

DETERMINANTES ANTIGÊNICOS
DA SORO-ALBUMINA EQUINA
L.M. VIEIRA

LAURO MELLO VIEIRA

DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DA SORO

ALBUMINA EQUINA

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Prof. Dr. H. A. RANGEL

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas - São Paulo

(1977)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Ana Maria

Aos meus pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Humberto de Araújo Rangel pela orientação e amizade.

Ao Professor Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio dado ao desenvolvimento da pesquisa e ao ensino pós-graduado.

Ao Professor Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia pelo incentivo constante ao desenvolvimento das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

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

Aos Professores Daria Repka (Deptº Microbiologia e Imunologia), Quivo S. Tahin (Deptº Bioquímica), Irineu José Barsanti de Camargo (Deptº Microbiologia e Imunologia) e Júlia Prado Franceschi (Deptº Farmacologia) pela discussão crítica dos resultados.

Aos colegas de Curso de Pós-Graduação pela demonstração constante de amizade, união, colaboração e coleguismo.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR - CAPES

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA - BIREME

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o autor foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

S U M Á R I O

Introdução.....	1
Material e Métodos.....	9
Resultados.....	14
1. Análise imunoquímica da SAE degra- dada.....	14
2. Isolamento do fragmento imunologi- camente ativo.....	20
Discussão	32
Resumo e Conclusões.....	39
Referências Bibliográficas.....	41

I. N T R O D U Ç Ã O

Os trabalhos pioneiros de Landsteiner no ramo da química de grupamentos determinantes antigênicos, preparados pela ligação, por diazotação, de substâncias orgânicas simples (haptenos) às proteínas, estabeleceram a importância de fatores estereoquímicos como isomeria de posição, isomeria ótica e cíclica cis-trans na determinação da especificidade da combinação antígeno-anticorpo (LANDSTEINER - 1945).

O desenvolvimento de métodos quantitativos de estudo da interação antígeno-anticorpo, por HEIDELBERGER e KENDALL (1935), MAYER et al. (1948), OSLER (1958) e outros, permitiram a obtenção de dados relevantes para o conhecimento das bases químicas envolvidas nestas interações pela determinação de parâmetros como a constante de associação, afinidade, efeito do pH, temperatura, força iônica e especificidade das reações. Tais resultados trouxeram condições para se compreender não só a importância estrutural de grupamentos químicos presentes nas moléculas dos haptenos mas também no estudo das condições de interação destas substâncias com populações normalmente heterogêneas de anticorpos.

Embora o conjunto de resultados obtidos com os haptenos tenha fornecido a base química do fenômeno da in

teração antígeno - anticorpo, ainda hoje não está claro o quanto de um determinante antigênico completo representam os haptenos (EISEN - 1974).

Os estudos de aspectos estereoquímicos da especificidade de determinantes antigênicos de polissacarídeos bacterianos já são feitos atualmente em função, principalmente, do conhecimento de determinantes antigênicos comuns de grupo e tipo específicos e da simplicidade estrutural destes antígenos (compostos em sua maioria de unidades repetidas de monossacarídeos e não dependentes marcadamente da conformação macromolecular). Tais estudos demonstraram a importância de determinados grupamentos químicos como os grupos imunodominantes definidos por KABAT (1966) e de ligações glicosídicas capazes de serem responsáveis pela exposição destes grupamentos, embora não participando diretamente do determinante antigênico em si - grupos apodeterminantes (SIMMONS - 1971). Estes estudos sobre a estrutura trouxeram contribuições importantes para o entendimento dos mecanismos de biossíntese de paredes bacterianas e possibilitaram a classificação sorológica destas bactérias em função da especificidade antigênica de grupamentos determinantes de sua estrutura (SIMMONS - 1971).

O estudo de determinantes antigênicos de proteínas, entretanto, é algo mais complexo do que com

moléculas orgânicas simples como os haptenos ou antígenos polissacarídeos. A complexidade estrutural das proteínas torna difícil o estudo destas moléculas por uma série de motivos: inicialmente temos um número elevado de determinantes antigênicos espalhados pela molécula; em segundo lugar, embora o estudo com proteínas tenha sido exaustivo, é pequeno o número de moléculas proteicas que tem a sua estrutura bem definida. Dos estudos com proteínas de sequência já definida, pode-se concluir da importância da manutenção das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária para a expressão de determinantes antigênicos presentes nas moléculas nativas. Baseado nas informações existentes sobre a estrutura primária das proteínas (por exemplo: ribonuclease; mioglobina, etc...), pode-se admitir que grupos de amino-ácidos não aparecem como sequências repetidas em uma dada cadeia polipeptídica. Em consequência, uma proteína possui diferentes determinantes antigênicos que não se repetem na estrutura de sua molécula (EISEN - 1974). Isto pode demonstrar a complexidade estrutural maior destes antígenos em relação aos antígenos polissacarídeos.

Os estudos da estrutura de determinantes antigênicos de proteínas foram feitos, por longo tempo, pelo tratamento destas moléculas com substâncias químicas capazes de produzir, entretanto, modificações complexas nas

moléculas nativas, modificações essas que são difíceis de serem analisadas e limitam, de certa forma, os próprios resultados obtidos (LAPRESLE e WEBB - 1964).

A introdução de métodos de síntese de cadeias polipeptídicas trouxe informações a respeito da importância da sequência de resíduos de amino-ácidos na antigenicidade e imunogenicidade destes peptídeos, como demonstrado nos trabalhos de SELA (1969) e outros. Entretanto, os métodos utilizados, como por exemplo, mistura de N-carboxi anidridos (KATCHALSKI et al. - (1964), permitiam apenas a obtenção de produtos de sequência casual de amino-ácidos . Embora a composição destes polipeptídeos fosse mais simples, de uma certa maneira era mais complexa do que a das proteínas naturais, que podem frequentemente ser isoladas como populações homogêneas de moléculas inteiras (EISEN-1973).

O método de síntese em fase sólida, desenvolvido por GUTTE e MERRIFIELD (1971), permitiu contornar vários problemas existentes no estudo com polipeptídeos sintéticos pelo aumento do rendimento da síntese de cadeias polipeptídicas e um maior controle na sequência de entrada de amino-ácidos ao longo da cadeia polipeptídica sintética. Entretanto, este método requer um tempo muito grande para a preparação de polipeptídeos grandes sendo ainda um método de alto custo operacional. Além destas limitações, o

so de solventes orgânicos usados nos processos de lavagem. das cadeias polipeptídicas formadas mostraram-se capazes / de interferir na própria imunogenicidade dos polipeptídeos assim obtidos. Embora muitas proteínas obtidas sinteticamente tenham mostrado atividade fisiológica compatível com as respectivas proteínas naturais, a síntese de cadeias polipeptídicas fica limitada ao conhecimento adequado da estrutura de proteínas sintetizadas " in vivo ".

Isto faz com que a primeira etapa a ser vencida no estudo da imunogenicidade de uma determinada proteína / seja a do isolamento e da caracterização da estrutura da proteína nativa.

O desenvolvimento de diversos métodos de isolamento, purificação e análise de pureza de proteínas tem possibilitado a obtenção de um número grande de proteínas num alto grau de pureza.

O estudo de fragmentos destas moléculas, obtidos pela hidrólise com enzimas proteolíticas, tem trazido uma série de informações sobre a estrutura e imunogenicidade / de fragmentos de especificidade diferentes, que precipitam independentemente com anticorpos distintos de uma população heterogênea, obtida pela imunização de animais com as moléculas nativas. Este modelo tem sido largamente utilizado com a finalidade de isolar determinantes antigênicos de moléculas proteicas complexas como a albumina (LAPRESLE e WEBB - 1964), o fibrinogênio (NUSSENZWEIG, SELIGMANN e

GRABAR - 1961), a gama globulina humana (EDELMAN et.al. 1960) e outras.

LAPRESLE e WEBB (1960 e 1964) isolaram a partir da soroalbumina humana (SAH), degradada pela catepsina D de baços de coelhos, um fragmento contendo um número reduzido de determinantes antigênicos denominado fragmento inibidor (I-H), de peso molecular 11.000. Este fragmento não precipitava ou precipitava pouco com soros anti SAH mas era capaz de inibir parcialmente a precipitação específica do sistema SAH + anti-SAH.

O uso da Catepsina D como enzima proteolítica é importante do ponto de vista de que esta enzima é responsável por 75% da atividade proteolítica do baço, como demonstrado por PRESS, PORTER e CEBRA (1960) e, pela sua alta concentração intracelular em células fagocitárias (POOLE, DINGLE e BARRET - 1972) (ROJAS - ESPINOSA et al. - 1973). Embora nenhuma demonstração conclusiva tenha sido obtida, as evidências descritas acima faz-nos acreditar que esta enzima deva estar associada possivelmente à degradação de antígenos proteicos " in vivo ".

O isolamento e caracterização de fragmentos, como o fragmento I-H, quanto a seu conteúdo de amino-ácidos (LAPRESLE - 1964) possibilitaram a determinação da estrutura química parcial deste peptídeo (BELLON e LAPRESLE -1975) fornecendo dados relevantes para a determinação da sequência primária e de modelos de conformação para a molécula nativa de SAH (BEHRENS, SPIEKERMANN e BROWN - 1975).

A obtenção de vários fragmentos bem caracterizados, sequenciados e de estrutura definida, de moléculas imunologicamente relacionadas é importante do ponto de vista imunológico para a determinação de parâmetros estruturais responsáveis pela expressão dos determinantes antigênicos e reações cruzadas.

Os estudos comparativos de pequenos fragmentos isolados de moléculas proteicas como o fragmento I-H da soro albumina humana e I - B da soro albumina bovina (RANGEL - 1970), tem uma importância muito grande quando se sabe que tais moléculas em suas formas nativas reagem cruzadamente entre si e com a soro albumina equina em grande extensão (RANGEL - 1965 e 1967).

A soro albumina equina (SAE) é uma proteína globular de peso molecular 69.000, constante de sedimentação 4,3 S e de razão molar Ac / Ag, em extremo excesso de anticorpo, de 6, quando testada por precipitação contra soro de coelho anti-SAE (KABAT - 1964). Este valor da razão molar da combinação Ac/Ag demonstra que a molécula nativa apresenta pelo menos 6 determinantes antigênicos espalhados pela sua estrutura.

O estudo da estrutura antigênica da soro albumina equina revelou que a Catepsina D purificada, de origem bovina, era capaz de degradar a molécula nativa de SAE produzindo um mínimo de 3 fragmentos imunologicamente ativos (RANGEL - 1962). Dos estudos de reação cruzada com a so-

ro albumina bovina foi demonstrado que os determinantes co muns a SAE e SAB são apenas semelhantes e não idênticos en tre si, porquanto, os ^{vii} anticorpos que se combinam com estes determinantes são mais ávidos para o determinante homólogo do que para o heterólogo.

Com a finalidade de contribuir para o estudo da antigenicidade da soro albumina equina, foi feita, no pre sente trabalho, uma análise do digesto da SAE obtido pela ação proteolítica da catepsina D de baços de coelhos. Um fragmento imunologicamente ativo deste digesto, portando ' um número reduzido de determinantes antigênicos, foi isola do e caracterizado imunologicamente quanto a sua capacidade de reagir com soros de coelhos anti-SAE e cruzadamente com soros anti-SAH.

M A T E R I A L E M É T O D O S

SORO EQUINO: Soro equino foi obtido de 4 animais normais , misturados e centrifugados a 4810 xg por 30 minutos antes do uso.

SORO ALBUMINA EQUINA: A soro albumina equina 5 X cristalizada (SAE) foi obtida segundo o método de ADAIR e ROBINSON (1950). Após a 5a. recristalização, a fração albumínica apresentava apenas um arco de precipitação quando testada até uma concentração de 20mg/ml por imunoeletroforese contra soro de coelho anti - soro equino total.

CATEPSINA D DE BAÇOS DE COELHOS: A catepsina D de baços de coelhos (cat. D) foi obtida e dosada segundo o método descrito por DAWOOD (1973). As preparações liofilizadas continham 85 unidades de cat. D por mg de proteínas.

FRAGMENTO I - H: O fragmento inibidor (I - H) da soro albumina humana foi obtido segundo o método descrito por LAPRESLE e WEBB (1960).

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS: O teor de proteínas das diversas frações foi determinado pelo reativo de Biureto, segundo o método de WEICHSELBAUM (1946) e absorção a 220 e 280 nm em espectrofotômetro Carl Zeiss PMQ II.

ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE: As análises de pureza das frações obtidas foram feitas por eletroforese em

acetato de celulose em aparelhos Boskamp, Gerartbau, KG, utilizando-se tampão veronal sódico pH 8,5 de força iônica 0,05. Foi aplicada uma corrente de 2 mA/fita durante 45 minutos após o que as fitas foram tratadas segundo os procedimentos descritos por KABAT e MAYER (1964).

ELETROFORESE E IMUNOELETROFORES EM GEL DE AGAR: As análises em gel de agar foram feitas em placas de vidro contendo agar (Bacto - Agar, Difco) a 1% em tampão veronal pH 8,6 e de força iônica 0,025. Nas cubas, foi utilizado o mesmo tampão de força iônica 0,050. As condições de eletroforese empregadas foram de 4V/cm por 90 minutos. Após este tempo as lâminas foram tratadas segundo as recomendações / de GRABAR e BURTIN (1964).

IMUNODIFUSÃO: As condições de imunodifusão em gel de agar seguiram as recomendações descritas por OUCHTERLONY (1967).

SOROS DE COELHO ANTI - SAE: Tres coelhos normais foram imunizados com uma fração SAE 5 x cristalizada. Os soros / obtidos destes animais, ao final da imunização, foram denominados de S1, S2 e S5.

Outros dois coelhos normais foram imunizados com uma fração SAE 2 X cristalizada. Esta fração apresentava cerca de tres sistemas precipitantes além do sistema SAE + anti - SAE. Os soros obtidos destes animais receberam a de

nominação S3 e S4.

O esquema de imunização empregado, nos dois grupos, foi o seguinte: 2 doses iniciais de 5mg do antígeno em adjuvante completo de Freund foram feitas nos ganglios popliteais das patas trazeiras dos animais com intervalos de uma semana. Uma terceira dose, nas mesmas condições, foi feita subcutâneamente no dorso uma semana após a segunda dose.

Uma semana após a terceira dose, injeções intravenosas foram feitas com 1ml de antígeno precipitado pelo alumínio de potássio, em dias alternados durante 3 semanas. Uma semana após a última dose, os animais foram sangrados e os soros obtidos receberam a denominação citada anteriormente, sendo mantidos a -20°C até o momento de serem utilizados.

SOROS DE COELHO ANTI - SAH: Coelhos normais foram inoculados com soro albumina humana segundo o esquema descrito para a soro albumina equina.

PRECIPITAÇÃO QUANTITATIVA EM MEIO LÍQUIDO: O título de anticorpos anti-SAE dos vários antisoros foram determinados por precipitação quantitativa em meio líquido segundo o método de HEIDELBERGER e KENDALL (1935).

As quantidades de proteínas precipitadas foram determinadas pelo reativo de Biureto.

Na zona de equivalência, os títulos obtidos com a fração SAE 5 X cristalizada foram de 2,7mg/ml de anti-

corpo precipitado para o soro S1; 6,8mg/ml para o soro S2; 3,6mg/ml para o soro S3; 3,0 mg/ml para o soro S4 e 6,5mg/ml para o soro S5.

DIGESTÃO DA SOROALBUMINA EQUINA PELA CATEPSINA D: A uma solução contendo 2,0g de SAE diluída em 100ml de sol.de NaCl 0,15 M, foi adicionado 500U de Catepsina D. A mistura foi acidificada a pH 3,5 e incubada a 45°C por 5 horas. Após este tempo, a mistura foi neutralizada a pH 7,0 com NaOH 0,1 N e congelada a -20°C até o momento de ser utilizada.

CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE: DEAE-celulose (Bio-Rad Laboratories, Griffin, Richmond, Calif. , USA) foi preparada segundo as recomendações de SOBER e PETERSON (1958).

Os tampões foram preparados segundo as recomendações de GOMORI (1965).

REAÇÕES DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA: Nas provas de hemaglutinação passiva, as hemácias de carneiro taninizadas foram preparadas segundo as recomendações de BOYDEN (1951) e sensibilizadas com 100ug de proteínas para cada ml da suspensão de hemácias a 2,5% segundo as recomendações de BORDUAS e GRABAR (1953). As leituras foram feitas 2 e 12 horas após a incubação da mistura.

INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA: As diversas diluições dos antisoros foram incubadas com volumes iguais do antígeno, nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100, 160 e 200ug /ml, a 37°C por 1 hora. Após este tempo 0,1 ml da

mistura de cada diluição foi testada com 25ul de suspensão de hemácias sensibilizadas com o antígeno.

GEL FILTRAÇÃO EM SEPHADEX: As condições de gel filtração em Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden) seguiram as recomendações de FLODIN (1962).

IMUNOELETROFORESE CRUZADA: A separação eletroforética na primeira dimensão foi feita aplicando-se 5ul do digesto a 8mg/ml num poço de 2,5 mm de diametro em placas de vidro (11 X 9 cm) contendo agarose a 1% em tampão veronal 0,05M pH 8,6. O mesmo tampão foi utilizado nas cubas. Foi aplicado uma corrente de 6,5 V/cm por 75 minutos. Após este tempo uma faixa de agarose foi cortada e aplicada em seu lugar 4 ml de uma solução de antisoro a 10% em agarose. Após a solidificação foi aplicada uma corrente de 4 V/cm por 14 horas. As lâminas foram tratadas a seguir segundo os procedimentos descritos por CLARKE (1971).

R E S U L T A D O S

1 - ANÁLISE IMUNOQUÍMICA DA SAE DEGRADADA:

Com a finalidade de se determinar as condições de digestão da SAE pela catepsina D, 400mg de SAE dissolvidas em 20ml de sol. de NaCl 0,15 M foram incubadas com 100 U de catepsina D a 45°C e pH 3,5. Aliquotas de 5 ml foram retiradas em diferentes intervalos de tempo de incubação da mistura. As amostras foram neutralizadas a pH7,0 com NaOH 0,1 N e congeladas a -20°C até o momento de serem utilizadas. Como controle, amostras de SAE na mesma concentração (20 mg/ml) foram incubadas em pH7,0 e 3,5 durante 24 horas.

A análise das diversas amostras por eletroforese em gel de agar mostrou que as frações controles (SAE pH 7,0 e 3,5) apresentavam uma banda homogênea de proteínas de migração anódica (Fig. 1).

As frações incubadas com a Cat. D mostraram um desdobramento desta banda, uma diminuição da sua intensidade com o aumento do tempo de proteólise e também o aparecimento de uma banda de migração diferente da molécula nativa que aumentava de intensidade com o aumento do tempo de incubação.

No tempo de 5 horas, os produtos de degradação

mostravam-se mais homogêneos pois o componente de migração diferente da molécula nativa apresentava-se mais intenso enquanto que o componente de migração anódica demonstrava um menor grau de proteólise do que a mesma banda no digesto de 24 horas.

A intensidade da ação enzimática neste digesto, foi avaliada incubando-se a 45°C por 15 minutos, volumes iguais do digesto de 5 horas e ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%). Nestas condições, 50% do material foi precipitado pelo TCA e aproximadamente 50% de proteínas do digesto inicial pode ser determinada no sobrenadante pelo reativo de Biureto.

A análise das amostras dos vários digestos por imunodifusão demonstrou que, com o decorrer do tempo de proteólise, os digestos obtidos foram sempre sistemas precipitantes menos complexos que a molécula nativa (SAE pH 3,5 e 7,0) e que mais de um sistema precipitante aparece após a ação proteolítica (figura 2).

A análise por imunoeletroforese do digesto de 5 horas mostrou que a molécula de SAE é cindida pela cat. D nestas condições, fornecendo pelo menos 3 sistemas precipitantes de mobilidades eletroforéticas distintas (figura 3). Um destes sistemas apresentou maior mobilidade anódica (arco a). O outro, mobilidade também anódica sendo, entretanto, mais lenta que o anterior (arco b) e um terceiro siste -

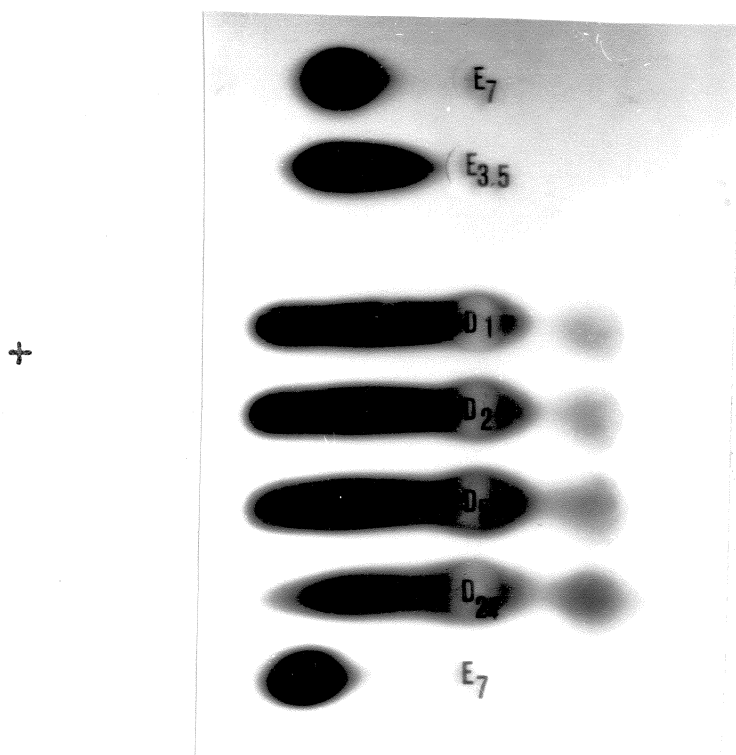


Fig. 1. Análise por eletroforese em gel de agar dos digestos de SAE com a catepsina D e dos controles. E_7 - SAE incubada por 24 horas a pH 7,0; $E_{3,5}$ - SAE incubada a pH 3,5; D_1 representa o digesto de 1 hora; D_2 o de 2 horas; D_5 o de 5 horas e D_{24} o de 24 horas de incubação. Todas as frações foram analisadas numa concentração de 20mg/ml de proteínas.

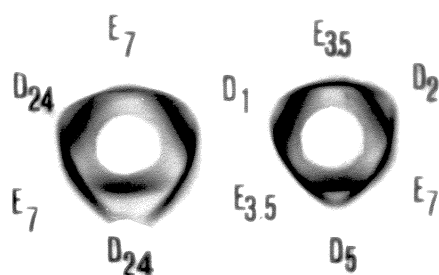


Fig. 2. Análise por imunodifusão dos digestos de SAE e dos controles contra soro de coelho anti-SAE. Os digestos são representados pela letra D seguida do índice correspondente ao tempo de incubação da mistura em horas. Os controles são representados pela letra E e o valor de pH correspondentes. Nos poços centrais foram aplicados o anti-soro (S2). As várias amostras foram testadas numa concentração de 1 mg/ml.

ma precipitante de mobilidade diferente à da molécula nativa. (arco c). Os dois primeiros (arcos a e b) apresentaram uma reação de identidade parcial entre si. Entretanto, o terceiro sistema (arco c) apresentou uma reação de não identidade em relação a estes dois sistemas. Por imunoelectroforese cruzada contra o mesmo antisoro, ficou demonstrado a presença de pelo menos 2 sistemas precipitantes diferentes neste digesto de 5 horas. O resultado obtido é mostrado na Figura 4.

Com a escolha do tempo de incubação da mistura de 5 horas, novas partidas de 2,0 gramas de SAE foram degradadas nas condições descritas anteriormente. Após o tempo de digestão, o pH da mistura foi ajustado a 4,7 com NaOH 0,1N. Nestas condições, uma fração do digesto tornou-se insolúvel no meio e foi separada por centrifugação a 4810 X g por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 20 ml de sol. de NaCl 0,15 M e solubilizado pelo ajuste do pH 7,0. Esta fração (F1) representava 12% de proteínas do digesto (0,24 gramas).

A fração sobrenadante, representando 88% do conteúdo de proteínas do digesto, foi neutralizada a pH 7,0 e recebeu a denominação Fração F2.

A análise eletroforética em gel de agar, mostrada na Figura 5, demonstrou a manutenção da banda de migração diferente da SAE na fração F2 e a ausência desta mesma banda na Fração F1.

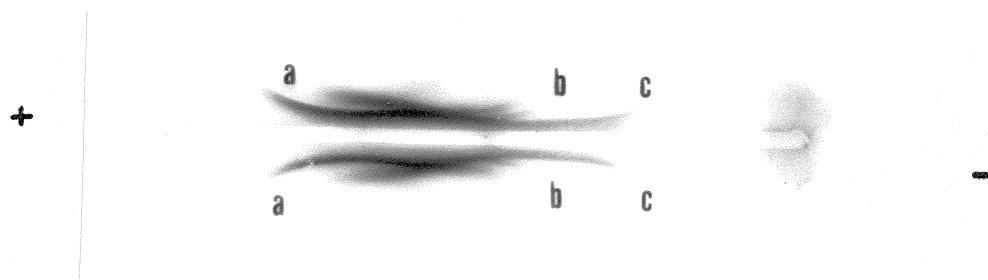


Fig. 3. Análise por imunoeletroforese do digesto de 5 horas (20mg/ml de proteínas). O antisoro utilizado foi o soro de coelho anti-SAE (S2).

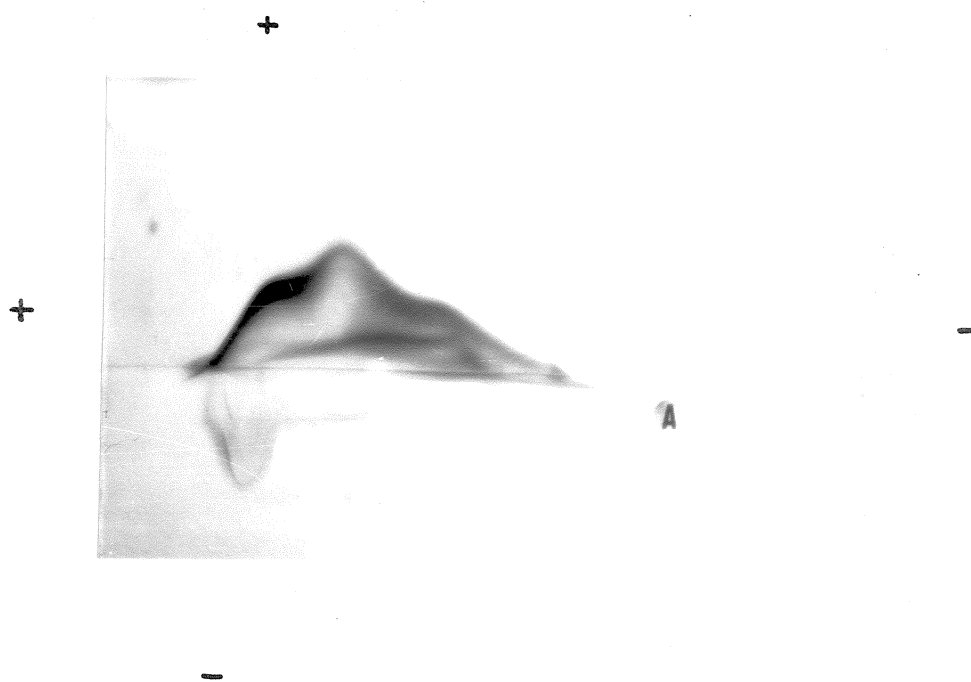


Fig. 4. Imunoeletroforese cruzada do digesto de 5 horas contra soro anti-SAE (S2). O ponto de aplicação da amostra é representado pela letra A.

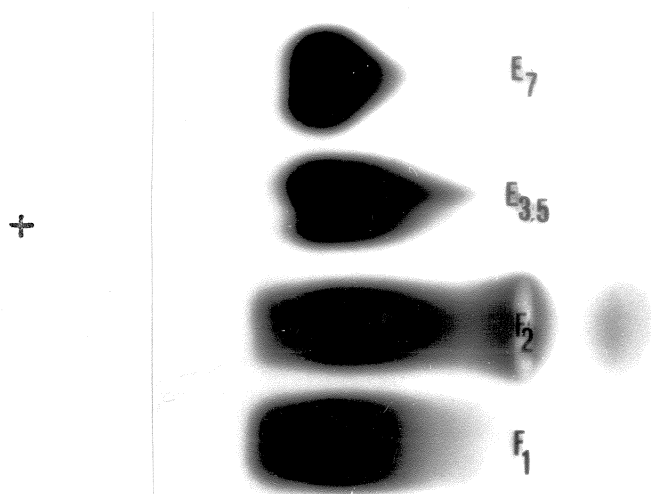


Fig. 5 : Eletroforese em gel de agar dos controles SAE a pH 7,0 (E₇) e SAE a pH 3,5 (E_{3,5}) e das frações F₂ e F₁. Todas as frações continham 20mg de proteínas por ml.

2 -

ISOLAMENTO DO FRAGMENTO IMUNOLOGICAMENTE ATIVO

Com a finalidade de se isolar fragmentos imunologicamente ativos da fração F2, uma solução da Fração F2 contendo 1,76 g de proteínas e diluída em 130 ml de solução de NaCl 0,15 M foi ajustada a pH 8,4 com solução de K_2HPO_4 0,05 M. Este material foi dialisado por 12 horas contra uma solução de K_2HPO_4 pH 8,4 0,005 M. Após a dialise o material foi cromatografado a 4°C em coluna de DEAE - celulose (4,5 X 32 cm) equilibrada com esta mesma solução. Com um fluxo constante de 250ml/hora, foram coletadas amostras de 10ml do material eluído. Inicialmente foi eluída uma fração (F2-1) contida nos volumes de 520 a 610 ml; em seguida, foi eluída uma segunda fração contida nos volumes de 640 a 780ml (Fração F2-2) e, posteriormente uma terceira Fração denominada Fração F2-3 contida nos volumes de 1500 a 1800ml.

Após a eluição das três frações, uma solução de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5M foi ligada à coluna, tendo sido eluída nestas condições uma quarta fração denominada Fração F2-4 contida nos volumes de 2.100 a 2.600 ml.

O diagrama de eluição mostrado na Figura 6, representa as leituras das frações coletadas do material eluído a 220 e 280 nm. As curvas representativas dos dois comprimentos de onda mostram picos correspondentes revelando a presença de resíduos de tirosina ou de triptofano nas diversas frações obtidas.

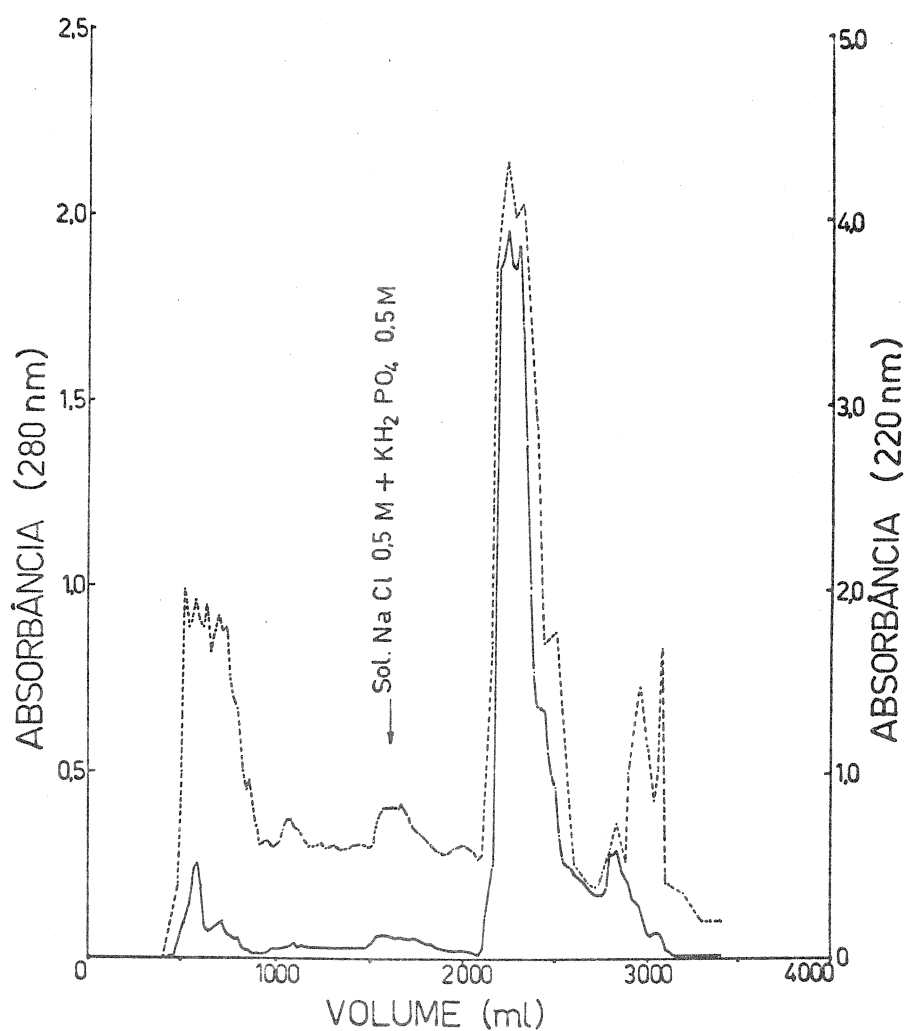


Fig. 6. Diagrama de cromatografia da fração F2 em DEAE-celulose. As leituras foram feitas a 280 nm (---) e 220 nm (.....). A solução inicial utilizada para a eluição foi K_2HPO_4 0,005 M pH 8,4. Uma solução de NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M foi ligada à coluna após a eluição de 1600 ml.

As frações assim obtidas foram dialisadas por 4 horas contra água destilada e liofilizadas. O teor de proteínas de cada uma das frações obtidas (em seis cromatografia efetuadas nas mesmas condições) é mostrado na Tabela I.

A análise eletroforética em gel de agar das frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose é mostrada na Figura 7. A fração F2-1 mostrou ser constituída exclusivamente do componente de migração diferente da molécula nativa de SAE. Esta fração de uma maneira geral é de difícil precipitação pelo TCA e pelo ácido acético, após a separação eletroforética, de uma maneira tal que pode ser observada após a coloração uma certa difusão do material. A fração F2-2, eluída imediatamente após a anterior, apresentava , além de um componente de migração semelhante a da fração F2-1, um outro sistema representado por uma banda de migração anódica. A fração F2-3 era constituída de uma banda de migração mínima, mantendo-se aparentemente em torno do ponto de aplicação.

Por imunodifusão em gel de agar, as diversas frações se comportaram segundo os resultados mostrados na Figura 8. Na concentração usada (1mg/ml), o digesto bruto apresentou pelo menos dois sistemas precipitantes, representados por dois arcos de precipitação. Um próximo ao poço cen-

tral, contendo o anti-soro, e o outro próximo ao poço do antígeno. Nestas condições não foi demonstrada a presença de sistema precipitante na interação fração F2-1 e anti-SAE. A fração F2-2 apresentava um sistema precipitante de identidade total com um dos sistemas precipitantes do digesto bruto. A fração F2-3 apresentava uma reação de identidade parcial com este mesmo sistema. A fração F2-4 apresentava uma reação de identidade parcial com um dos sistemas do digesto bruto e com a fração F2-3 e de identidade total com o outro arco de precipitação do digesto bruto.

Por imunoeletroforese em gel de agar, a fração F2-1 mostrou-se incapaz de revelar sistema precipitante visível com os soros anti-SAE utilizados (soros S1, S2, S3, S4 e S5).

O isolamento da fração F2-1, com mobilidade eletroforética diferente da molécula nativa, sem entretanto, ser capaz de formar sistema precipitante visível por imunodifusão ou imunoeletroforese, levou-nos a utilizar outra técnica com o intuito de demonstrar a manutenção da atividade imunológica deste fragmento da molécula de SAE. A técnica escolhida para esta finalidade foi a técnica de hemaglutinação passiva em que 100 ug da fração F2-1 foram utilizadas para sensibilizar hemácias de carneiro tratadas com ácido tânico.

Tabela I. Teor de proteínas das frações obtidas por cromatografia em DEAE-celulose da fração F2.

Amostra	mg de proteínas	% Rendimento
Digesto bruto	2.000	-
Fração F2	1.760	88,0
Fração F2-1	98	5,5
Fração F2-2	42	2,4
Fração F2-3	62	3,5
Fração F2-4	1.300	73,0
Total	-	84,4

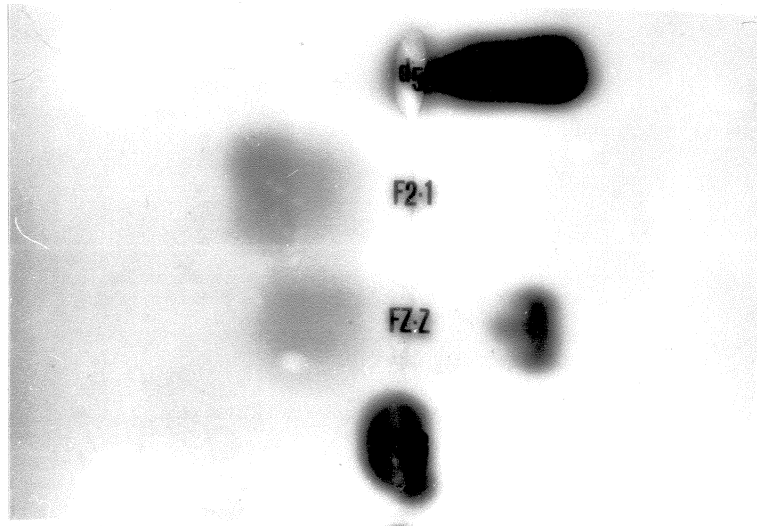


Fig. 7. Análise por eletroforese em gel de agar das frações do digesto de 5 horas isoladas por cromatografia em DEAE-celulose. Todas as frações continham 20mg de proteínas por ml.

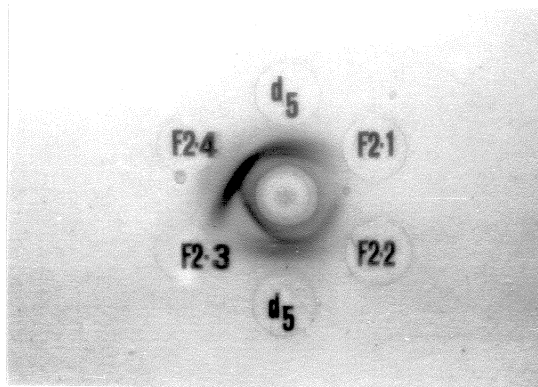


Fig. 8. Análise por imunodifusão das frações isoladas do digesto de 5 horas. No poço central foi aplicado o soro de coelho anti-SAE (S2) e a concentração de proteínas das diversas frações foi de 1mg/ml.

Os títulos aglutinantes, obtidos com os vários soros anti-SAE e hemácias de carneiro sensibilizadas com SAE ou com a fração F2-1, são mostrados na Tabela II onde pode-se observar que os títulos aglutinantes obtidos com o sistema SAE + anti-SAE são proporcionais aos títulos obtidos por precipitação em meio líquido e que os títulos obtidos com a fração F2-1 foram sempre menores que os obtidos com a molécula nativa.

Os títulos aglutinantes representam a recíproca da maior diluição dos anti-soros capaz de aglutinar as hemácias sensibilizadas com os antígenos. Como controles foram incluídas hemácias sensibilizadas com os diversos antígenos e sol. de NaCl 0,15 M e hemácias taninizadas e não sensibilizadas e as diluições dos antisoros correspondentes.

Com a finalidade de se demonstrar se o fragmento isolado ainda retinha a capacidade de reagir cruzadamente com antisoros heterólogos, determinou-se o título aglutinante de soros de coelhos anti-SAH com hemácias sensibilizadas com a fração F2-1. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela II. Comparativamente, foi determinado o título aglutinante dos soros anti-SAE e anti-SAH com hemácias sensibilizadas com o fragmento I-H da soro albumina humana. Dos resultados apresentados na Tabela II, pode-se observar que o fragmento I-H de uma maneira geral mostrou-se capaz de reagir com os soros homólogos e heterólogos em

maior intensidade que o fragmento F2-1.

Uma estimativa do peso molecular da fração F2-1 foi realizada por gel filtração em Sephadex G-50 comparando-se o diagrama de eluição desta fração com o fragmento I-H da soro albumina humana.

Em colunas de 1,25 X 98 cm (115,6 ml), contendo Sephadex G-50, foram aplicados inicialmente 3 ml de uma solução a 0,5% de azul dextran em NaCl 0,15 M + NaCl 1M(v/v). Após a aplicação, uma solução de NaCl 0,15 M foi ligada à coluna e o material eluído foi coletado em alíquotas de 4ml, num fluxo constante de 34 ml/hora.

As leituras do material eluído foram feitas em espectrofotômetro a 280nm e em condutivímetro.

Os dados obtidos são apresentados na Figura 9. Nestas condições, a fração de azul dextran foi eluída nos volumes de 46 a 56 ml, enquanto que o volume de mais alto valor de condutividade correspondia ao de 120ml.

Após a calibração da coluna, 4 ml da fração I-H a 5 mg/ml (20mg) foram aplicados à mesma coluna. Nas mesmas condições, descritas anteriormente, a fração I-H foi eluída entre 60 e 85 ml (absorção máxima: volume de 72ml) e o diagrama de eluição a 220 nm é mostrado na Figura 9. Nas mesmas condições, 20mg da fração F2-1 foi aplicada à coluna de Sephadex e eluída com solução de NaCl 0,15 M. As leituras correspondentes aos volumes eluídos são mostradas na

Tabela II: Determinação por hemaglutinação passiva dos títulos de anticorpos dos diversos soros anti-SAE e anti-SAH testados frente a hemácias de carneiro sensibilizadas com SAE, SAH, F2-1 ou I-H.

Soros	Título dos soros frente a hemácias sensibilizadas com os antígenos:			
	SAE	SAH	F2-1	I-H
Soros anti-SAE				
S1	6.400	200	200	16
S2	35.600	1.600	1.600	128
S3	12.800	800	< 1	32
S4	12.800	400	400	20
S5	32.000	1.600	1.024	64
Soros anti-SAH				
RI	100	400	2	64
RII	800	8.000	2	1.024
RIII	800	3.200	4	256
RIV	1.600	3.200	16	512
RV	1.600	8.000	16	1.024
RVI	9.000	32.000	< 1	4.096
RO	100	800	< 1	64

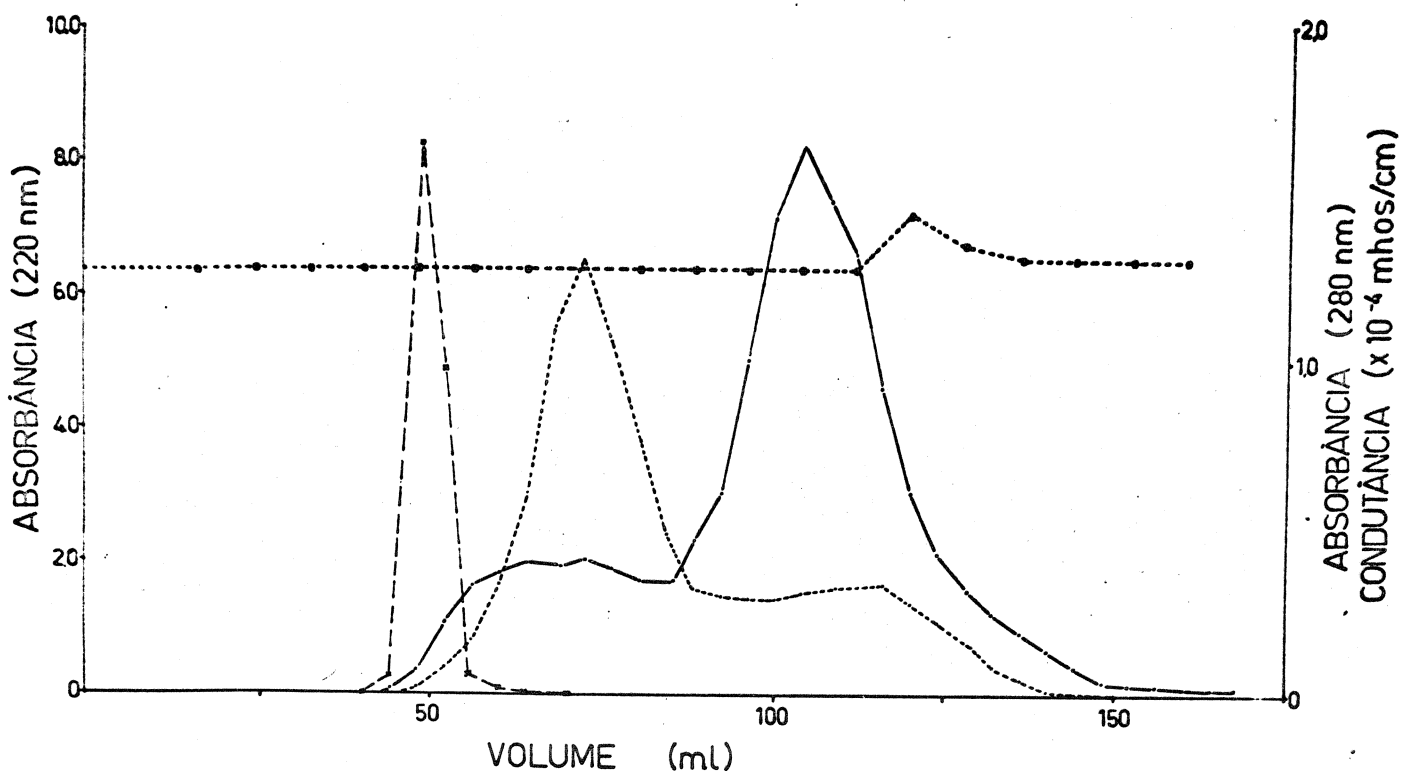


Fig. 9. Filtração em gel de Sephadex G-50 do fragmento I-H e da fração F2-1. As leituras em 280 nm correspondem a fração de azul dextran (- - - - -). As leituras da condutância representam a eluição da solução de NaCl 1M(••••••••••). As frações proteicas eluídas foram lidas a 220 nm e as curvas correspondentes ao fragmento I-H (••••••••••) e a fração F2-1 (-.-.-.-.) foram plotadas contra os volumes eluídos.

Figura 9. Nestas condições, uma fração de proteínas foi eluída nos volumes de 90 a 116 ml (volume de máxima absorção: 104 ml).

Esta fração, mesmo a baixa concentração, foi capaz de inibir totalmente a hemaglutinação do sistema Fração F2-1 + anti-SAE.

Quando 4 ug desta fração foram incubados com 0,1ml do anti-soro a 37°C por uma hora e adicionados, após este tempo, 25 ul de hemácias sensibilizadas com a Fração F2-1, isolada em DEAE celulose, a inibição da reação de hemaglutinação foi máxima. Os resultados obtidos são mostrados na tabela III.

D I S C U S S Ã O

Os resultados apresentados demonstram que a fração SAE, pura do ponto de vista eletroforético e imunoeletroforético, é cindida em seu motivo antigênico, pela catestpsina D de baços de coelhos, em pelo menos 3 componentes de mobilidade eletroforética e imunoeletroforética distintos.

No tempo de 5 horas de incubação da mistura o digesto obtido apresentava uma maior homogeneidade que os obtidos em tempos menores e mais longos de incubação. Nestas condições, 50% do produto obtido era não precipitável pelo ácido acético a 5%

A análise imunoeletroforética (Fig. 4) revelou a presença de 3 produtos distintos do ponto de vista eletroforético e imunológico. Três arcos de precipitação (a, b, c) podem ser demonstrados, sendo que dois destes componentes (arcos a e b) apresentam reação de identidade parcial entre si enquanto que o terceiro componente (arco a) apresenta uma marcada reação de não identidade com os componentes a e b. Este achado foi confirmado por imunoeletroforese cruzada contra o mesmo anti-soro. (Fig. 9).

Embora a ação proteolítica da cat. D sobre a soroalbumina equina possa ser comparada com os resultados da proteólise da soro albumina humana (LAPRESLE e DURIEUX-1958) e da soro albumina bovina (ARAÚJO - 1975) no que diz respeito ao isolamento de pequenos fragmentos de mobilidade eletroforética diferente da molécula nativa, baixo peso molecular e número reduzido de determinantes antigênicos, difere fundamentalmente na possibilidade de se obter, no produto da ação proteolítica da SAE, um componente de não identidade com os demais.

Os estudos do digesto de SAH efetuados por LAPRESLE e DURIEUX (1958) mostraram que o produto obtido era capaz de reagir com soros anti albumina humana nativa fornecendo por imunoeletroforese sistemas de precipitação que apresentavam identidade total e parcial entre si, Com os digestos de SAB, ARAÚJO (1975) não encontrou evidências da existência de determinantes antigênicos internos expostos' após a ação proteolítica da cat. D.

A possibilidade de se obter um componente de não identidade no digesto da soro albumina equina tem uma importância fundamental para os estudos posteriores de cinética da proteólise " in vivo " de antígenos proteicos, já que se torna imperativo o uso de antígeno que sofram proteólise com características particulares como ocorre '

com a SAE.

Após o tempo padronizado de incubação da mistura, um ajuste do pH a 4,7 possibilitou a separação de uma fração insolúvel neste pH que representava 12% do conteúdo total de proteínas do digesto. Esta fração (Fração F1) representava parte do digesto constituído provavelmente de albumina parcialmente degradada (Figura 5). A mobilidade e letroforética desta fração é idêntica a do componente de migração anódica do digesto bruto (Figura 5).

A fração solúvel neste pH (Fração F2) foi neutralizada e demonstrado, por eletroforese, ser composta de uma certa quantidade do componente de migração anódica e da fração de migração diferente a da albumina nativa (Figura 5).

Com a finalidade de se isolar esta banda de ponto isoelétrico diferente da molécula nativa de SAE, foram obtidas por cromatografia em DEAE-celulose, nas condições descritas anteriormente, quatro frações de mobilidade eletroforéticas distintas (Figura 7). A primeira fração apresentava uma mobilidade eletroforética semelhante a do componente de migração diferente da molécula nativa (Fração F2-1). A segunda fração, embora eluída imediatamente após a primeira, apresentava um contaminante de migração anódica (Fração F2-2). A terceira fração (Fração F2-3) era

representada por um componente de migração mínima, ficando quase que totalmente depositada em torno do ponto de aplicação.

Analisando-se as diversas frações por imunodifusão (Figura 8) contra soro anti-SAE, ficou demonstrado que a fração F2-1 não precipita com os soros anti-SAE testados.

As demais frações mostraram-se capazes de precipitar em gel de agar contra os vários anti-soros com padrões de precipitação distintos descritos nos resultados.

Quando testada por imunoeletroforese, a fração F2-1 foi incapaz de revelar sistema precipitante distinto mesmo quando testada a uma concentração de 20mg/ml e contra todos os anti-soros (S1 a S5), sugerindo ser constituída de um número reduzido de determinantes antigênicos.

O isolamento da fração F2-1, purificada do ponto de vista eletroforético e imunoeletroforético sem entretanto ser capaz de formar sistema precipitante visível, tornou obrigatório o uso de um método capaz de revelar se a atividade imunológica deste fragmento persistia.

Pela técnica de hemaglutinação passiva, ficou demonstrada a capacidade deste fragmento se combinar com soros anti-SAE fornecendo entretanto títulos bem menores do que os obtidos com a molécula nativa, o que demonstra

que apenas uma parte dos anticorpos anti-albumina se combinam com a fração isolada e que a quantidade de anticorpos que reagem com a fração F2-1 variam de um soro a outro. Os baixos títulos dos soros anti-SAH dificultaram, entretanto, uma afirmação categórica no que diz respeito a capacidade deste fragmento reagir cruzadamente com soros anti-SAH.

Uma cromatografia em Sephadex G-50 deste fragmento demonstrou a homogeneidade deste material e a diferença de peso molecular entre este fragmento e o fragmento da soro albumina humana denominado de I-H.

Este achado possibilitou a comprovação de que a dificuldade em se precipitar este fragmento pelo ácido acético ou pelo TCA a 5%, nos experimentos de eletroforese em acetato de celulose e gel de agar, ocorre, provavelmente, em virtude do baixo peso molecular deste fragmento. Isto dificultou em vários aspectos a quantificação das amostras após os tratamentos efetuados nas diversas etapas de purificação.

Os testes de inibição da hemaglutinação das duas frações obtidas por Sephadex demonstram a capacidade da 2a. fração em inibir totalmente a reação de hemaglutinação do sistema Fração F2-1, sensibilizada à hemácias de carneiro e soro anti-SAE quando incubada com diluições do antisoro na quantidade de 4 ug/0,1 ml de cada diluição.

O isolamento desta fração purificada demonstra a semelhança de proteólise da Catepsina D sobre a SAE e a SAH. Este fragmento (Fração F2-1), embora de peso molecular bem menor que 11.000, é capaz de se comportar imunologicamente de maneira semelhante ao fragmento I-H da soroalbumina humana. Os resultados obtidos neste trabalho inicial de isolamento, purificação e caracterização da Fração F2-1 estimulam-nos no sentido de se caracterizar melhor este fragmento. Isto poderá ser feito pelo emprego de outras técnicas de quantificação da interação antígeno-anticorpo do sistema: Fração F2-1 + anticorpos anti-SAE, pela ligação covalente do antígeno a um suporte insolúvel ou pela utilização de técnicas radioquímicas de marcação do antígeno.

Outro dado importante a ser determinado é o peso molecular deste fragmento por ultracentrifugação. A estimativa feita por gel filtração nos forneceu uma idéia deste peso molecular em relação ao do fragmento I-H da soroalbumina humana, entretanto tal diferença na velocidade de filtração no gel pode ser devida a diferenças em termos de estrutura conformacional entre estas duas moléculas.

Neste particular, estudos subsequentes devem ser realizados no sentido de se determinar se a conformação do peptídeo isolado é a mesma ou em que aspectos difere da estrutura molecular deste mesmo peptídeo na molécula nativa.

A determinação dos resíduos N-terminal e Carboxi-terminal bem como a análise e sequenciamento dos amino-ácidos que compõe o fragmento são dados relevantes a serem determinados subsequentemente.

A determinação adequada destes parâmetros químicos, físico-químicos e imunológicos possibilitarão novos estudos comparativos com os fragmentos I-H e I-B e principalmente com o fragmento F1 da soroalbumina humana no sentido de se investigar as bases estruturais da antigenicidade destes fragmentos e das reações cruzadas entre moléculas proteicas imunologicamente relacionadas.

R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

A soro albumina equina (SAE), submetida à ação proteolítica da Catepsina D de baços de coelhos, foi cindida, em seu motivo antigênico, em pelo menos três sistemas precipitantes eletroforeticamente distintos.

Neste digesto, pode-se demonstrar a existência de dois sistemas que, do ponto de vista imunológico diferem marcadamente quanto a seus determinantes antigênicos.

Por cromatografia em DEAE-celulose, pode-se isolar um fragmento de peso molecular estimado como sendo menor que 11.000 daltons e incapaz de formar sistema precipitante visível com soros anti-SAE, mas, capaz de reagir com estes antisoros como demonstrado por técnicas de hemaglutinação passiva e de inibição da hemaglutinação.

Os dados apresentados permitem afirmar que este fragmento apresenta em sua estrutura um número reduzido de determinantes antigênicos.

Uma demonstração clara da capacidade deste fragmento em reagir cruzadamente com soros anti-SAH não

pode ser feita em função, principalmente, dos baixos títulos aglutinantes dos soros utilizados.

Os resultados apresentados são estimulantes no sentido de se caracterizar melhor este fragmento para os estudos futuros sobre as bases químicas envolvidas na imunogenicidade deste fragmento e da molécula nativa de SAE e, no estudo das reações cruzadas desta proteína com outras imunologicamente relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAIR, G. S. and ROBINSON, M. E. - The specific refraction increments of serum albumin and serum globulin. - Biochem. J. , 24 : 993, 1930.

ARAÚJO, P. M. F. - Estudo imunológico da soroalbumina bovina degradada pela catepsina D de coelho. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1975.

BEHRENS, P. Q. ; SPIEKERMAN, A. M. and BROWN, J. R.- Structure of Human serum albumin. - Fed. Proc. , 34 (3) : 591, 1975.

BELLON, F. and LAPRESLE, C. - Chemical structure of two fragments of human serum albumin and their location in the albumin molecule. - Biochem. J. , 147 : 585 , 1975.

BORDUAS, A. G. and GRABAR, P. - L' hemagglutination passive dans la recherche des anticorps antiproteiques . Ann. Inst. Pasteur, 84 : 903, 1953.

BOYDEN, S. V. - The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination -

- tion by antiprotein. J. Exp. Med., 93 : 107, 1951.
- CLARKE, H. G. M. - Two-dimensional (Laurell) immunoelectrophoresis for estimation of antigen in relative units. - In: WILLIAMS, C. A. and CHASE, M. W. (Ed,) - Methods in immunology and immunochemistry. - Academic Press , London, v. III, 1971.
- DAWOOD, F. A. M. - Estudos sobre catepsina D de coelho : purificação e preparação de anti - soro monoespecífico. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1973.
- EDELMAN, G. M. et al - Immunological studies of human γ globulin. Relation of the precipitin lines of whole γ globulin to those of the fragment produced by papain. J. Exp. Med. , 112 : 203, 1960.
- EISEN, H. N. - Imunologia. In : DAVIS, B. D. et al. - Microbiologia, 2a Ed. , vol. 2, Edart , São Paulo , 1973.
- EISEN, H. N. - Immunology - An introduction to molecular and celular principles of the immune response . 2a Ed. , Harper & Row, Maryland, 1974.

FLODIN, P. - Dextran gels and their application in gel filtration. Uppsala, Sweeden, 1962.

GOMORI, G. - Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N. O. - Methods in enzymology. Academic Press Inc. Publ., N.Y., 1955.

GRABAR, P. and BURTIN, P. - Immuno-electrophoretic analysis. Elsevier Publ. Co., New York, 1964.

GUTTE, B. and MERRIFIELD, R. B. - The synthesis of ribonuclease A. J. Biol. Chem., 246 : 1922, 1971.

HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F. E. - The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. II - Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. J. Exp. Med. , 61 : 559, 1935.

KABAT, E. A. and MAYER, M.M. - Experimental Immunology. , Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill. , 1964.

KABAT, E. A. - The nature of an antigenic determinant. J. Immunol. - 97 (1):1 , 1966.

KATCHALSKI, E. et al. - Polyamino acids as protein model
- In: NEURATH, H. (Ed.) - The Proteins - 2a Ed., A
cademic Press, London, 1964.

LANDSTEINER, K. - The specificity of serological reac -
tions. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1945.

LAPRESLE, C. et DURIEUX, J. - Étude de la dégradation de
la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin
V - Antigénicité de l'albumine dégradée. - Ann. Ins-
titute Pasteur, 94 : 38, 1958.

LAPRESLE, C. et WEBB, T. - Étude de la dégradation de
la sérum albumine humaine par un extrait de la rate de
lapin. VII - Isolement et propriétés d' un fragment
d' albumine. - Ann. Inst. Pasteur. - 99: 523, 1960.

LAPRESLE, C. et WEBB, T. - Donnés actuelles sur les ba -
ses chimiques de la spécificité immunologique des pro -
téins. - Bull. Soc. Chim. Biol. - 46 (12) : 1701 ,
1964.

MAYER, M.M. et al. - Quantitatives studies of complement
fixation; method. - J. Immunol. 59 : 195, 1948.

NUSSENZWEIG, V. ; SELIGMANN, M. and GRABAR, P. - The de-

- gradation products of human fibrinogen by plasmin.
- II - Immunological study: existence of native anti-fibrinogen anti-bodies possessing different specificities. Ann. Inst. Pasteur. , 100 : 490, 1961.
- OSLER, A. G. - Quantitative studies of complement fixation. Bacteriol. Rev. 22 (4) : 246-266, 1958.
- OUCHTERLONY, O. - Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. - In: WEIR, D. M. (Ed.) - Handbook of experimental immunology. - Blackwell. Sci. Publ., Oxford , G.B., 1967.
- POOLE, A. R. ; DINGLE, J. T. and BARRET, A. J. - The immunocytochemical demonstration of cathepsin D. - J. Histochem. Cytochem. - 20 (4) : 261, 1972.
- PRESS, E. M. ; PORTER, R.R. and CEBRA, J. - The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D from bovine spleen. - Biochem. J. - 74 : 501 , 1960.
- RANGEL, H. - Estrutura antigênica da soro albumina equina. Ciência e Cultura, - 14 (4) : 256, 1962.
- RANGEL, H. - Study of the cross - reaction between

rabbit anti - bovine serum albumin antibodies and equine serum albumin. - Immunology. - 8 : 88 , 1965.

RANGEL, H. A. - Contribuição ao estudo imunoquímico das reações cruzadas entre as soroalbuminas humana, bovina e equina - Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1967.

RANGEL, H. A. - Isolamento e purificação de um fragmento de soroalbumina bovina capaz de reagir com soros anti-soro albumina humana. Resumos da XXII Reunião anual da SBPC, 413, 1970.

ROJAS - ESPINOSA, O. et al. - Purification and properties of cathepsin D type proteinase from beef and rabbit lung and its identification in macrophages. - Infect. Immunol. - 8 (6) : 1000, 1973.

SELA, M. - Antigenicity: Some molecular aspects. - Science, - 166: 1365 , 1969.

SIMMONS, D. A. R. - Stereochemical aspects of antigenic specificity in polysaccharide determinants. - Eur. J. Biochem. - 18 : 53 , 1971.

SOBER, H. A. and PETERSON, E. A. - Protein chromatography on ion exchange cellulose. - Fed. Proc. 17 : 1116, 1958.

WEICHSELBAUM , T. E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. - Amer. J. Clin. Path. Tech. - 10 : 40, 1946.