar o complemento pela via clássica.

10. Os anticorpos tipo IgG1 de Tayassu tajacu(L.), são capazes de sensibilizar a pele heteróloga de porco doméstico, enquanto que aqueles caracterizados como IgG2, são desprovidos desta atividade biológica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que o sistema imune de Tayassu tajacu(L.), oferece a oportunidade de se obter a partir de sôros individuais concentrações apreciáveis de anticorpos prontamente identificáveis por técnicas imunoquímicas, que fazem a mediação de diferentes atividades biológicas e que podem ser facilmente isolados e analisados.

Como consequência, os resultados obtidos do sôro imune de Tayassu tajacu(L.), favorecem estudos químicos de estrutura primária de regiões moleculares críticas, comprometidas com o diferente papel biológico das imunoglobulinas descritas.

A peculiar situação da família Tayassuidae que apresenta linha evolutiva independente desde o oligoceno com espécies ainda sobreviventes, abre perspectivas bastante propícias para estudos de mapeamento estrutural e funcional de anticorpos e suas cadeias polipeptídicas na escala filogenética.

7. BIBLIOGRAFIA

- AMBROSIUS, H. - Comparative investigation of immune globulins of various vertebrate classe. Nature, 209: 524, 1966.
- ANDREWS, P. - Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration - Biochem.J., 91: 222, 1964.
- ANDREWS, P. - Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In: Sydney Glick, editor, Methods of biochemical Analysis. New York, London: Interscience Publishers, John Wiley & Sons, 18: 1, 1970.
- ARAÚJO, A.L.; ARITA, M.S. e OLIVEIRA, B. - resultados não publicados.
- ARON, B. & LAMM, M.E. - Disc electrophoretic patterns of the polypeptide chains of guinea pig immunoglobulins - J.Immunol., 99: 597, 1967.
- AVRAMEAS, S. & TERNYNK, T. - The cross linking of protein with gluteraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents - Immunochemistry, 6: 53, 1969.
- BEALE, D. - A porcine immunoglobulin Fcu polymer that has no J chains - Biochim.Biophys.Acta, 351: 13, 1974.

- BECKER, E.L. - Nature and classification of immediate type allergic reactions - Advances in Immunology, 13: 267, 1971.
- BENACERRAF, B.; OVARY, Z.; BLOCH, K.J. and FRANKLIN, E.C. - Properties of guinea pig 7s antibodies. I - Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies - J.Exp. Med., 117:93, 1963.
- BINAGHI, R. - Bulletin de L'Intitut Pasteur - 71:249,1973.
- BLOCH, K.J.; MORSE, H.C. and AUSTEN, F.H. - Biologic properties of rat antibodies. I. Antigen binding by four classes of anti DNP antibodies - J.Immunol 101: 650, 1968.
- BORDUAS, A.C. et GRABAR, P. - L'Hemagglutination passive dans la recherche des anticorps antiproteiniques - Ann. Inst. Pasteur, 84: 903, 1953.
- BOURNE, F.J. & CURTIS, J. - Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs - Immunol., 24: 147, 1973.
- BOURNE, F.J.; CURTIS, J. and WAH, L.S. - Urinary immunoglobulins in the adult pig - Immunol., 24:1,1973.
- BOYDEN, S.V. - The adsorption of proteins erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein serum - J. Exp. Med. 93: 107, 1951.

CAPRA, J.D. & KEHOE, J.M. -Hypervariable regions, idiotipy and the antibody-combining site - Advances in Immunology, 20, 1, 1975.

COLOMB, M.; PORTER, R.R. - Characterization of a plasmin-digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that binds antigen and complement - Biochem. J. 145, 177, 1975.

DAWOOD, F.M.; ARITA, M.S. e OLIVEIRA, B. - resultados não publicados.

De PRÉVAL, C.; PINK, J.R.L. and MILSTEIN, C. - Variability of interchain binding of immunoglobins. Interchain bridges of mouse IgG2a and IgG2b - Nature, 228:930,1970.

DITTEBRANDT, M. - Application of the Weichselbaum Biuret Reagent to the determination of Spinal fluid protein. Clin.Am.J.Path., 18: 439, 1948.

DORRINGTON, K.J. & TANFORD, C. - Molecular size and conformation of immunoglobulins - Adv.Immunol.12,1970.

EDELMAN, G.M. - Dissociation of gamma globulins - J.Am. Chem.Soc., 81: 3155, 1959.

EDELMAN, G.M.; CUNNINSHAM, B.A.; GALL, W.E.; GOTTLIEB,P.D.; RUTISHAUSER, V.; WAXDAL, M.J. - The covalent structure of an entire G immunoglobulin molecule - P.N.A.S., 63: 78, 1970.

- ESTEVEES, M.B.; SANT'ANNA, O.A.; SANTOS ANNES, V.C. and
BINAGHI, R.A. - Characterization and properties of
an anaphilatic 7S antibody in the sheep - J. Immunol.
112: 722, 1974.
- FAYEY, J.L.; WUNDERLICH, J. and MISCHELL, R. - The
immunoglobulins of mice. II - Two sub classes of
mouse 7S globulins: gamma 2a and gamma 2b globulins.
J.Exp.Med., 120: 243, 1964.
- FOUGERAU, M.; SCHIFF, C.; MATHIEU, C.; De PRÉVAL, C.;;
BOURGOUIS, A.; MOULIN, A.; ROCCA SERRA, J. -
Structural and functional mapping of immunoglobulin
V-regions. - Ann. Immunol. Inst.Pasteur, 127C,285,1976.
- FRANEK, F.; KEIL, B. and SORM, F. - Amino acid sequence
of a 22-residue section from the variable part of
pig immunoglobulin lambda chains. - Europ. J.Biochem.
11, 170, 1969.
- FRANEK, F. & NOVOTNY, J. - Isolation of a disulfide bridge
containing fragment of the variable part of pig
immunoglobulin lambda chains. - Europ.J.Biochem.
11, 165, 1969.
- FRANEK, F. & RIHA, I - Purification and structural
characterization of 5S gammaglobulin in new-born pigs.
Immunochemistry Pergamon Press, 1: 49, 1964

- FRANGIONE, B.; FRANKLIN, E.C.; FUNDENBERG, S. and
KOSHLAND, M. - Structural studies of human IgG mieloma
proteins of different antigenic specificities -
J. Exp. Med., 124: 715, 1966.
- FRANGIONE, B. & LAMM, M.E. - Expression of allelic and
and non-allelic genes in immunoglobulin light chains
from homozygous rabbits - FEBS Letters, 11, 1970.
- FRANGIONE, B.; MILSTEIN, C. & PINK, K.L. - Structural
studies of immunoglobulin G. - Nature, 221:145, 1969.
- FRANKLIN, E.; LOWENSTEIN, J.; BIGELOW, B. and METZGER, M.
Heavy chain disease a new disorder of serum gamma
globulins . Am.J.Med., 37: 351, 1964.
- FLEISCHMAN, J.B.; PAIN, R.H. and PORTER, R.R. - Reduction
of gamma globulins - Arch.Biochem.Biophys., 1: 147.1962.
- FREUND, J. - The mode of action of immunologic adjuvants.
Adv.Tuber. Res., 7: 130, 1965.
- GRABAR, P. & BURTIN, P. - Immuno-electrophorese analysis.
Amsterdam. London, New York: Essevier Publishing
Company, 1964.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A.Jr. - Méthode permettant
l'étude conjuguée des propriétés électrophoretiques et
immunochimiques d'un sérum sanguin - Biochim.Biophys.
Acta, 10: 193, 1953.

- GRUBB, R. - The genetic markers of human immoglobulins
Springer, New York, 1970.
- GYENES; L. & SEHON, A.H. - Preparation and evaluation of
polystyrene-antigen conjugate for the isolation of
antibodies - Canad.J.Biochim.Physiol.,38: 1235.1960.
- HARRISON, T.E. & MAGE, G.M. - Isolation and characterization
of gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins and their
polipeptide chains. Biochim. Biophys. Acta,147:
52, 1967.
- HEIDELBERGER, M.& PEDERSEN, K.O. - The molecular weight
of antibodies - J. Exp. Med.,65: 393, 1937.
- HOOD, L. - Antibody genes and other multi gene families -
Fed. Proc., 35, 2158, 1976.
- HOOD, L.; GRAY, W.R.; SANDERS, B.G.; DREYER, W.J. -
Light chain evolution - Symp. Quant.Biol.,32:133,1967.
- KABAT, E.A. - Structure of antibody combining sites-
Ann. Inst. Pasteur, 127C : 239, 1976.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. - Kabat and Mayer's Experimental
Immunochemistry, Ch.4, Charles C. Thomas, Springfield,
III, 1964.
- KALTREIDER, H.B. & JOHNSON, J.S. - Porcine immunoglobulins.
I - Identification of classes and preparation of
specific antisera - J.Immunol., 109, (5):992,1972a.

- KALTREIDER, H.B. & JOHNSON, J.L. - Porcine immunoglobulins
II - Antibody response of adult swine to bovine gamma
globulin - J.Immunol., 109, (5): 999, 1972b.
- KLAPER, D.G. & CAPRA, J.D. - The amino acid sequence of
the variable regions of the light chains from two
idiotipically cross reactive IgM anti-gamma globulins-
Ann. Immunol. Inst.Pasteur, 127C: 261, 1976.
- KEKWICK, R.A. & CANNON, R.K. - The hydrogen ion
dissociation of cristalline albumin of the hen's egg -
Biochem.J., 30: 227, 1936.
- KOCHWA, S. & KUNKEL, H.G., eds. Immunoglobulins.
Ann. N.Y.Acad.Sci. 190, 1971.
- KOYAMA, J. & MIYAJIMA, N. - Heterogeneity of guinea pig
7S antibodies against p-azobenzene arsonate bovine gamma
globulin conjugate produced by various lymphoid tissues.
The J. Biochem., 2: 127, 1967.
- LAURENT, T.C. & KILLANDER, J. - A teory of gel filtration
and its experimental verification - J.Chromatog., 14,
317, 1964.
- LAMM, M.E. - Further comparison of guinea pig gamma 1 and
gamma 2 immunoglobulin. Amino acid composition of the
polipeptide chains and papain fragments - Immunochem.,
6: 235, 1969.

LAMM, M.E.; LISOWSKA-BERNSTEIN, B. and NUSSENZWEIG, V. -
Comparison of guinea pig gamma 1 and gamma 2 by peptide
mapping - Biochem., 6: 2819, 1967.

LENNOX; E.S. & COHN, M. - Immunoglobulins - Ann. Rev.
Biochem., 36: 1967.

LESLIE, R.G.Q.; MELAMED, M.D. and COHEN, S. - The
products from papain and pepsin hidrolyses of guinea
pig immunoglobulins IgG1 and IgG2 - Biochem.J.,
121: 829, 1971.

MARANGONI, S.; ARITA, M.S.; POSKUS, E. e OLIVEIRA, B.
resultados não publicados.

MAYER, M.; OSLER, A.G.; BIER, O. and HEIDELBERGER, M. -
Quantitative studies of complement fixation - Method
J. Immunol., 59: 195, 1948.

METZGER, J.J.; NOVOTNY, J. and FRANEK, F. - Heterogeneity
of pig immunoglobulin gamma chains - FEBS Letters,
14, (4): 237, 1971.

MILSTEIN, C. & PINK, J.R.L. - Structure and evolution of
immunoglobulins - Progress Biophysics and Molecular
Biology, 21, J.A.V. Butler and D. Noble eds., Pergamon
Press, Oxford and New York, 1970.

MOZES, E.; ROBBINS, J.B., and SELA, M. - Heterogeneity
of the light chains of rabbit immunoglobulin G
fractions and of a series of antibodies directed
towards antigens of differing complexity

- NATVIG, J.B.; KUNKEL, H.G. - Human immunoglobulins:
classes, sub-classes, genetic variants and idiotypes.
Adv. Immunol. 16: 1, 1973.
- NEOH, S.H.; JAHODA, D.M.; ROWE, D.S. and VOLLER, A. -
Immunoglobulin classes in mammalia species identified
by cross reactivity with antisera to human immunoglobulin.
Immunochem., 10: 805, 1973.
- NOVOTNY, J.; DOLEJS, L. and FRANEK, F. - Uniformity and
species-specific features of the N terminal amino acid
sequence of porcine immunoglobulin lambda chains. -
Eur.J.Biochem., 31 : 277, 1972.
- NOVOTNY, J. & FRANEK, F. - N and C terminal sequence in
pig immunoglobulin chains: assignment to the kappa
type - FEBS Letters, 2: 93, 1968.
- NUSSENZWEIG; V. & BENACERRAF, B. - Studies on the properties
of fragments of guinea pig gamma 1 and gamma 2 antibodies
obtained by papain digestion and mild reduction -
J.Immunol., 93: 1008, 1964a.
- NUSSENZWEIG, V. & BENACERRAF, B. - Quantitative variation
in L chain types in guinea pigs anti hapten antibodies.
J.Exp.Med., 124: 805, 1966a.
- NUSSENZWEIG, V. and BENACERRAF, B. - Presence of identical
determinants in the Fd fragments of gamma 1 and gamma
2 immunoglobulins. - J.Immunol. 97, 171, 1966b.

NUSSENZWEIG, V. & BENACERRAF, B. - Synthesis; structure and specificities of 7S guinea pig immunoglobulins - In: Nobel Symposium, gamma globulins. - Killander, J.ed. John Willey & Sons, London, 1967.

NUSSENZWEIG, V.; FRANKLIN, E.C. and BENACERRAF, B. - Immunologic properties of products obtained by mild reduction of human and guinea pig gamma globulins - J. Immunol., 23: 1015, 1964B.

NUSSENZWEIG, R.S.; MERRYMAN, C. and BENACERRAF; B. - Electrophoretic separation and properties of mouse antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis. - J. Exp. Med., 120: 315, 1964.

OLIVEIRA, B. - Sites of complement interaction on the guinea pig IgG2 immunoglobulin - Agents and Actions 3: 384, 1973.

OLIVEIRA, B.; OSLER, A.G.; SIRAGANIAN, R.P. and SANDBERG, A.L. - The biologic activities of guinea-pig antibodies. I - Separation of gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins and their participation in the allergic reaction of immediate types. - J.Immunol., 104:320, 1970

OSLER, A.G.; OLIVEIRA, B.; SHIN, Y.S. and SANDBERG, A.L. Fixation of guinea pig complement by gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins - J.Immunol., 102:269, 1969.

- OUCHTERLONY, O. - Diffusion in gel methods for immunological analysis - Progr.Allerg.,5: 78, 1958.
- OVARY, Z. - Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction - Progr. Allerg., 5: 459, 1958.
- OVARY, Z.; SALUK, C.; QUIZUDA, J. and SANN, M.E. - Biologic activities of rabbit immunoglobulin G in relation to domains of the Fc region. - J.Immunol. 116,1265, 1976.
- PERRY, M.B. & MILSTEIN, C. - Interchain bridges of mouse IgG1 - Nature, 228: 935, 1970.
- PORTER, P. - Studies of porcine secretory IgA and its component chains in relation to intestinal absorption of colostrum immunoglobulins by neonatal pig. -Immunol. 24: 163, 1973.
- PORTER, P. and ALLEN, W.D. - Classes of immunoglobulins related to immunity in the pig. J.Amer.Vet.Med.Ass. 160: 511,1972.
- PORTER, R.R.- The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain - J. Biochem. 73:119, 1959.
- POSKUS, E.; DELLACHA, J.M.; PALADINI, A. - Resultados não publicados.
- POSKUS, E.; MARANGONI, S.; ARITA, M.S. e OLIVEIRA, B. Resultados não publicados.

- ROBBINS, J.B.; HAIMOVITCH, I. and SELA, M. - Purification of antibodies with immunoabsorbents prepared using bromoacetylcellulose.- *Immunochemistry*,4: 112,1967.
- ROMER, A.S. - Vertebrate Paleontology - Third Edition, the University of Chicago Press, Chicago and London, 1966.
- SANDBERG, A.L.; OLIVEIRA, B. and OSLER, A.G. - Complement fixation by guinea pig gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins *Fed. Proc.*,28: 187, 1969.
- SANDBERG, A.L.; OSLER, A.G.; SHIN, Y.S. and OLIVEIRA, B. The biologic activities of guinea pig antibodies. II. Modes of complement interaction with gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins. - *J.Immunol.*,104:329, 1970.
- SELA, M. - Chemical studies of the combining sites of antibodies. - *Proc.Royal Soc.B.*,166:188, 1966.
- SELA,M. - Effect of antigenic structure on antibody biosynthesis - In.: *Immunoglobulins*,Ann. N.T.Acad. Sci.,190: 181, 1970.
- SELA,M. & MOZES, E. - Dependence of the chemical nature of antibodies on the net electrical charge of antigens *P.N.A.S.*,55: 449, 1969.
- SELA, M., SCHECHTER,B.; SCHECHTER, R.J. and BOREL,M. - Antibodies to sequential and conformational determinants cold-spring Harbor - *Symp.Quant. Biochem.*,1967.

- SELA, M.; GIVOL, D. and MOZES, E. - Resolution of rabbit gamma globulin into two fractions by chromatography on diethylaminoethylcellulose-Sephadex. - *Biochem. Biophys Acta*, 78: 649, 1963.
- SETCAVAGE, T.M. and KIM, Y.B. - Characterization of porcine serum immunoglobulins IgG, IgM and IgA and the preparation of monospecific anti-chain sera. - *Immunochemistry*, 13: 643, 1976.
- SILVERSTEIN, A.M.; THORBECKE, G.J. KRANER, K.L. and LUKES, R.J. - Fetal response to antigenic stimulus III Gamma globulin production in normal and stimulated fetal lambs. - *J. Immunol.*, 91: 384, 1963.
- SMITH, G.P.; HOOD, L. and FITCH, W.M. - Antibody diversity. - *Ann. Rev. Biochem.* 40: 969, 1971.
- SVASTI, J. & MILSTEIN, C. - Interchain bridges of mouse IgG1. - *Nature*, 228: 933, 1970.
- Two Genes - One polypeptide chain - A Symposium. *Fed. Proc.*, 31: 177, 1972.
- UTSUMI, S. - Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments. - *Biochem. J.*, 112: 343, 1969.

- WANG, A.C.; WILSON, S.K.; HOPPER, J.E.; FUNDENBERG, H.H.
& NISONOFF, A. - Evidence for the control of synthesis
of the variable regions of the heavy chains of IgG
and IgM by the same gene. P.N.A.S., 66: 1970.
- WEBB, T. and LAPRESLE, C. - Isolation and study of rabbit
antibodies specific for certain of the antigenic group
of human serum albumin. - Biochem, J., 91:24, 1964.
- WETZEL, R.M.; DUBOS, R.E.; MARTIN, R.L. and MYERS, P.-
Catagonus, an "Extinct" Peccary, alive in Paraguai.-
Science, 189: 379, 1975.
- WHITE, R.G.; JENKINS, G.C. and WILKINSON, P.C. - The
production of skin sensitizing antibody in the guinea
pig. - Int.Arch.Allergy Appl. Immunol., 22:156, 1963.