

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/10141**  
**IB/80543**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1988*

80543



MARIA DE FÁTIMA LOVO FARAH

BC/10141  
IB/80543

*Este exemplar corresponde  
à redação final da tese  
defendida pela candidata  
M. F. Lovo-Farah e aprovada  
pela comissão julgadora*

O ISOTIPO IgG DE ANTIDACTILOS.  
AS IMUNOGLOBULINAS G DO PECARI BRASILEIRO,  
Tayassu tajacu (Linnē, 1758)

Tese apresentada ao Insti-  
tuto de Biologia da Univer-  
sidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biolôgi-  
cas na Área de Genética.

Orientador - Prof. Dr. Benedito de Oliveira

Campinas - SP  
1988

20m

T/UNICAMP  
F221<sub>1</sub>



CLASSIF.	T
ATOR	F221e
EX	
IMBO BC	10/14/1
	IB/842

18/80543  
per 10141

Este trabalho foi realizado com os auxí-  
lios concedidos pela Fundação de Amparo a Pesq  
quisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científiq  
co e Tecnológico (CNP<sub>q</sub>) e pela Coordenadoria de  
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES).

Este trabalho foi realizado  
no Laboratório de Quí  
mica de Proteínas do Departa  
mento de Bioquímica do  
Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de  
Campinas.

*Aos meus pais pelo apoio  
recebido.*

*Ao Jorge, pelo incentivo  
e colaboração.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. Paulo Renato Costa Souza, ao DD. Diretor do Instituto de Biologia, Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães e ao chefe do Departamento de Bioquímica, Prof. Dr. Benedito de Oliveira, pelo incentivo às atividades científicas desenvolvidas na UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., DD. Coordenador da Subcomissão de Pós-Graduação em Genética, pela atenção e apoio dispensados.

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira, Prof. Titular de Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, a quem devo minha introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pelo incentivo e colaboração para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Hebe Myrina Laghi de Souza, pela leitura e discussão dos aspectos genéticos do trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio, pela atenção dispensada, discussão e sugestões apresentadas.

À pós-graduanda Gabriela M. Rennebeck, pelo auxílio na confecção das figuras.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
I. INTRODUÇÃO .....	2
II. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
1. Animais utilizados .....	9
2. Antígenos .....	9
3. Dosagem de proteínas .....	9
4. Preparo de antígenos .....	10
5. Preparo do soro de coelho anti-soro normal de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) .....	10
6. Preparo do soro de coelho anti-imunoglobulina IgG de <u>Tayassu tajacu</u> .....	11
7. Preparo do soro de coelho antifrimento Fc de IgG de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) .....	12
8. Imunização de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) .....	12
9. Análise imunoeletroforética .....	13
10. Imunodifusão .....	15
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	15
12. Precipitação com sulfato de amônio .....	17
13. Cromatografia de troca iônica.....	18
14. Filtração em gel de exclusão molecular .....	18
15. Digestão pela papaína .....	19



16.	Redução e alquilação da imunoglobulina IgG lenta de <u>Tayassu tajacu</u> .....	20
17.	Análise de aminoácidos .....	21
18.	Cromatografia de afinidade. Proteína A-Sepharose...	25
III.	RESULTADOS .....	26
1.	A análise imunoeletroforética do soro imune de <u>Tayassu tajacu</u> .....	27
2.	Purificação e identificação da imunoglobulina IgG lenta de <u>Tayassu tajacu</u> .....	27
3.	Purificação e identificação de imunoglobulina IgG rápida de <u>Tayassu tajacu</u> .....	30
4.	Comparação antigênica de imunoglobulina G lenta e da imunoglobulina G rápida de <u>Tayassu tajacu</u> (L.) utilizando-se como revelador anti-soro específico anticadeia gama humana.....	33
5.	Fragmentação enzimática pela papaína, da imunoglobulina IgG lenta de <u>Tayassu tajacu</u> .....	33
6.	Obtenção de soro antifragmento Fc da imunoglobulina IgG lenta de <u>Tayassu tajacu</u> .....	35
7.	Discriminação entre as populações IgG lenta e IgG rápida do soro imune de <u>Tayassu tajacu</u> utilizando-se soro de coelho antifragmento Fc de IgG lenta...	40
8.	Separação das cadeias H (pesada) e L (leve) da imunoglobulina IgG lenta de <u>Tayassu tajacu</u> .....	40

9.	Composição global de aminoácidos das imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida de soro imune de <u>Tayassu tajacu</u> .....	43
10.	Cromatografia de afinidade das imunoglobulinas G de <u>Tayassu tajacu</u> em Proteína A - Sepharose.....	43
11.	Eletroforese em gel de poliacrilamida das imunoglobulinas G de <u>Tayassu tajacu</u> .....	52
IV.	DISCUSSÃO .....	54
V.	RESUMO e CONCLUSÕES .....	67
VI.	SUMMARY .....	71
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## I - INTRODUÇÃO

A invasão de um vertebrado imuno competente por agentes estranhos ativa uma complexa rede defensiva de moléculas e células engajadas na proteção do organismo.

As moléculas de anticorpo, encontradas nos fluidos biológicos e secreções constituem o que se conceitua como resposta imune humoral.

A investigação imunoquímica da resposta imune humoral deixou claro que os anticorpos ou imunoglobulinas, são bastante heterogêneas em termos de mobilidade eletroforética, características antigênicas e estrutura química.

A análise das proteínas séricas revelou a heterogeneidade de antigênica dos anticorpos que foi traduzida na identificação das classes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Foi demonstrado que esses grupos antigênicos estão presentes em diferentes espécies de vertebrados.

O aprimoramento das técnicas de química de proteínas aplicadas ao fracionamento do soro levou ao isolamento das diferentes classes de imunoglobulinas de vertebrados e demonstrou que são constituídas de uma estrutura básica de duas cadeias polipeptídicas "leves" e duas "pesadas" interligadas por ligações covalentes do tipo ponte dissulfeto.

O tipo mais comum é a molécula de IgG que está presente em concentrações grandes, mesmo no soro normal.

O modelo molecular IgG foi elucidado graças aos trabalhos pioneiros de dois grupos de pesquisadores liderados por

PORTER e EDELMAN.

A "clivagem" da molécula do tipo IgG em fragmentos menores e que retinham atividade biológica demonstrável foi conseguida com sucesso por PORTER, 1959, através da digestão enzimática de IgG de coelho com papaína.

Ficou demonstrada a factibilidade de se isolar dois tipos de fragmentos de peso molecular ao redor de 50.000 daltons: um tipo denominado Fab que retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno e outro denominado Fc, -que no caso da IgG de coelho se cristaliza e, onde se localizam os determinantes antigênicos classe-específicos. Este fragmento está comprometido com o desencadeamento de funções efetoras da molécula do anticorpo, como a interação com o complexo complemento e o desencadeamento de reações de hipersensibilidade do tipo imediato (UTSUMI, 1969).

O grupo de pesquisadores liderado por EDELMAN (1959) na Universidade Rockefeller demonstrou que a molécula de gamaglobulina é constituída de mais de um tipo de cadeia polipeptídica.

O aprimoramento da metodologia de separação das cadeias polipeptídicas H e L permitiu uma comparação detalhada das seqüências de aminoácidos das cadeias polipeptídicas de diferentes imunoglobulinas e trouxe informações e surpresas. Todas as cadeias polipeptídicas das moléculas de imunoglobulinas contêm uma região relativamente constante (C) e outra contendo aproximadamente os 120 resíduos a partir da região N terminal que foi deno

minada região variável (V).

A análise da estrutura primária conduziu à revelação de regiões de homologia arranjadas em "tandem" ao longo das cadeias polipeptídicas H e L. Assim, a cadeia pesada é constituída de quatro regiões de homologia (VH, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>) constituída de aproximadamente 80 a 90 resíduos de aminoácidos "estabilizadas" principalmente por uma ponte dissulfeto intra-cadeia. Entre as regiões CH<sub>1</sub> e CH<sub>2</sub> foi detectada uma região denominada "hinge" ou dobradiça, com alto teor de prolina e onde se situam as meias cistinas que fazem a junção inter H e que caracteriza cada classe e subclasse de imunoglobulina. A cadeia leve (L) mostra uma relação de coerência estrutural com a cadeia H mas é constituída de duas regiões de homologia denominadas VL e CL. A periodicidade das regiões de homologia ao longo das cadeias H e L de imunoglobulinas levou EDELMAN à hipótese dos domínios. De acordo com esta hipótese a expressão da atividade biológica estaria circunscrita às regiões de homologia denominadas domínios. As evidências experimentais disponíveis até a presente data mostra, por exemplo, que a ativação do complemento pela via clássica, depende de uma interação direta do domínio CH<sub>2</sub> com o primeiro componente da cascata molecular do complemento, ou seja, com C<sub>1q</sub>; (SANDBERG et al., 1969, 1970, 1971); o desencadeamento de reações de hipersensibilidade (no caso da IgG de coelho) depende da interação quaternária dos domínios CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> na forma dimerizada e covalentemente ligados pela única ponte dissulfeto inter H. (SIRAGANIAN e OLIVEIRA, 1968).

A presença de ambas as regiões, constante e variável, há muito tempo sugere que o DNA que codifica as cadeias leves deve ter-se originado da atuação conjunta de dois genes, um para a região variável e outro para a região constante. Isto foi demonstrado por HOZUMI e TONEGAWA, 1976, que descobriram que os genes para as porções constante e variável de um tipo específico de cadeia leve estão muito próximos no DNA do imunócito competente que produz este tipo de cadeia leve, mas, muito distantes no DNA de outras linhagens de imunócitos incapazes de fazer este tipo de cadeia leve.

Metodologias como a do DNA recombinante e análise de seqüências polinucleotídicas levaram à hipótese "dois genes — uma cadeia polipeptídica" e permitiram a discussão de problemas, tais como o fenômeno da exclusão alélica, o arranjo dos genes que codificam as cadeias polipeptídicas de imunoglobulinas e o problema da origem da diversidade das moléculas de anticorpo (WEILER, 1965) (HOOD e TALMAGE, 1970 (WEIGERT et al., 1978).

Técnicas de clonagem de DNA permitiram que seqüências desoxinucleotídicas de células engajadas na produção de anticorpos revelassem que os fragmentos de DNA responsáveis pela expressão de uma cadeia polipeptídica leve ou pesada ao serem "transcritos" em RNA e depois "traduzidos" nas seqüências de aminoácidos, não são contínuos, mas interrompidos por segmentos de DNA "silenciosos". As regiões intragênicas expressas foram denominadas "exons" e o conjunto de segmentos "intervenientes" denomina

dos "introns". (GILBERT, 1978).

As moléculas de imunoglobulinas compreendem uma família de proteínas com a mesma arquitetura molecular básica mas que exibem uma variada gama de especificidades de ligação com antígenos e diferentes atividades biológicas. Está demonstrado que estas diferentes atividades são um reflexo de diferenças estruturais ditadas pela seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas (EDELMAN et al., 1969). Esta heterogeneidade estrutural tem constituído um obstáculo para os químicos que estudam proteínas, mas os plasmocitomas de origem humana e de camundongo fornecem imunoglobulinas homogêneas (monoclonais) que facilitaram o estudo da seqüência de aminoácidos da molécula de anticorpos.

Mesmo as porções constantes das cadeias polipeptídicas de imunoglobulinas, que não estão diretamente ligadas na combinação com o antígeno, apresentam considerável heterogeneidade. Isto foi analisado através do uso de antisoros específicos para grupos característicos nas moléculas (UTSUMI, 1969).

A proteína urinária de Bence Jones, obtida de pacientes com mieloma múltiplo, e que é dímero de cadeia leve de imunoglobulina possibilitou o avanço de estudos relacionados com este problema (EDELMAN & GALLY, 1962). A obtenção de antisoros de coelhos para proteínas de Bence Jones permitiu a constatação que as cadeias leves poderiam ser divididas em dois grupos - chamados Kappa (K) e lambda ( $\lambda$ ), cada molécula de imunoglobulina carrega uma classe de cadeia leve, K ou  $\lambda$ , mas não



ambas. Algumas espécies de vertebrados têm predominantemente um tipo; cerca de 95% das cadeias leves em camundongo são do tipo K (BURSTEIN, SCHECHTER, 1977). No homem e na cobaia as cadeias le ve K e  $\lambda$  apresentam-se em quantidades equivalentes (EISEN, 1980).

As diferentes classes de imunoglobulinas têm diferenças antigênicas distintas nas cadeias pesadas (H), denominadas  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ , que podem ser detectadas por métodos químicos e sorológicos. Também antisoros específicos conseguem distinguir diferenças dentro de uma mesma classe de imunoglobulina como pa ra a IgG humana onde quatro subclasses denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram detectadas (COHEN & MILSTEIN, 1967; ISHIZAKA et al., 1967; TERRY, 1965). Estas diferenças aparecem em todos os indivíduos normais de uma dada espécie e são denominados de terminantes isotípicos.

O presente trabalho tem como objetivo a identificação do isotipo IgG no soro do Artiodáctilo, Tayassu tajacu, fornecendo suporte para estudos de homologia das imunoglobulinas do pecari brasileiro em termos de filogenia molecular com proteínas homólogas de outras espécies.

## II - MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. Animais utilizados

Foram utilizados exemplares de Tayassu tajacu (LINNÉ, 1758)<sup>1</sup>, conhecidos como catetos, pecaris ou porcos do Novo Mundo, criados em condições especiais no Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu (UNESP) sob supervisão do Dr. Flávio Massone.

Os coelhos utilizados para imunização foram espécimes de linhagem não-definida ("outbred").

## 2. Antígenos

Como antígenos foram utilizados: HSA (soro albumina humana), Hemocyanina de Megalobulinus ovatus, purificada,<sup>2</sup> DNP BGG (gamaglobulina bovina dinitrofenilada), DNP HSA (soro albumina humana dinitrofenilada).

## 3. Dosagem de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo reativo de biuret, modificado de DITTEBRANDT (1948) e também pela absorbância

---

(1) Agradecemos ao Dr. Pierre Montouché, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo levantamento de classificação dos animais utilizados.

(2) Cortesia da Dra. Lucia Pereira da Silva, professora Livre-Docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

em comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro Beckman modelo 25. O método modificado de Dittebrandt permite uma maior sensibilidade para dosar proteínas (20 a 400 g), utilizando-se para o Reagente: 9.0 g de tartarato de sódio e potássio, 3.0 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5.0 g de iodeto de potássio e hidróxido de sódio a 10% completando o volume para 1000 ml.

#### 4. Preparo de antígenos

O adjuvante foi preparado segundo FREUND (1956). Em um almofariz foram emulsificadas 15 g de lanolina em 85 ml de nujol; adicionou-se, então, 100 mg de BCG<sup>3</sup>. Os antígenos liofilizados foram dissolvidos em solução salina 0.15 M. Esta mistura foi homogeneizada no adjuvante de FREUND preparado como acima descrito, de modo a se ter uma concentração final de 10 mg/Ag ml.

#### 5. Preparo do soro de coelho anti-soro normal de Tayassu tajacu (L.)

Os coelhos foram inoculados com soro normal de Tayassu,<sup>4</sup>

---

(3) Cortesia do Dr. Murillo A. Soares, Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Butantã.

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

na concentração final de 10 mg prot/ml, como descrito no capítulo métodos. Foram utilizadas doses de reforço, neste caso, o antígeno foi diluído em salina fisiológica na concentração de 1,0 mg prot/ml. O esquema de imunização empregado foi: 1.<sup>a</sup> inoculação-antígeno emulsificado em adjuvante de Freund completo (10 mg de prot/animal), injetado via intra-muscular em dois locais junto a inserção muscular próxima das patas posteriores; 2.<sup>a</sup> inoculação - (três semanas após a primeira) - antígeno em adjuvante de Freund completo (10 mg de prot./animal) injetado via intra-muscular em dois locais como na 2.<sup>a</sup> inoculação; 3.<sup>a</sup> inoculação - (quatro semanas após a primeira) - antígeno diluído em salina fisiológica (1,0 mg de proteína por animal), administrado via intradérmica em quatro locais no dorso depilado. 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 foram realizadas semanalmente, o sangue foi processado e os soros correspondentes catalogados e mantidos a - 20°C.

#### **.6. Preparo do soro de coelho antiimunoglobulina IgG de Tayassu tajacu**

Os coelhos utilizados foram inoculados com IgG de Tayassu

purificada, emulsificada em adjuvante de Freund completo, na concentração final de 10 mg de prot/ml. Como reforço, foram utilizadas doses de IgG purificada de soro de Tayassu na concentração de 1,0 mg de prot/ml diluído em salina fisiológica. O esquema de imunização foi idêntico àquele empregado para obtenção do soro de coelho anti-soro total de Tayassu. Os soros foram catalogados e mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **7. Preparo do soro de coelho antifrimento Fc de IgG de Tayassu tajacu (L.)**

Foram inoculados dois coelhos com fragmento Fc de purificado de IgG de Tayassu, segundo descrito neste capítulo. Os soros foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **8. Imunização de Tayassu tajacu (L.)**

Os antígenos utilizados foram emulsificados em adjuvante de Freund completo (30 mg de prot./animal de 40 a 50 quilos de peso) e, injetados via intra-muscular em dois locais, nas duas patas traseiras. Três semanas após a primeira inoculação o emul

sificado em adjuvante de Freund completo (30 mg de prot./animal) foi injetado novamente via intramuscular nas patas traseiras. Na quarta semana o antígeno diluído em salina fisiológica, foi injetado via intradérmica em quatro locais na pele (10 mg proteína por animal). Seguiram-se outras inoculações com intervalo de uma semana até se obter nos locais de inoculação intradérmica, uma reação inflamatória positiva. Foram feitas sangrias, o sangue foi colhido e os soros individuais estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 9. Análise imunoeletróforética

A imunoeletróforese foi realizada seguindo GRABAR e WILLIAMS (1953), nas condições descritas em seguida:

### Preparo das lâminas

Uma solução de ãon ágar (Oxoid nº 2) em tampão veronal pH 8.4, foi autoclavada a  $110^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, obtendo-se desta maneira um gel de ágar límpido e transparente. Lâminas de microscópio em suporte de plástico rígido (Gelman immunogramas, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Michigan, USA), foram recobertas com uma solução quente de ágar a 1% em tampão veronal pH 8.4. Depois da solidificação do ágar foram escavados poços segundo esquema

padrão (Gelman Electrophoresis Punch Set, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Michigan, USA).

### **Eletroforese**

Nas extremidades das lâminas preparadas foram aplicadas tiras de papel de filtro Whatmann nº 3 MM, umedecidas com o tampão de corrida, para funcionar como "ponte" entre o ágar e os compartimentos contendo, o tampão veronal pH 8,4 da cuba eletroforética.

Uma diferença de potencial de 200 V foi aplicada nos eletrodos por 120 minutos, obtendo-se assim separação das proteínas em estudo. Após eletroforeses, o ágar das canaletas é removido com uma ferramenta, fabricada para este fim (Gel knife 6835 A, LKB imunoelectrophoresis Equipment, Sweden), e é preenchida com anti-soro. As lâminas foram então deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 24 horas, para a formação das linhas de precipitação.

Após esse período de tempo, as lâminas foram lavadas em salina por 24 horas, para retirar as proteínas não precipitadas, e em seguida lavadas com água destilada por 2 horas, e recobertas com papel filtro, umedecido com água, e, finalmente deixadas secar em estufa a 37°C. Quando secas foram coradas com negro de amido a 0,5%, e o excesso de corante retirado com uma solução de ácido acético glacial a 4%.



## 10. Imunodifusão

Análises por imunodifusão foram realizadas em gel de ágar (Ion Ágar Oxoid nº 2) a 1% segundo OUTCHTERLONY (1958).

As análises foram assim realizadas: lâminas limpas de microscópio foram recobertas com uma solução quente de ágar a 1% (contendo mertiolato 1:1000) em tampão veronal pH 8.4 de modo a se obter camada de aproximadamente 3 mm de espessura após gelificação, em seguida foram escavados no ágar os poços necessários para aplicação do soro e anti-soro através de aparelhagem (Grafar Gel Michigan, Assembly Grafar auto Gel Corporation, Detroit Michigan, USA). No poço central foi aplicado o anti-soro e nos poços periféricos as frações a serem identificadas. As lâminas foram deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período de tempo as lâminas foram lavadas e coradas pela técnica descrita para eletroforese.

## 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O método utilizado foi essencialmente aquele de SHAPIRO e colab. (1967), WEBER e colab. (1969), com modificações.

## Preparação do gel

O gel de concentração contendo 5% e o gel de separação contendo 10% de acrilamida foram preparados a partir de uma solução estoque 0,3 M de acrilamida e 4 mM de bis acrilamida, dissolvidos em água desionizada. Essas soluções foram filtradas em papel de filtro Whatmann nº 1 e mantidas a 4°C em frasco escuro. O gel de concentração foi preparado a partir de tampão Tris HCl, 1M pH 6.8 e o de separação com tampão Tris HCl pH 8.6 ambos com SDS 0,1%. A cada gel foi acrescentado 0,025 ml (v/v) de N, N, N', N' - Tetrametiletilenediamina (Temed) e de uma solução de persulfato de amônio (10%).

O gel de separação foi colocado entre duas placas de vidro plano tipo borosilicato resistente a temperaturas altas e ataques químicos cortado nas dimensões de 160 x 145 mm (separadas por um espaçador de acrílico de 2 mm de espessura) até a altura de aproximadamente 100 mm. Após a polimerização foi colocado o gel de concentração até a borda da placa de vidro (aproximadamente 40 mm de altura).

## Preparação da amostra

As amostras (10 a 50 µl de uma solução de aproximadamente 1 mg de proteína por ml) foram dissolvidas em tampão Tris HCl 0,08 M pH 6.8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,001% de bromofenol. Estas amostras foram analisadas na sua forma não reduzida e na forma reduzida com ditiotreitól na concentração final de 0,1 M. As amostras foram imersas em água em ebulição durante

dois minutos. Como marcadores foram utilizados a proteína de Bence Jones na forma dimérica (PM 50.000), a imunoglobulina GOB monoclonal do isotipo IgG1 (PM 150.000), a imunoglobulina monoclonal FKW do isotipo IgG3 (PM 170.000), soro albumina humana (PM 60.000) e anidrase carbônica (PM 30.000).

A eletroforese foi realizada em tampão tris HCl 0,025 M glicina 0,192 A e SDS 0,1% a 100 V durante 4 horas.

### **Coloração**

O gel retirado do suporte de vidro é corado em Comassie blue 0,1% a 37°C e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

### **12. Precipitação com sulfato de amônio**

O soro de Tayassu foi precipitado com sulfato de amônio na concentração final de 50% sob agitação lenta a 6°C. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. O precipitado de gamaglobulina foi redissolvido em tampão fosfato 0.1M, pH 8.6 e em seguida dialisado contra tampão fosfato 5mM, pH 8.0 por 24 horas, a ausência de íons sulfato foi confirmada através de teste qualitativo com cloreto de bário a 2%. O material, obtido deste modo, foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 minutos e o precipitado desprezado, sendo o sobrenadante (pseudoglobulina) utilizado no fracionamento.

### 13. Cromatografia de troca iônica

Foi utilizada a resina de DEAE-celulose (DE-52 Whatman) equilibrada em tampão fosfato 5mM pH 8.0. O soro imune de *Tayassu* (30 ml) foi dialisado durante 24 horas contra o tampão de equilíbrio da resina. Após a diálise o soro foi centrifugado a 5.000 rpm durante 15 minutos; o precipitado (Euglobulina), foi dissolvido em tampão 0,1 M pH 8.0 e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante (Pseudoglobulina), foi passado através de coluna de DEAE-celulose (2,0 cm de diâmetro e 50,0 cm de altura). As frações eluídas em fosfato 5 mM, pH 8.0 e NaCl 1M, foram coletadas com auxílio de aparelhagem Gilson num volume de 3,0 ml por tubo em fluxo descendente de 20 ml/hora. A leitura dos eluatos foi realizada por absorção em espectrofotômetro Beckman modelo 25, utilizando-se cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. As frações obtidas foram dialisadas contra salina fisiológica, por um período de 24 horas em câmara fria e em seguida liofilizadas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 14. Filtração em gel de exclusão molecular

Para a filtração em gel, foi utilizada coluna de vidro de procedência Pharmacia Upsalla (2,5 x 100 cm) "empacotada" com

Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), entumescido em tampão fosfato 0,1M, pH 8.0; o volume útil de gel foi 300 ml. Foram aplicados 2,0 ml de material, contendo 150 mg de proteína, previamente dialisada contra o tampão de equilíbrio; as frações foram eluídas com o mesmo tampão. A coluna foi calibrada com azul de Dextran, Soro Albumina Bovina (BSA) e IgG mielomatosa GOB (isolada em nosso laboratório). Conhecidos os parâmetros  $V_o$ ,  $V_t$  e  $V_e$ , foram determinados os valores de  $K_{av}$  para IgG GOB e albumina, segundo Laurent e 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 eluído 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.

## 15. Digestão pela papaína

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

As imunoglobulinas IgG lenta de Tayassu purificadas por cromatografia em DEAE celulose, foram submetidas à digestão pela papaína (Worthington Biochemical Corporation) na relação enzima substrato 1:100 mg em presença de cisteína 0.1M volume final 5,0 ml e pH ajustado para 8.4. Os tempos de incubação a 37°C foram de 16 e 20 horas. A reação enzimática foi interrompida com iodoacetato 0.1 M, pH 8.0, e o digesto submetido à análise imunoeletroforética.

#### **Purificação dos fragmentos obtidos pela digestão com papaína**

O digesto total (100 mg) foi dialisado em tampão fosfato 5 mM, pH 8.0 durante 24 horas, logo após centrifugado durante 15 minutos a 5.000 rpm. O digesto foi então 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" exhaustivamente neste tampão e em seguida foi aplicada uma solução de NaCl 1M, com a qual se obteve um segundo pico de densidade ótica.

#### **16. Redução e alquilação da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu tajacu**

A imunoglobulina IgG lenta de Tayassu foi reduzida segundo o método de LAMM et al., (1966). A proteína purificada e liofilizada

zada (70 mg) foi dissolvida em 2.0 ml de Tris 0.5 M pH 8.6, guanidina 6M e EDTA 0.001 M. Em seguida foi adicionado a esta solução 10 mg de DTT dissolvido em 1.0 ml de Tris 1.0 M. As duas soluções foram borbulhadas com N<sub>2</sub> separadamente e após a mistura. Em seguida esta mistura foi deixada a 37<sup>o</sup>C por 90 minutos. Após este tempo a reação foi bloqueada com 1.0 ml de ácido iodoacético (190 mg/ml) e a solução novamente borbulhada com N<sub>2</sub>. O pH foi acertado para 9.0 com solução de Tris-HCl 0.1 M e levado a Banho-Maria 37<sup>o</sup>C por 90 minutos. O material resultante foi submetido a uma filtração em gel de Sephadex G100, através de uma coluna (2.0 x 120 cm), entumescida em guanidina 6.0 M pH 5.5.

## 17. Análise de aminoácidos

### Instrumental

As amostras foram analisadas num auto analisador de aminoácidos construído após modificação do esquema original de ALONZO & HIRS (1968). O método de análise foi o de SPACKMAN et. al. (1958).

Utilizou-se o sistema de duas colunas: uma para resolução dos aminoácidos ácidos e neutros (coluna AN) de 530 x 10 mm e outra para resolução dos aminoácidos básicos (coluna B) de 130 x 10 mm.

A resina na coluna AN foi do tipo Aminex A6 e na coluna B, utilizou-se resina do tipo Aminex A5 (BIO RAD. Labs., Richmond, Cal.).

Na coluna AN foram utilizadas dois tampões: citrato de sódio 0,2 N pH 3,25 e citrato de sódio 0,2 N pH 4,25. Na coluna B foi utilizado tampão citrato de sódio 0,5 N pH 5,25.

O controle de temperatura foi ajustado por termorreguladores a 52,5°C (COLUNA B) e 52,5 e 60°C (COLUNA AN).

O registro gráfico correspondente às leituras das três células do fotômetro (MER 1020 MOUNTAIN VIEW, Cal.) é simultâneo: (1) 570 nm e caminho óptico de 12 mm; (2) 570 nm e caminho óptico de 6,6 mm e (3) 440 nm e caminho óptico de 12 mm, feito por pontos, por um registrador do tipo Eletronik 15 Strip Chart Multipoint Recorder (Honeywell Ltd, Ontario) em escala de 0 a 0.1 unidades de absorbância.

A reação com ninhidrina (Pierce Chemical Co., Rockford, III) ocorreu a  $97 \pm 1,0^\circ\text{C}$  em um banho (S.G.A. Scientific Inc.; Bloomfield, N.J.) com temperatura regulada por reostato tipo 116 B (The Superior Electric Co., Conn).

#### Solução padrão de aminoácidos

Foi usada como referência uma solução padrão (AMINO ACID STANDARD H, Pierce). As leituras são integradas em 570 nm (12 mm de caminho óptico) exceto para prolina cuja leitura é integrada no canal de 140 nm (12 mm de caminho óptico). As integrações fo



ram realizadas pelo método manual, utilizando-se as constantes determinadas a partir da solução padrão segundo a relação  $K = A/M$ , onde;  $K$  = constante de integração;  $A$  = área determinada por integração manual;  $M$  = quantidade absoluta de aminoácido padrão expressa em nanomoles.

Para cada análise, norleucina foi acrescentada às amostras, como controle do parâmetro tempo de eluição. As amostras, foram dissolvidas em volumes iguais de tampão citrato de sódio 0,2 N pH 2,2 e polietilenoglicol 30%.

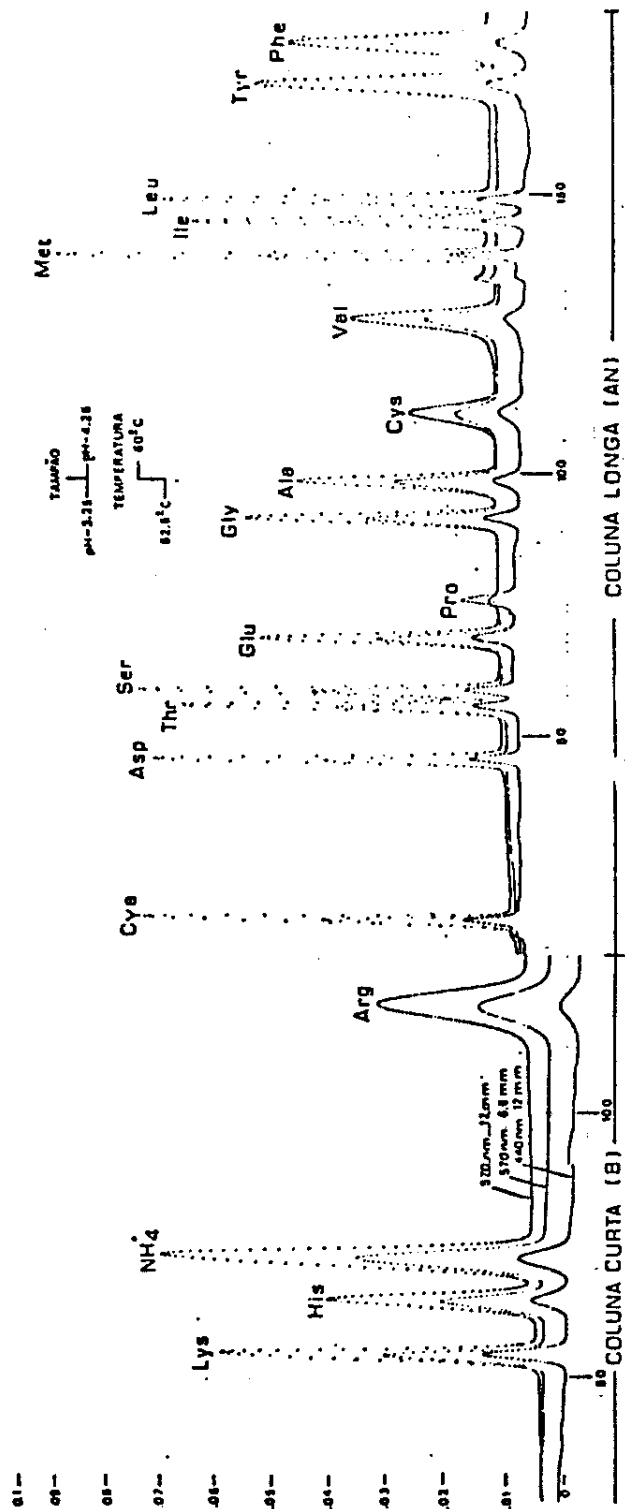
#### Hidrólise ácida

As hidrólises foram efetuadas em tubos pirex de 13,0 x 0,9 cm, fechados a vácuo em presença de HCl 6 M, acrescentado de fenol 1 mg/ml, para evitar a formação de clorotirosina (SANGER e colab. 1963).

As hidrólises foram realizadas à temperatura de  $106^{\circ}\text{C}$  em uma estufa Forma Scientific, com convecção forçada em com variação de temperatura não superior a  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Para os diferentes peptídeos obtidos, o tempo de hidrólise foi de 24 hs.

#### Cálculos

Nas proteínas, os valores obtidos são expressos em número de moles de resíduo por mol de proteína. O valor calculado



Registro gráfico de uma análise automática de aminoácidos. Uma pequena variação na linha de base, detectada nos três canais aos 147 minutos na coluna longa, indica sistematicamente a mudança de tampão de pH 3.25 para pH 4.25.

para cada resíduo representa a média dos valores obtidos nos diferentes tempos de hidrólise, exceto para os aminoácidos cujos valores não são constantes com o tempo de hidrólise ácida.

Os valores de treonina e serina foram extrapolados para o tempo zero, uma vez que tendem a diminuir com o tempo de hidrólise. Os valores de valina, isoleucina e leucina foram aqueles de 72 horas, pois estes aminoácidos têm seus valores aumentados com o tempo de hidrólise (BAYLEY, 1962).

#### 18. Cromatografia de afinidade. Proteína A - Sepharose

Foi utilizada Proteína A de Stafilococcus aureus acoplada covalentemente a Sepharose CL-4B pelo método brometo de cianogênio (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden). A proteína A foi acoplada ao gel na concentração de 2 mg/ml e a capacidade de ligação com a IgG humana foi de aproximadamente 25 mg IgG/ml de gel.

A resina de Sepharose Proteína A foi equilibrada em tampão fosfato 0,1M pH 8.0. Através de coluna de vidro (1,2x15cm) foram aplicados 2,0 ml de soro imune de Tayassu, e/ou frações com atividade de anticorpo detectável, à temperatura de 5°C. O efluente foi coletado em tampão fosfato 0,1 M pH 8.0 e a resina lavada com o mesmo tampão. O tampão de eluição foi glicina 0,2M pH 2.78, 0,5 NaCl. O material eluído foi rapidamente neutralizado com hidróxido de sódio 5 N.

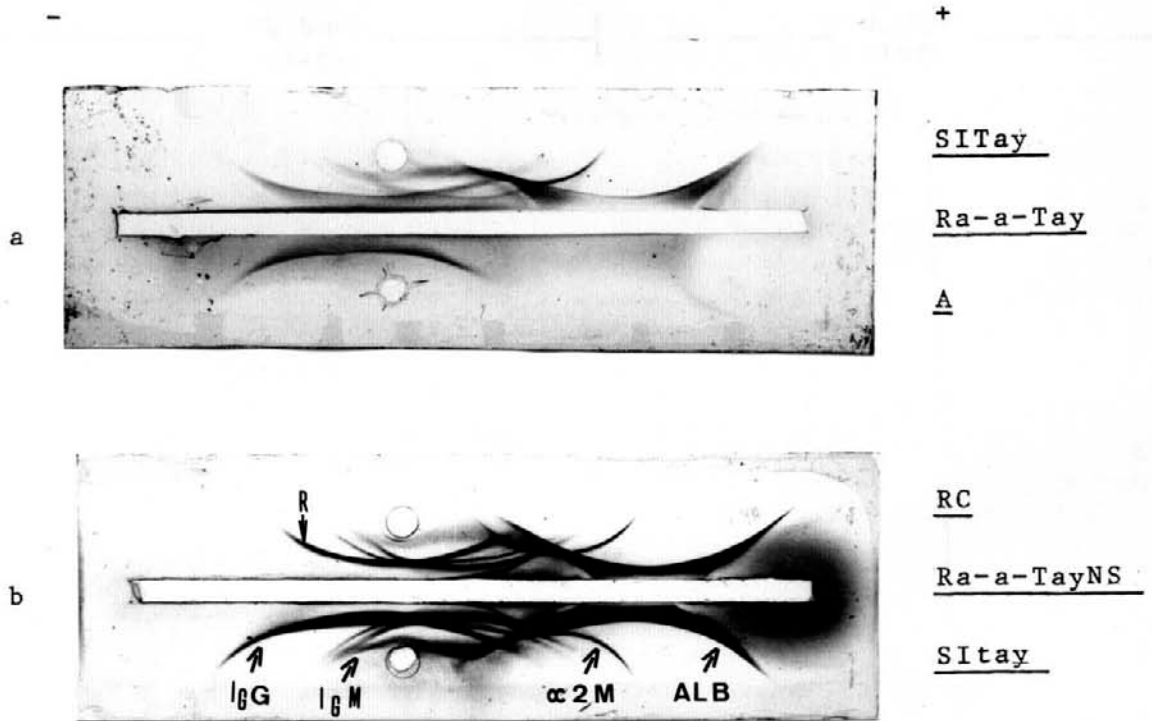
### **III. RESULTADOS**

## 1. Análise imunoeletroforética do soro imune de Tayassu tajacu

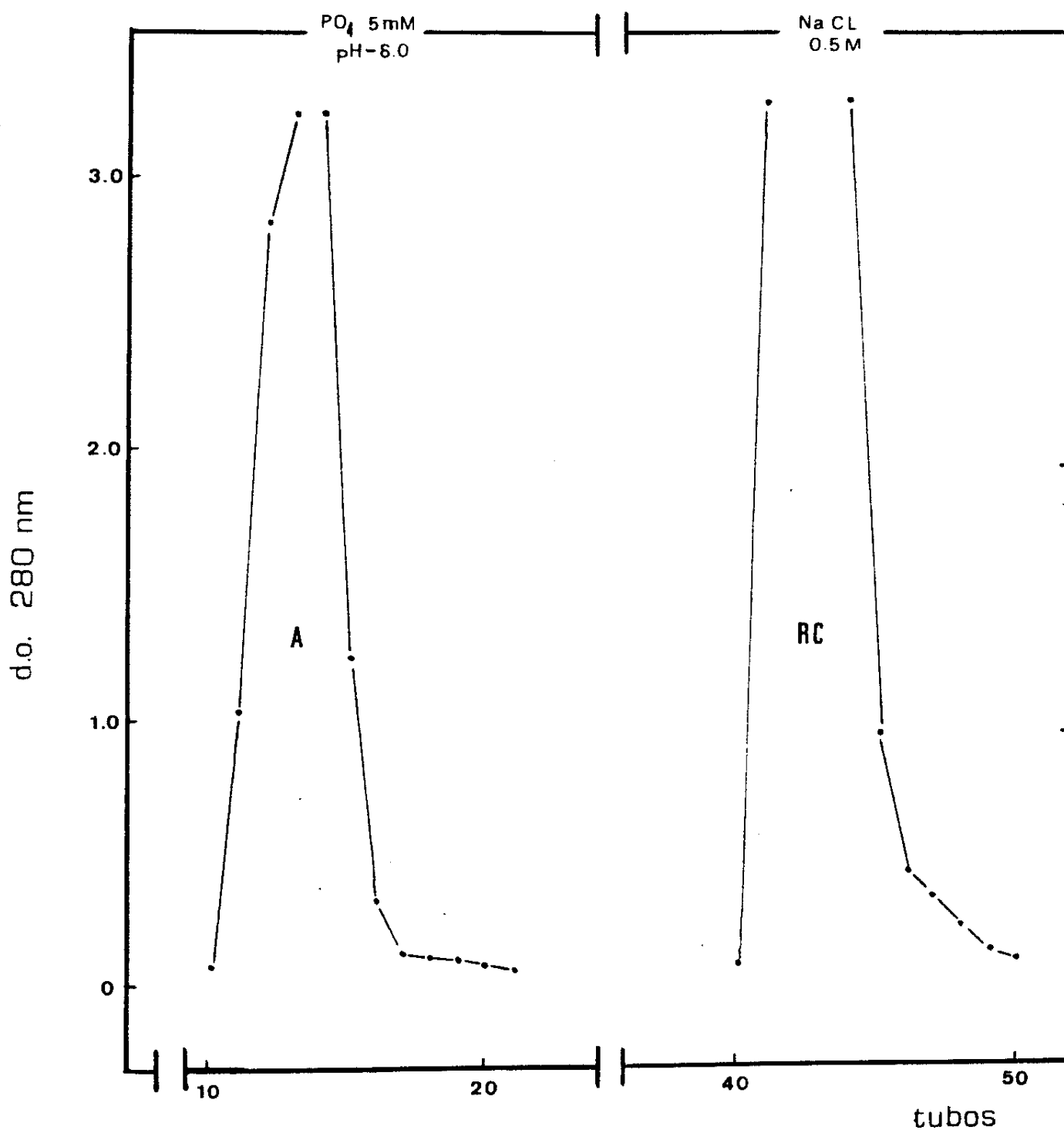
Nos setores a e b da figura 1 o soro imune individual de Tayassu é analisado utilizando-se como revelador soro de coe<sup>l</sup> anti-soro de Tayassu. Este antisoro demonstra a presença de uma proteína de mobilidade catódica típica de imunoglobulina IgG lenta; revela ainda um arco de precipitação junto ao poço de aplicação de mobilidade e posição relativa característica de IgM, e mostra a presença de um nítido arco de precipitação espesso de mobilidade anódica típico de albumina e uma linha de precipitação de mobilidade semelhante à alfa 2 macroglobulina; outros arcos de precipitação de mobilidade eletroforética  $\beta$  também são visualizados como se pode observar nesta figura.

## 2. Purificação e identificação da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu tajacu

A figura 2 mostra a cromatografia de troca iônica da fração pseudoglobulina do soro imune de Tayassu. O pico A é obtido no tampão de equilíbrio da coluna, e a fração RC é eluída em NaCl 0,5 M. A análise imunoeletroforética das frações A e RC obtidas da cromatografia em DEAE celulose do soro imune de Tayassu (SITay) é mostrada na figura 1. Como revelador foi utilizado soro de



**Figura 1** - Controle imunoeletroforético em gel de ágar a 1% em tampão veronal pH 8.6 do soro imune de Tayassu (SITay). Soro de coelho anti-soro de Tayassu (Ra-a-TayNS) colocado na canaleta revela quatro arcos de precipitação nítidos que correspondem às proteínas séricas IgG, IgM,  $\alpha$ 2M e albumina (Alb), como indicado. No setor a, este anti-soro revela na fração eluída com fosfato 5mM um único arco de precipitação IgG de mobilidade lenta (A) em relação ao anodo - revela ainda as proteínas presentes no soro de Tayassu (SITay). No setor b o mesmo anti-soro revela a fração RC obtida em DEAE celulose, não revela a gamaglobulina IgG de mobilidade lenta que está ausente. A fração RC se caracteriza pela presença de uma IgG rápida (R) em relação ao anodo.



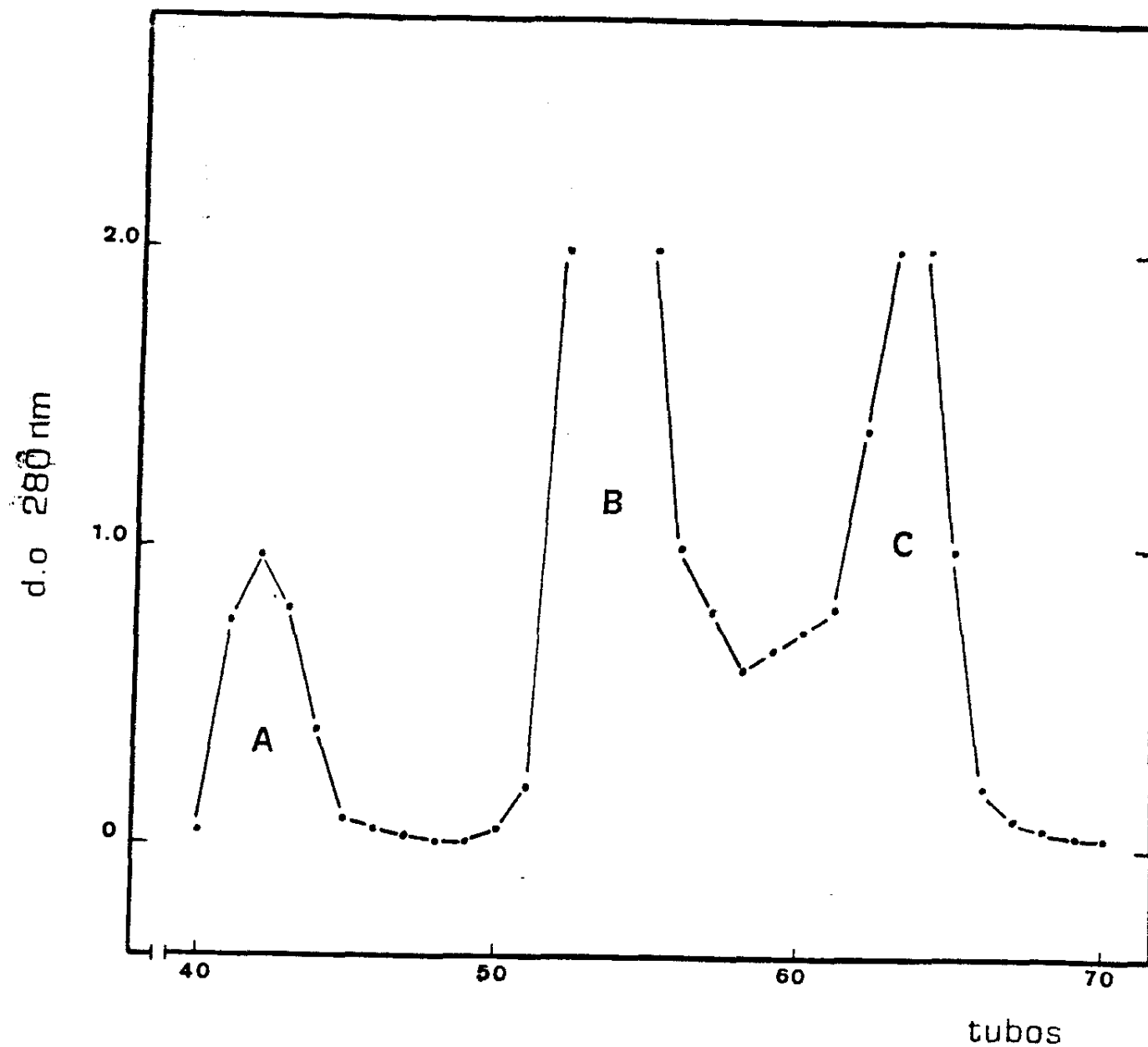
**Figura 2** - Cromatografia de troca iônica da fração pseudoglobulina do soro imune de *Tayassu* em coluna (2.0x50.0 cm) de DEAE celulose equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8.6. O pico A é obtido no tampão de equilíbrio da resina, e a fração RC é eluída em NaCl 0.5 M.

coelho anti-soro de *Tayassu* (Ra-a-TayNS). A fração A mostra um único arco de precipitação, livre de contaminações, e que corresponde a uma IgG lenta. A fração RC mostra um arco de precipitação na região de gamaglobulina correspondente a uma IgG rápida e revela outras proteínas séricas de mobilidade compreendida entre  $\beta$  globulinas e albumina.

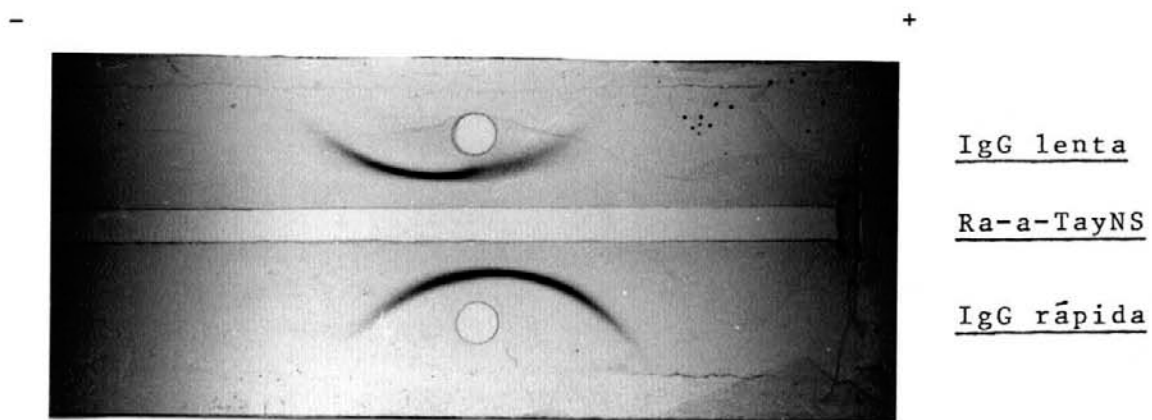
### 3. Purificação e identificação da imunoglobulina IgG rápida de *Tayassu tajacu* (L.)

A cromatografia de exclusão molecular da fração RC, obtida de cromatografia em DEAE celulose é mostrada na figura 3. Foram eluídas três frações correspondentes aos picos A, B e C em tampão fosfato 0,1 M pH 8.6, que é o tampão de equilíbrio da coluna. A fração que corresponde ao pico A é eluída em volume de exclusão característico de IgM. O material eluído no pico C apresenta um volume de eluição típico de albumina. O controle imunoeletroforético da fração B utilizando-se como revelador soro de coelho anti-soro total de *Tayassu* (Ra-a-TayNS) é apresentado na figura 4. Um único arco de precipitação é visualizado. Esta fração mostra mobilidade típica de gamaglobulinas rápidas, uma característica da imunoglobulina IgG1 de cobaia (OLIVEIRA et. al 1970).





**Figura 3** - Cromatografia de exclusão molecular da fração RC, obtida de cromatografia de troca iônica de soro imune de Tayassu, em coluna (2.5x100 cm) de Sephadex G200, equilibrada em tampão fosfato 0.1 M pH 8.0. Foram eluídas as frações correspondentes aos picos A, B e C.



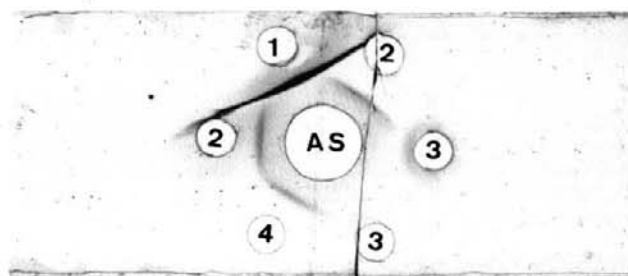
**Figura 4** - Controle imunoeletroforético em gel de ágar 1% em tam<sub>p</sub>ão veronal pH 8.6 da imunoglobulina G lenta e da imunoglobulina G rápida de Tayassu. A população molecular que corresponde às imunoglobulinas G de mobilidade lenta é proveniente de cromatografia de troca iônica em DEAE celulose. As imunoglobulinas G de mobilidade rápida foram obtidas de filtração em gel de Sephadex da fração denominada RC.

**4. Comparação antigênica da imunoglobulina G lenta e da imunoglobulina G rápida de Tayassu tajacu (L.) utilizando-se como revelador anti-soro específico anticadeia gama humana.**

A análise por imunodifusão dupla em gel de ágar é apresentada na figura 5. O soro de cabra anticadeia gama humana utilizada como revelador reagiu com: (1) uma imunoglobulina IgG1 k monoclonal do paciente mielomatoso GOB, (2) a imunoglobulina IgG lenta de Tayassu, (4) a imunoglobulina IgG rápida de Tayassu. A proteína urinária monoclonal de Bence Jones do paciente JJ0 (3) não deu reação positiva com este anti-soro.

**5. Fragmentação enzimática pela papaína, da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu tajacu.**

O controle imunoeletroforético do digesto papaínico total obtido da digestão pela papaína da IgG lenta purificada de soro imune de Tayassu, é mostrada na figura 6. A IgG lenta e o digesto papaínico total foram revelados pelo soro de coelho anti-soro "normal" de Tayassu (Ra-a-TayNS). Os arcos de precipitação do digesto papaínico total evidenciam as duas diferentes frações de que ele é composto. A cromatografia de troca iônica do

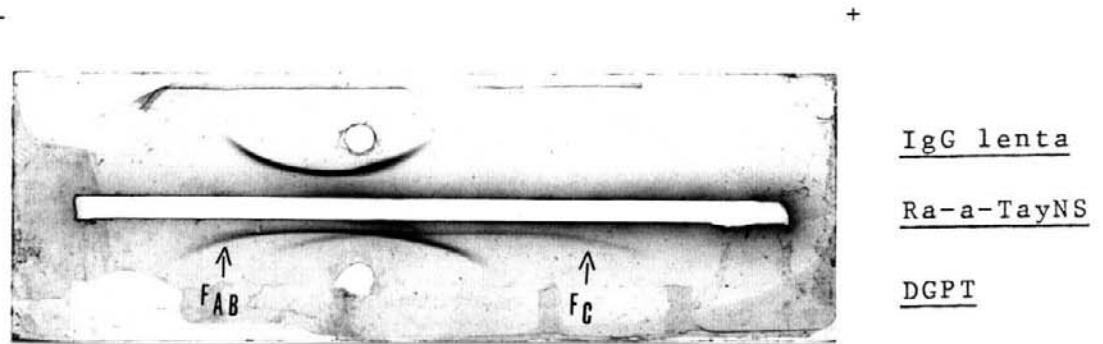


**Figura 5** - Imunodifusão utilizando-se como suporte gel de ágar a 1%. Nos poços: (1) foi aplicado paraproteína M isolada do soro do paciente GOB com mieloma múltiplo; (2) foi aplicada a imunoglobulina IgG lenta de Tayassu, (3) foi aplicada a proteína monoclonal de Bence Jones obtida de urina do paciente JJO, (4) foi aplicada a imunoglobulina IgG rápida de Tayassu. Como revelador foi utilizado soro de cabra anticadeia gama humana (AS). Este anti-soro revelou IgG1 k GOB, IgG lenta e IgG rápida de Tayassu, e não foi capaz de revelar a proteína de Bence Jones que é cadeia leve de imunoglobulina dimerizada.

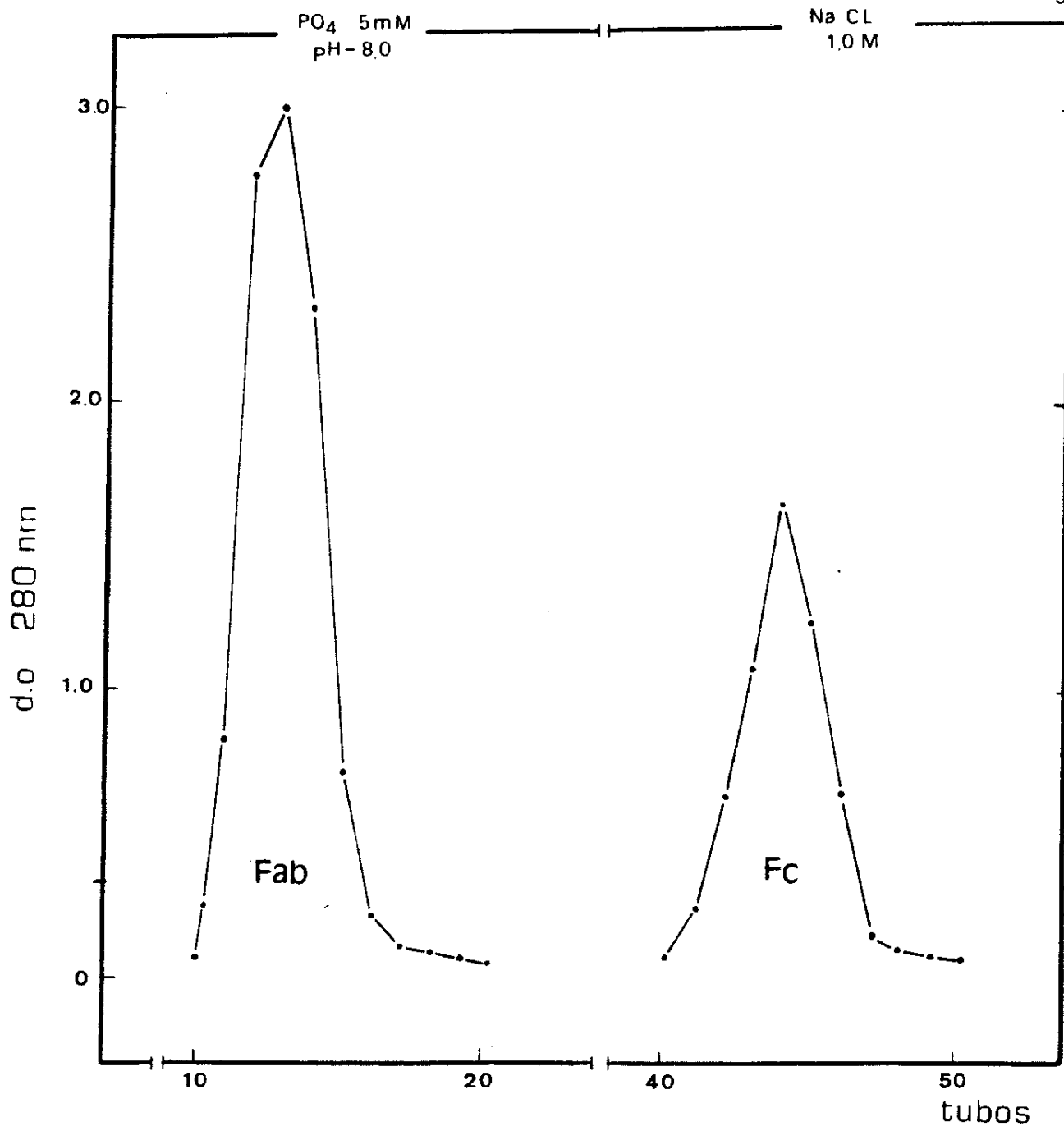
digesto papaínico da IgG lenta de *Tayassu* é mostrada na figura 7. O primeiro pico é obtido no tampão de equilíbrio da resina e corresponde a fração Fab, e, o segundo pico é eluído em NaCl 1,0M e corresponde a fração Fc (PORTER, 1959). A análise por imuno difusão dupla em gel de ágar das frações Fab e Fc obtidas da digestão papaínica de IgG lenta de *Tayassu*, é mostrada nas figuras 8 e 9. O soro de coelho anti soro de *Tayassu* (Ra-a-TayNS) foi capaz de produzir reação de precipitação com as frações Fab e Fc, mostrando relação de não identidade antigênica.(Fig.8). Este anti soro mostra relação de identidade antigênica parcial entre IgG lenta e Fab de *Tayassu*.(Fig. 9).

#### **6. Obtenção de soro antifrimento Fc da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu tajacu**

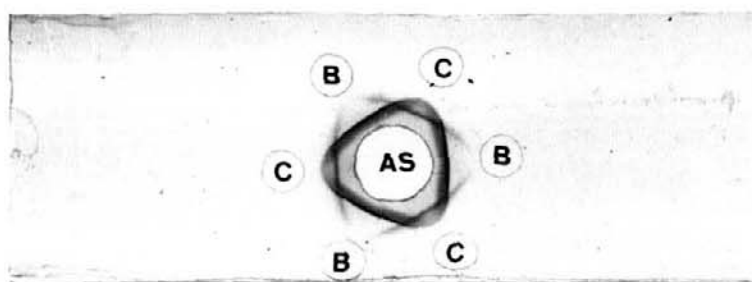
O antisoro obtido da inoculação de coelhos com o fragmento Fc purificado de IgG lenta de *Tayassu* foi testado como mostra a figura 10. Este anti-soro não foi capaz de revelar o fragmento Fab da imunoglobulina IgG lenta de *Tayassu* mas reagiu formando arcos de precipitação nítidos com o fragmento Fc isolado e as imunoglobulinas nativas IgG lenta e IgG rápida.



**Figura 6** - Controle imunoelectroforético em gel de ágar 1% em tampão veronal pH 8.6 da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu e do seu digesto papaínico total. Foi utilizado como revelador soro de coelho anti-soro de Tayassu (Ra-A-TayNS). Os arcos de precipitação provenientes do digesto papaínico (DGPT) evidenciam os componentes de mobilidade característica de Fab e de Fc.

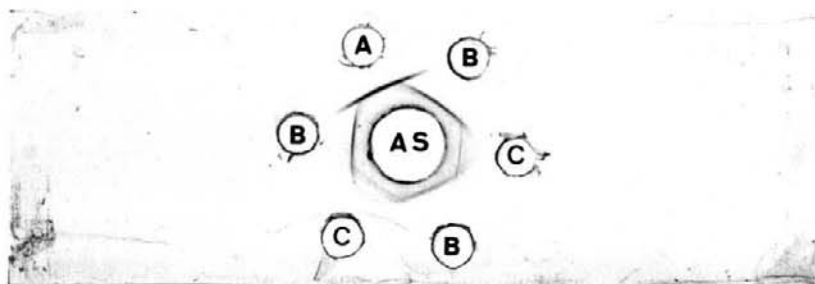


**Figura 7** - Cromatografia de troca iônica do digesto papaínico da imunoglobulina IgG lenta, de *Tayassu* em coluna (1.0x50.0cm) de DEAE celulose, equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8.0. O primeiro pico, correspondente a fração Fab é obtido no tampão de equilíbrio da coluna e, a fração Fc é eluída em NaCl 1.0 M.



**Figura 8** - Imunodifusão dupla em gel de ágar 1% das frações Fab (B) e Fc (C) obtidas da digestão papaínica de IgG lenta de Tayassu. Soro de coelho anti-soro normal de Tayassu colocado no poço central (AS) foi usado como revelador. O anti-soro mostrou relação de não identidade antigênica entre os componentes Fab e Fc.





**Figura 9** - Imunodifusão dupla em gel de ágar 1% das frações IgG lenta (A), fragmento Fab (B) e fragmento Fc (C), reveladas com o soro de coelho anti-soro "normal" de *Tayassu* colocado no poço central (AS). O anti-soro mostra relação de identidade antigênica parcial entre os componentes IgG lenta e Fab, e relação de não identidade entre os componentes Fab e Fc.

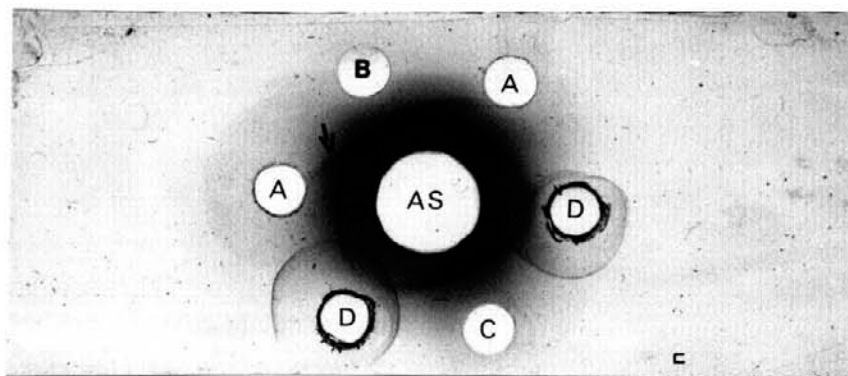
**7. Discriminação entre as populações IgG lenta e IgG rápida do soro imune de Tayassu tajacu utilizando-se soro de coelho anti-fragmento Fc de IgG lenta**

A análise por imunodifusão dupla em gel de ágar das imunoglobulinas IgG lenta, IgG rápida e fragmento Fc de IgG lenta de Tayassu é mostrada na figura 10. O soro obtido de imunização de coelhos com fragmento Fc purificado revelou as imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida; foi detectado um "esporão" entre estas proteínas. Este anti-soro reagiu com o fragmento Fc de IgG lenta mas não com o fragmento Fab.

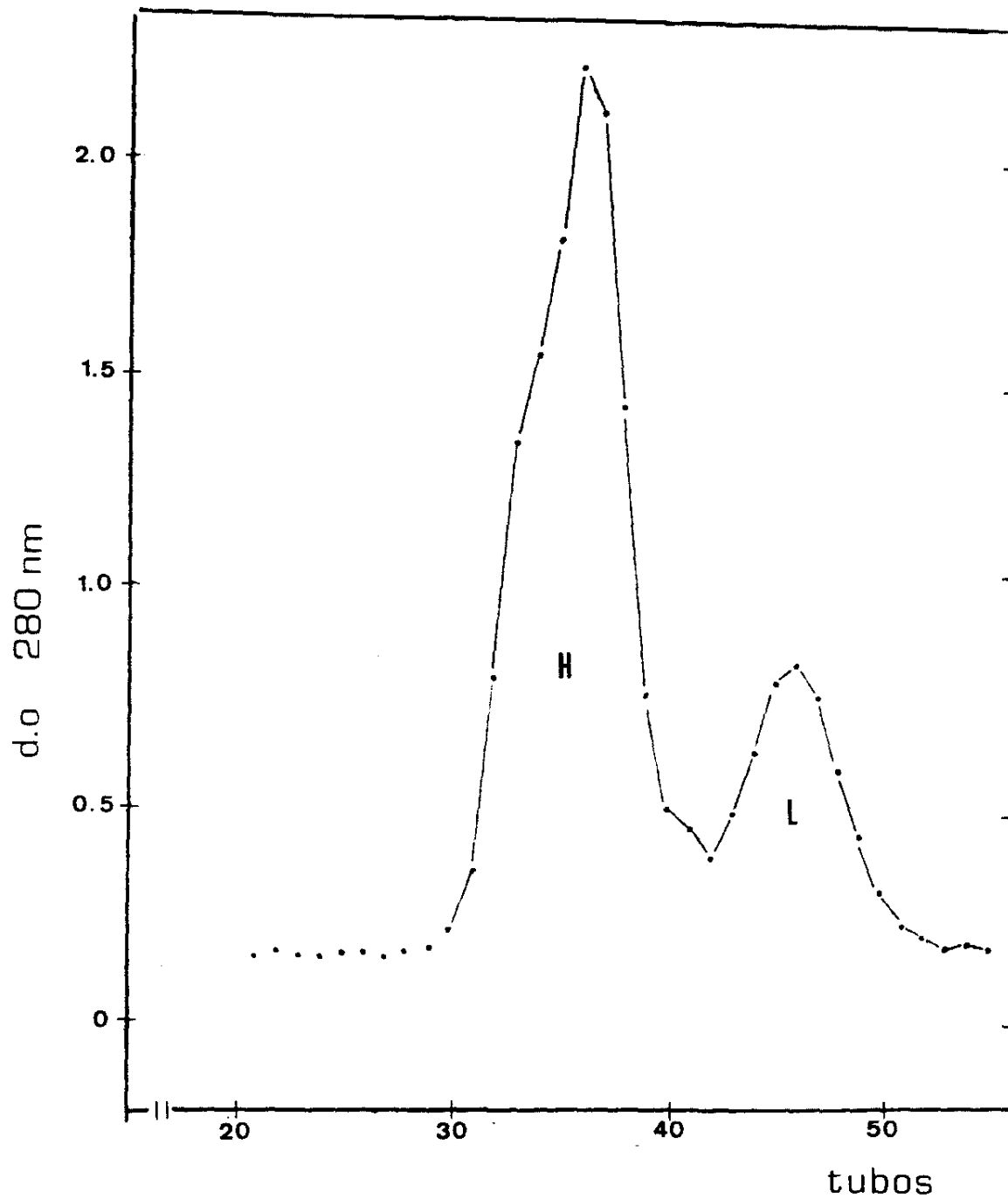
**8. Separação das cadeias H (pesada) e L (leve) da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu tajacu.**

Uma preparação típica, mostrando a separação de cadeias H e L (como descrito em material e métodos), é representada na figura 11.

O centro do primeiro pico de densidade ótica representa as cadeias H e, o outro pico, eluído a seguir, representa a cadeia L.



**Figura 10** - Imunização em gel de ágar 1% das frações IgG rápida (A) e IgG lenta (B), fragmento Fc (C) e fragmento Fab (D) de IgG lenta de *Tayassu*, utilizando-se como revelador soro de coelho antifrimento Fc no poço central (AS). Não foi observada linha de precipitação entre o antisoro e a fração Fab. As frações IgG rápida e IgG lenta mostram entre si relação de identidade antigênica parcial detectada pela presença de um "esporão" entre estas proteínas.



**Figura 11** - Cromatografia de exclusão molecular, da IgG lenta de *Tayassu* reduzida e alquilada, em coluna (2.0 x 120 cm) de Sephadex G 100, entumescida em guanidina 6.0 M pH 5.5. Foram eluídas as frações correspondentes aos picos H e L.

## 9. Composição global de aminoácidos das imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida de soro imune de Tayassu tajacu

Dos registros gráficos das análises de aminoácidos das imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida oxidadas e não oxidadas, obtidas de diferentes tempos de hidrólise, mostrados nas figuras 12 e 13 foi montada a Tabela I. Os valores em termos de moles de resíduo por moles de proteína encontrados para cada aminoácido são apresentados. Para a IgG lenta o número de meias cistinas na forma de ácido cisteico foi de 38 resíduos. Para a IgG rápida este número foi de 39. O número de resíduos metionina detectados como metionina oxidada foi de 18 para a IgG rápida e 16 para a IgG lenta. A IgG rápida apresentou um número total de 1.314 resíduos e a IgG lenta 1.308, não se computando o Triptofano.

A Tabela I mostra os resultados obtidos de análise de aminoácidos das proteínas IgG lenta e rápida de Tayassu em diferentes tempos de hidrólise como indicado nas figuras 12 e 13.

## 10. Cromatografia de afinidade das imunoglobulinas G de Tayassu tajacu em Proteína A - Sepharose

A cromatografia de afinidade do soro imune de Tayassu é

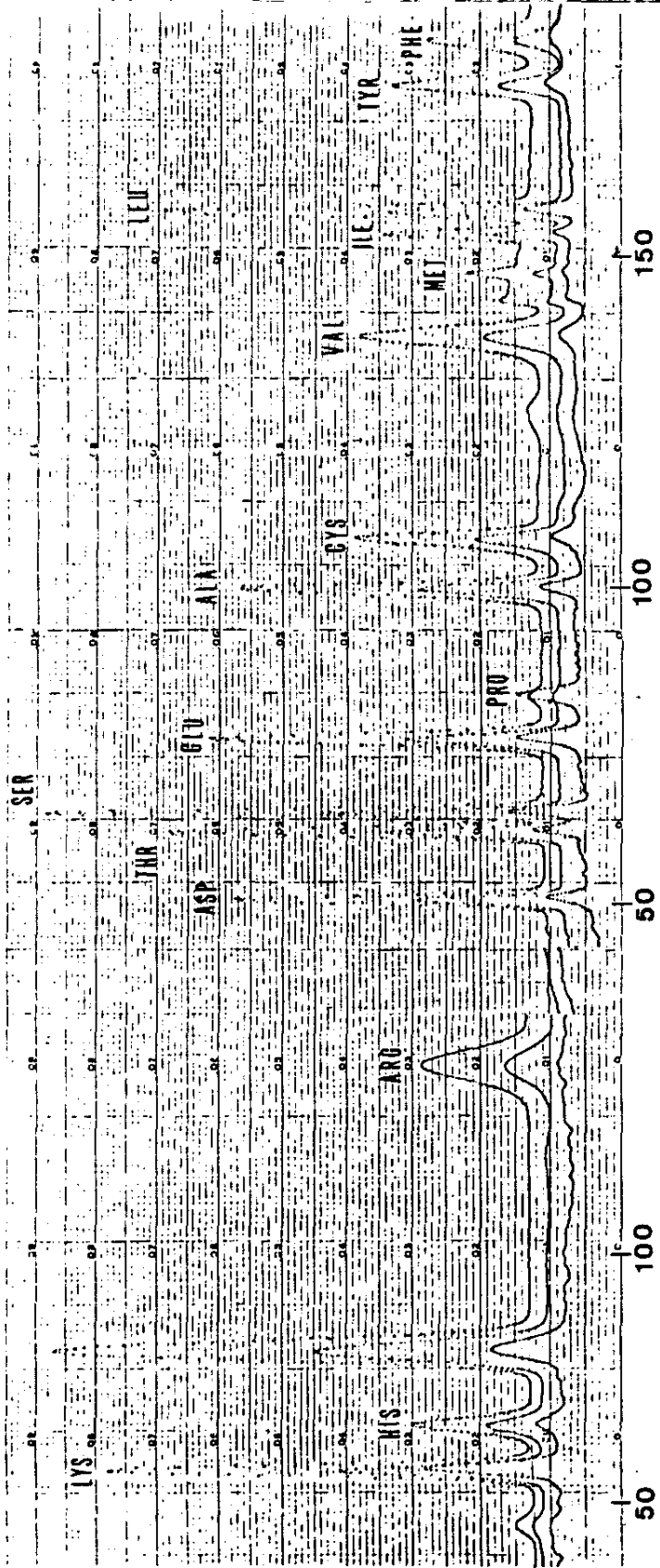


Figura 12 - Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína IgG lenta de

Tayassu tajacu.

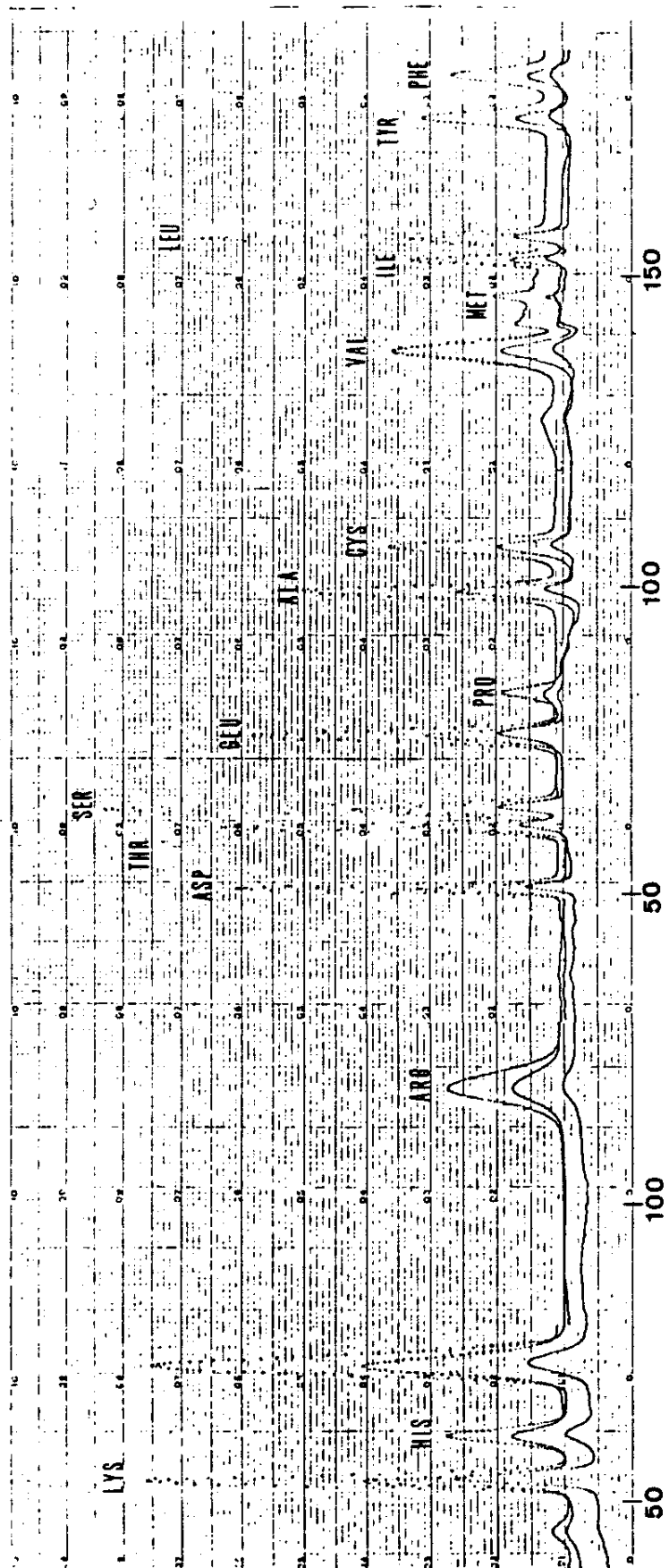


Figura 13- Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína IgG rápida de Tayassu tajacu.

TABELA I

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DE IgG LENTA E IgG RÁPIDA<sup>(1)</sup> DE Tayassu tajacu (L.)

Resíduos	IgG lenta	IgG rápida
Lys	48.7	47.7
His	19.3	20.1
Arg	30.8	33.1
Asp	88.8	95.3
Thr	115.4	109.8
Ser	154.2	150.2
Glu	129.5	130.4
Pro	112.0	111.9
Glis	108.3	111.3
Ala	83.9	84.4
Cys/2 <sup>(2)</sup>	38.4	39.0
Val	122.3	125.5
Met <sup>(3)</sup>	16.2	17.7
Ile	42.2	40.4
Leu	100.7	104.6
Tyr	55.0	55.1
Phe	42.3	44.4
Total <sup>(4)</sup>	1.308	1.314

(1) Moles de resíduo/moles de proteína

(2) Ácido Cisteico (Cya)

(3) Metionina sulfona (Met SO<sub>2</sub>)

(4) O número total de resíduos está normalizado para um mesmo valor.



mostrada na figura 14. O primeiro pico (A) é obtido no tampão de equilíbrio da resina, e o segundo pico (B) é eluído em tampão glicina 0.2 M pH 2.8 0.5 M de NaCl. A cromatografia de afinidade de fração RC da cromatografia de soro imune de Tayassu é mostrada na figura 15. No tampão de equilíbrio da resina foi eluído o pico denominado RCA e o segundo pico (RC B) é eluído em tampão glicina 0.2 M pH 2.8 0.5 M NaCl. O controle imunoeletroforético em gel de ágar dos picos A e B da cromatografia de afinidade do soro imune de Tayassu é mostrado na figura 16. Como revelador foi aplicado nas canaletas soro de coelho anti-soro de Tayassu. (Ra-a-TayNS). O soro normal de Tayassu foi aplicado nos poços indicados com controle. A fração correspondente ao pico A revela vários arcos de precipitação na região mais anódica. Na fração correspondente ao pico B é revelado um único arco de precipitação de mobilidade catódica na região de migração eletroforética de gamaglobulinas séricas. O controle imunoeletroforético em gel de ágar da cromatografia de afinidade da fração RC é mostrado na figura 17. Como controle foi utilizada a fração RC. Nas canaletas foi utilizado soro de coelho anti-soro normal de Tayassu (Ra-a-TayNS). Um único arco de precipitação de mobilidade catódica típico de gamaglobulinas está presente na fração RC B. A fração RC A apresenta um complexo de arcos de precipitação correspondentes às proteínas de migração anódica entre albumina e B globulinas.

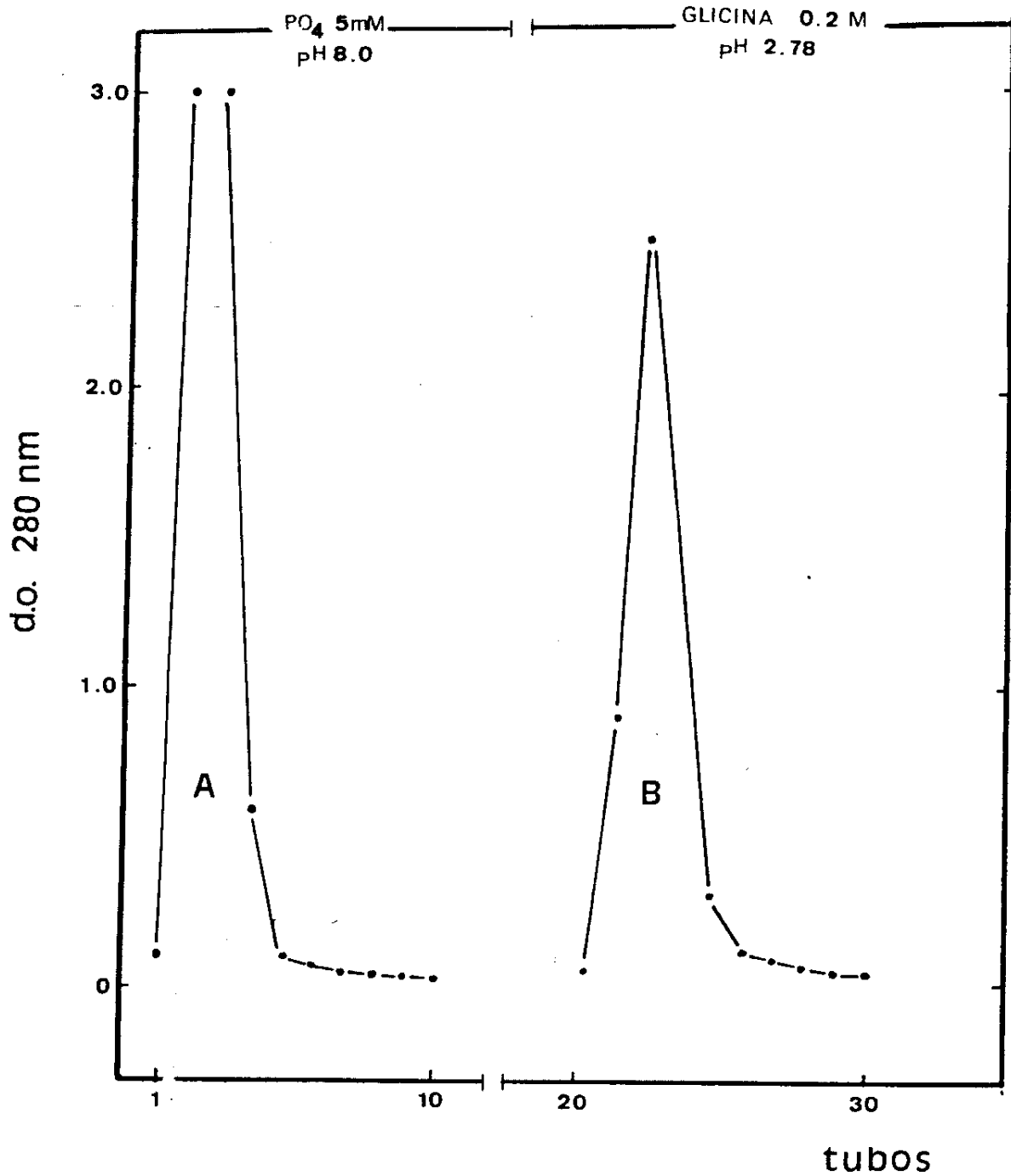
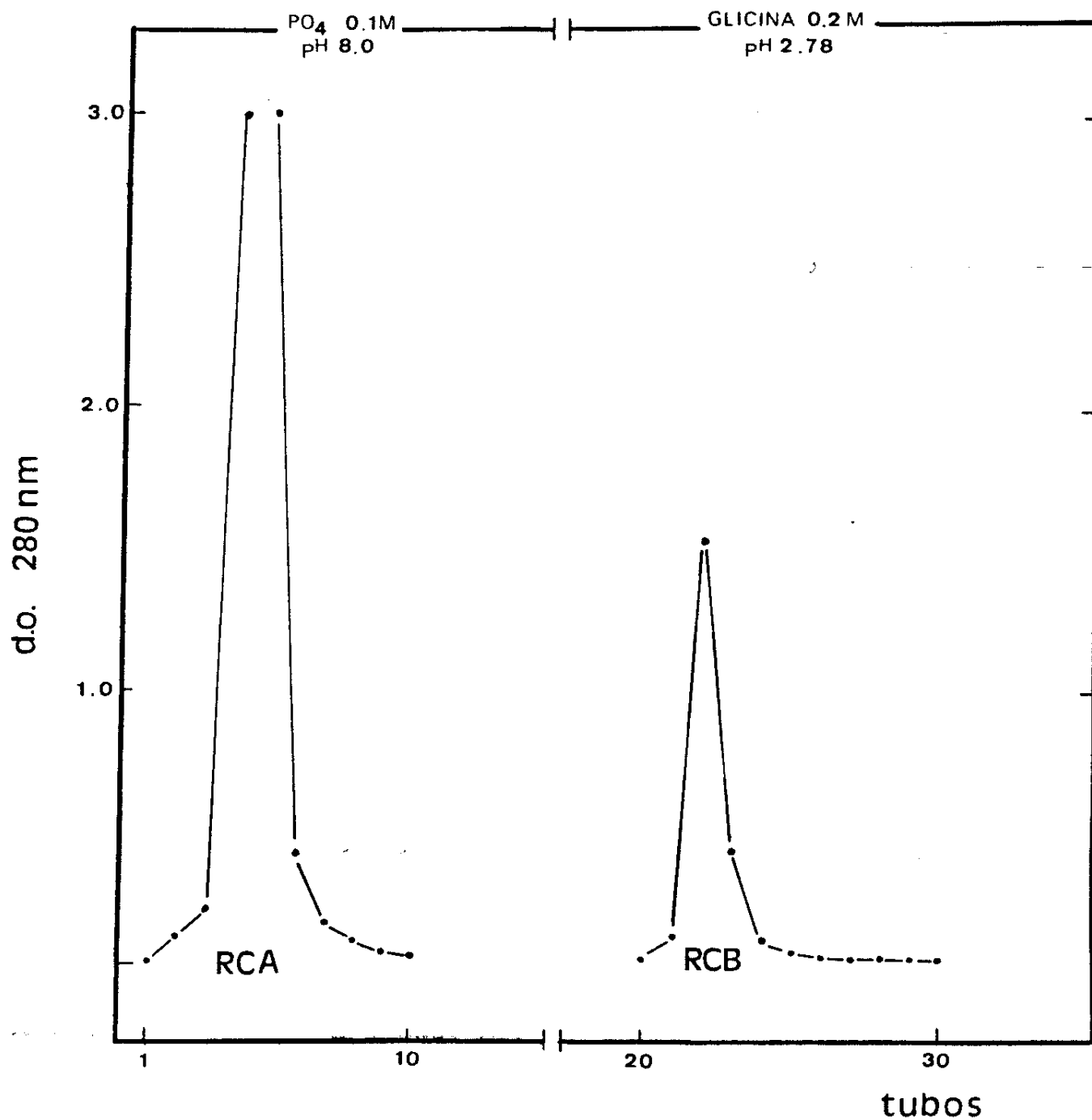
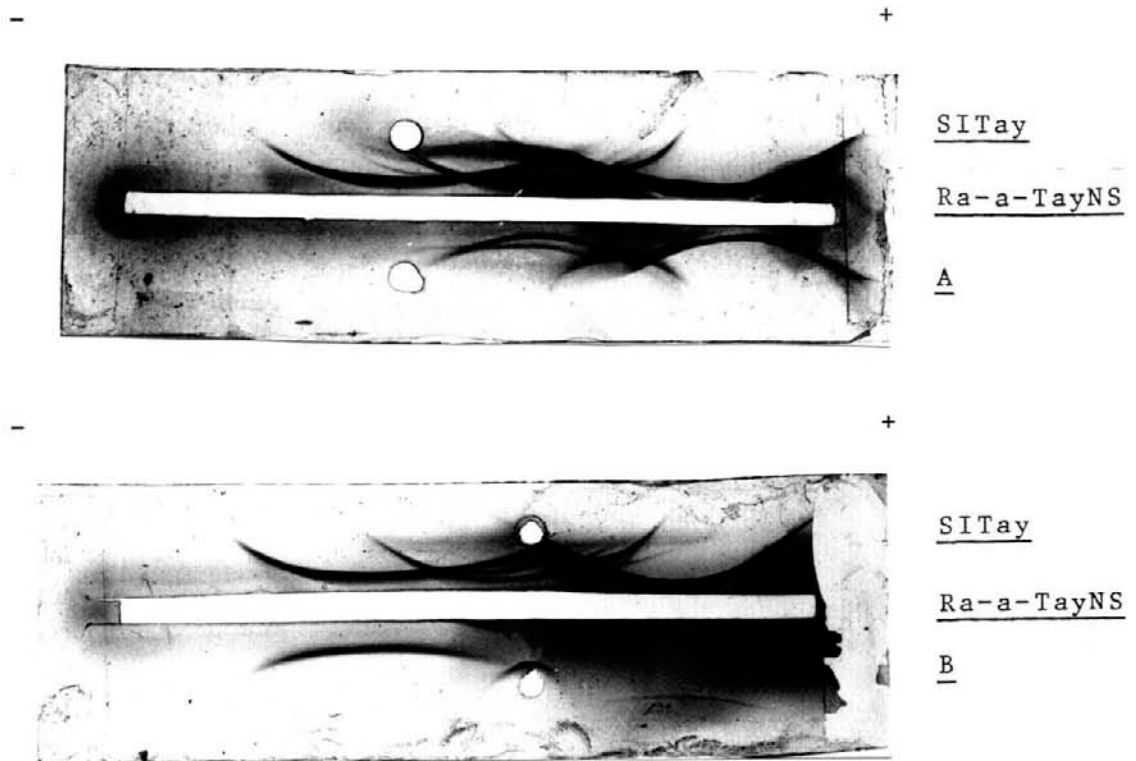


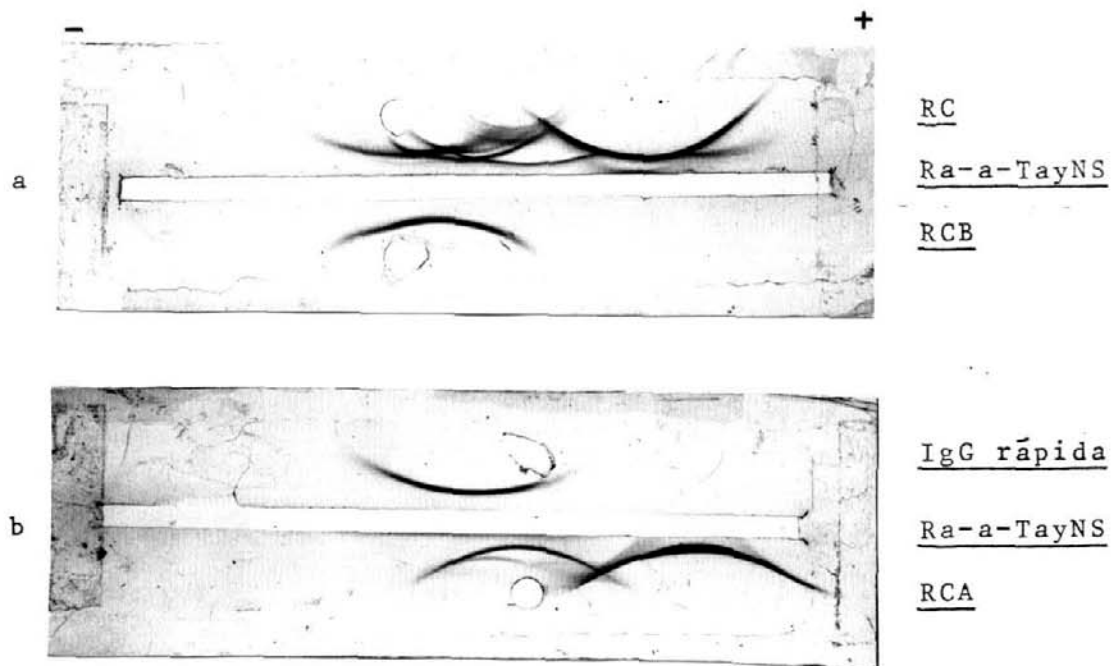
Figura 14 - Cromatografia de afinidade do soro imune de *Tayassu* em coluna (1.2x15cm) de Sepharose-Proteína A, equilibrada em tampão fosfato 0.1M pH 8.0. O primeiro pico é obtido no tampão de equilíbrio da resina e, o segundo pico é eluído em tampão glicina 0.2 M pH 2.8, 0.5 NaCl.



**Figura 15** - Cromatografia de afinidade da fração RC, obtida de cromatografia de troca iônica de soro imune de *Tayassu*, em coluna (1,2x15cm) de Sepharose-Proteína A, equilibrada em tampão fosfato 0,1 M pH 8.0. O primeiro pico (RCA) é obtido no tampão de equilíbrio da resina e, o segundo pico (RCB) é eluído em tampão glicina 0,2 M, pH 2.8, 0.5 M NaCl.



**Figura 16** - Controle imunoeletroforético em gel de ágar 1% em tam<sub>p</sub>ão veronal pH 8.6 das frações correspondentes aos picos AeB da cromatografia de afinidade do soro imune de Tayassu (SITay). O material contido no pico B mostra somente um arco de precipitação de mobilidade catódica correspondente a região das gamaglobulinas G. A fração A obtida da cromatografia de afinidade não mostra a presença nem da imunoglobulina G lenta nem da imunoglobulina G rápida. Como revelador foi utilizado o soro de coelho anti-soro normal de Tayassu (Ra-a-TayNS).



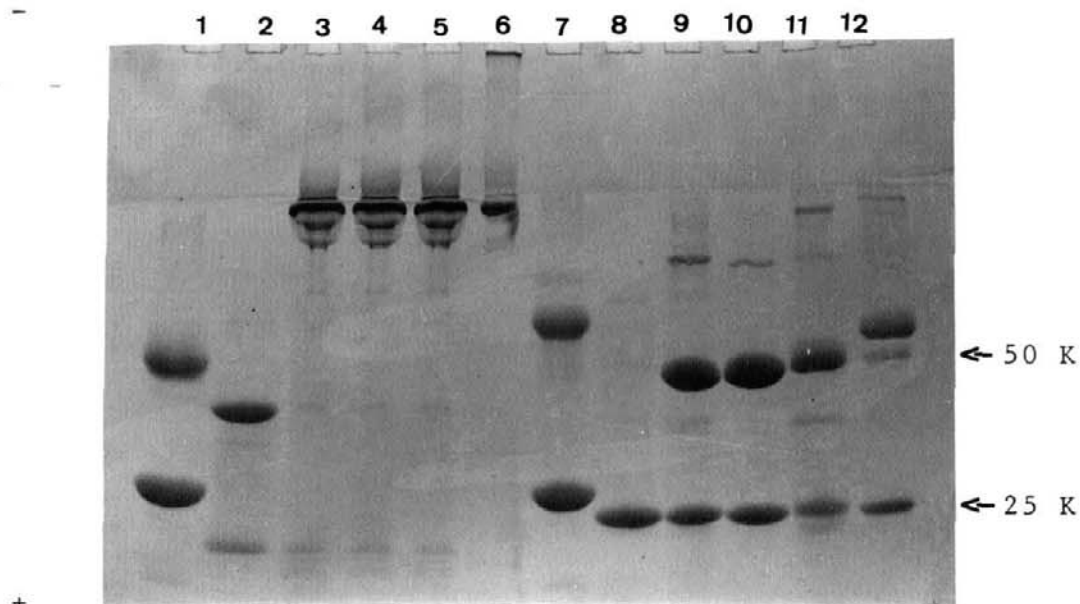
**Figura 17** - Controle imunoeletroforético em gel de ágar 1% em tam-  
 pãõ veronal pH 8.6 das frações correspondentes aos picos RC A e  
 RC B da cromatografia de afinidade da fração RC, obtida de cromatografia em DEAE celulose do soro imune de Tayassu. Como contro-  
 le utiliza-se a fração RC. No setor a o antisoro revela um úni-  
 co arco de precipitação de mobilidade catódica que corresponde  
 às imunoglobulinas G rápidas que estão contidas no pico RCB da  
 cromatografia de afinidade. No setor b o anti-soro revela a fra-  
 ção correspondente ao pico RCA da cromatografia de afinidade on-  
 de não foram detectadas imunoglobulinas G rápidas. Co-  
 mo revelador foi utilizado soro de coelho anti-soro "normal" de  
 Tayassu. (Ra-a-tayNS)

## 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida das imunoglobulinas G de Tayassu tajacu

A análise em gel de acrilamida das formas nativa e reduzida das imunoglobulinas IgG lenta e rápida purificadas de soro imune de Tayassu é apresentada, na figura 18. Foram utilizadas como marcadores de peso molecular a proteína de Bence Jones na forma dimérica, a imunoglobulina GOB monoclonal do isotipo IgG1, a imunoglobulina monoclonal FKW do isotipo IgG3, soro albumina humana (HSA) e anidrase carbônica.

Na forma nativa as imunoglobulinas IgG se apresentam como uma banda principal na interface gel de concentração gel de corrida. Outras bandas de menor intensidade são observadas.

Na forma reduzida as imunoglobulinas tipo IgG apresentam duas bandas. Uma de peso molecular 50 k (50.000 daltons) correspondente à cadeia pesada H e outra de peso molecular 25 K (25.000 daltons) correspondente à cadeia leve L.



**Figura 18** - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS das imunoglobulinas G do soro imune de Tayassu tajacu antes e depois de redução com DTT 0.1 M. As proteínas não reduzidas foram aplicadas: em (1) soro albumina humana (HSA) e anidrase carbônica (AC), em (2) a proteína de Bence Jones do paciente mielomatoso JJO, em (3) foi aplicada a imunoglobulina monoclonal GOB isotipo IgG1, em (4) a imunoglobulina G rápida de Tayassu, em (5) a imunoglobulina G lenta de Tayassu, em (6) a imunoglobulina monoclonal FKW do isotipo IgG3. Estas mesmas proteínas após redução com DTT foram aplicadas em (7), (8), (9), (10), (11) e (12) na mesma ordem. As cadeias pesadas (H) que correspondem a 50K e as cadeias leves (L) que correspondem a 25K são evidenciadas após redução com DTT. A cadeia pesada da proteína FKW do tipo antígeno IgG3 tem peso molecular maior que 50 K e se destaca das outras bandas H. Após redução a proteína de Bence Jones JJO agora na forma de monômero, migra como única banda correspondente às cadeias leves de imunoglobulinas.

#### IV - DISCUSSÃO



Os resultados de imunoeletroforese do soro total do peca  
ri Tayassu tajacu (L.) põem em evidência um sistema precipitante  
de migração lenta em relação ao anodo que pode ser interpretado  
como um complexo molecular IgG como apresentado na figura 1. A  
forma do arco de precipitação correspondente às imunoglobulinas  
G revela ainda a heterogeneidade desse sistema. O soro de coe  
lho anti-soro "normal" de Tayassu não foi capaz de definir sub  
populações de IgG no soro "normal" e mesmo nos soros hiperimunes  
individuais analisados. Seria de se esperar a evidência de popu  
lações moleculares predominantes de acordo com o sistema de imu  
noeletroforese empregado, como se observa em vertebrados como a  
cobaia (BENACERRAF et al., 1963; OLIVEIRA et al., 1970), camun  
dongo (FAHEY et al., 1964), bovinos (MURPHY et al., 1965 e suí  
nos (KIM et al., 1966). Entretanto os resultados obtidos demonstr  
am no arco que corresponde às imunoglobulinas G nenhum sinal de  
"esporão" que pudesse indicar subpopulações dessa imunoglobuli  
na. Estariam estes resultados indicando que este animal não tem  
a capacidade de biossíntese de diferentes isotipos de cadeia pe  
sada gama? Ou, o desdobramento de populações G seria uma conse  
quência do esquema de imunização empregado? Os resultados da  
análise imunoeletroforética de anti-soros obtidos de diferentes  
esquemas de imunização utilizando-se antígenos diversos como so  
ro albumina humana (HSA), gamaglobulina bovina dinitrofenilada  
(DNP-BGG), soro albumina humana dinitrofenilada (DNP-HSA) e hemo  
cianina, mostraram coerentemente um único arco homogêneo sem es

porões na região de migração de IgG, resultados indicativos de que a heterogeneidade molecular IgG de *Tayassu* não deve ser interpretada em termos de subclasse.

A cromatografia de troca iônica em DEAE celulose do soro "normal" de *Tayassu* e diferentes antisoros obtidos da imunização com antígenos de características diversas mostrou consistentemente o desdobramento do complexo IgG de *Tayassu* em pelo menos duas entidades distintas: uma população de IgG lenta que mostra um único arco de precipitação de mobilidade idêntica à IgG2 de cobaia (OLIVEIRA et al., 1970) e outra população de IgG presente na fração RC que mostra migração rápida característica da subclasse IgG1 descrita na cobaia (BENACERRAF et al., 1963), hamster (COE, 1968), camundongo (FAHEY et al., 1964), suínos (KIM et al., 1966) e bovinos (MURPHY et al., 1965). O controle imunoeletroforético (figura 4) das frações obtidas de cromatografia de exclusão molecular de soro total, pseudoglobulina e fração RC indica que as populações moleculares denominadas A e IgG RC podem ser interpretadas como imunoglobulinas G face sua migração eletroforética característica e sua eluição em volume idêntico àquele do marcador de peso molecular IgG. Essas subpopulações de IgG de *Tayassu* guardam relação de semelhança às imunoglobulinas 7S de cobaia como indicado na tabela III.

Os resultados da imunodifusão dupla em duas dimensões (OUTCHERLONY, 1953) das populações IgG lenta e IgG rápida de *Tayassu* (figura 5)

reveladas com o soro específico anticadeia gama humana em que mostram identidade antigênica entre si e identidade parcial com a proteína GOB monoclonal humana constituem mais uma evidência experimental de que essas proteínas são parte integrante da super família ou classe IgG de vertebrados (AMBROSIUS, 1966). A especificidade deste soro é inequivocamente demonstrada pela ausência de reação com a proteína de Bence Jones monoclonal (JJ0) que é dímero de cadeia leve do tipo antigênico lambda pertencente ao subgrupo  $V\lambda 3$  (MARQUES et al., 1984a; 1984b; 1987a, 1987b).

Antígenos de configuração molecular diferente poderiam produzir no pecari brasileiro padrões de resposta distintos? Os resultados obtidos do controle eletroforético de diferentes esquemas de imunização com antígenos de configuração molecular distinta mostram em certos animais um teor maior de anticorpos IgG de mobilidade mais rápida. Poderia a "forma" do antígeno estimular seletivamente as células imunocompetentes na indução preferencial de anticorpos de uma determinada subclasse? Nossos resultados demonstram que essas questões permanecem críticas.

A digestão pela papaína das imunoglobulinas de vários vertebrados como o coelho (PORTER, 1959), cobaia (NUSSENSWEIG and BENACERRAF, 1964), hamster (COE, 1968), produz fragmentos que podem ser separados por cromatografia de troca iônica e que retêm muitas das propriedades funcionais das moléculas parentais e contribuem para a compreensão da estrutura dessas globulinas.

Os resultados de digestão papaínica como apresentado na figura 7 indicam que as imunoglobulinas G de *Tayassu* devem guardar relação de semelhança estrutural com as demais imunoglobulinas de vertebrados. Os resultados propiciados pelo antisoro antifragmento Fc de imunoglobulina G de *Tayassu* mais os resultados obtidos de determinação do coeficiente de sedimentação da molécula nativa (POSKUS, DELACHE e PALADINI, resultados não publicados) somados aos resultados da especificidade frente a diferentes antígenos (LOVO, NOVELLO, MARANGONI, OLIVEIRA, resultados não publicados), permitem caracterizar as populações de imunoglobulinas IgG lenta e rápida de *Tayassu* como anticorpos IgG.

Os resultados apresentados não permitem a identificação e caracterização química e antigênica dos domínios CH2 e CH3 constituintes dos fragmentos tipo 1Fc, mFc, sFc estFc como demonstrado para a IgG de coelho (UTSUMI, 1969). Desta forma nossos resultados não conduzem à possibilidade de obtenção de anti-soros específicos para os domínios CH2 e CH3 do fragmento molecular Fc. Dependendo da concentração da enzima e do tempo de digestão é observado além dos arcos de precipitação característicos de Fab e Fc um outro componente de mobilidade anódica que pode ser interpretado como o fragmento Fc' ou pFc' como demonstrado em cobaia (LESLIE et al., 1971) e que corresponde ao domínio CH3 dimerizado (UTSUMI, 1969).

As composições de aminoácidos de IgGs lenta e rápida de *Tayassu* (apresentadas nas figuras 12 e 13) refletem as diferenças

de mobilidade eletroforética em moléculas nativas, já estabelecido para a IgG2 de cobaia (LAMM, 1969).

Os resultados de análise de aminoácidos da molécula nativa de IgG lenta de *Tayassu* sugerem um número aproximado de cinco meias cistinas inter cadeia H como estabelecido para IgG2 de cobaia (OLIVEIRA e LAMM, 1971), partindo do princípio de que a cadeia H deve ser constituída de quatro domínios (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>1</sub> e VH) estabilizados por uma ponte dissulfeto e as cadeias leves sejam constituídas de dois domínios (VL e CL) também "estabilizados" por duas meias cistinas cada.

Os resultados da separação das cadeias H-L de IgG lenta de pecari mostram uma nítida separação dos dois tipos de cadeia polipeptídica H e L, apresentada na figura 11. A separação das cadeias polipeptídicas da imunoglobulina G lenta de *Tayassu* através de agentes redutores constitui uma evidência concreta do arranjo molecular típico de IgG, considerando-se que a recuperação das cadeias H e L foi de praticamente 100%, ou seja, aproximadamente 70% no pico H e 30% no pico L. A redução da proteína com DTT permite atacar as pontes inter-cadeias, mas não as pontes intra-cadeia, o que faz com que a estrutura das cadeias H e L seja preservada, a alquilação com iodoacetamida ou ácido iodoacético evita a reoxidação dos grupamentos SH, o que foi de fundamental importância para o êxito desses resultados.

A Proteína A de *Staphylococcus aureus* é capaz de ligar IgG de muitas espécies como mostra a tabela II, e tem sido extensivamente usada após acoplamento com a Sepharose para isola

TABELA II

AFINIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS DE VERTEBRADOS PELA PROTEÍNA A.

Espécimes	Classe de imunoglobulina	Subclasses
Homem	IgG	1,2,4 (1)
	IgA	2 (2)
Camundongo	IgM	- (3)
	IgG	2A,2B,3 (3)
		1 (4)
Rato	IgG	1,2C (5)
Cobaia	IgG	1,2 (6)
Coelho	IgG	- (7)
Carneiro	IgG	2 (8)
Cabra	IgG	2 (8)
Cão	IgG	A,B,C,D (8)
	IgA	- (8)
	IgM	- (8)
Boi	IgG	2 (8)
Pecari	IgG	lenta rápida (9)

(1) KRONVAL , WILLIAMS, 1969

(2) GROV, 1976.

(3) KRONVALL et al., 1970.

(4) MACKENZIE et al.

(5) MEDGYESY et al., 1978.

(6) FORSGREN, 1968.

(7) ENDRESEN, 1978.

(8) GOUDSWAARD et al., 1978.

(9) LOVO et al., Resultados não publicados.

mento de classes e subclasses de imunoglobulinas (DUHAMEL et al. 1979).

Em algumas espécies a interação da proteína A com IgG é restrita a certos subgrupos de IgG. Por exemplo, no homem a proteína A interage com IgG dos subgrupos 1, 2 e 4 mas aparentemente não com IgG3 (KRONVALL, e WILLIAMS, 1969).

Reações de precipitina direta foram detectadas entre a proteína A e soros humanos normais. Inicialmente foi aceito que essas reações representavam anticorpos naturais humanos anti-staphylococcus (LOFKVIST e SJOQUIST, 1962). Entretanto, estudos subsequentes têm indicado que a proteína A reage com estruturas Fc de cadeia pesada de IgG (FORSGREN AND SJOQUIST, 1966, SJOQUIST et al, 1968). O uso da reação entre proteína A de Staphylococcus e a porção Fc de gamaglobulinas pode ser útil para estudos de importantes funções biológicas relacionadas com o fragmento Fc, tais como desencadeamento de reações de hipersensibilidade e interação com o sistema complemento (SIRAGANIAN e OLIVEIRA, 1968; SANDBERG et al., 1971).

O fato da proteína A reagir com todas as proteínas de mieloma de cadeia pesada dos subgrupos IgG1, IgG2 e IgG4 é indicativo que as estruturas responsáveis pela reatividade realmente estão relacionadas com a seqüência primária de aminoácidos como sugerido pela reatividade não usual com o fragmento Fc. Um mesmo sítio de reação com a proteína A tem sido demonstrado em gamaglobulinas de cobaia e coelho (SJOQUIST, 1968). A proteína A de

ve então servir como marcador para uma particular seqüência de aminoácidos de gamaglobulina ou para estudos filogenéticos (KRONVALL, 1970).

As imunoglobulinas G lenta e rápida de *Tayassu* ligaram-se a proteína A Sepharose como demonstraram as figuras 14, 15, 16 e 17. Esses resultados entretanto, não constituem evidência de que devem existir no *Tayassu* pelo menos duas subclasses de IgG. Poderia este resultado indicar que os fragmentos de IgG lenta e IgG rápida tem estrutura semelhante? O comportamento de Fc de IgG lenta e rápida de *Tayassu* face à proteína A não responde de modo inequívoco esta pergunta. Outros subsídios derivados de outros tipos de modelo experimental terão que ser obtidos.

A eletroforese em gel de poliacrilamida, técnica de PAGE-SDS (figura 18), mostrou uma única banda das imunoglobulinas lenta e rápida de *Tayassu*. Este critério serviu para justificar a determinação da composição global de aminoácidos destas proteínas e é utilizado como indicativo de grau de pureza, o que é compatível com estudos de determinação de estrutura primária de proteínas homogêneas e/ou seus fragmentos (GARCIA-PARDO et al 1981).

Ambas imunoglobulinas, lenta e rápida, de *Tayassu* após redução com DTT apresentaram cadeias pesadas (H) semelhantes a do marcador que é a imunoglobulina monoclonal GOB do isotipo IgG1, e cadeias leve (L) semelhantes a da imunoglobulina monoclonal GOB e à proteína de Bence Jones que se apresenta na forma de monômero após redução.



A imunoglobulina monoclonal FKW do isotipo IgG3 também serve como um bom marcador de cadeia pesada por apresentar uma cadeia mais longa (PM 170.000) que as demais cadeias H das imunoglobulinas G humanas (SALUK and CLEM, 1971).

Neste trabalho, utilizando-se como modelo o peçari, Tayassu tajacu, evidenciamos a heterogeneidade das imunoglobulinas G deste artiodáctilo. Gamaglobulinas de Tayassu foram resolvidas em duas frações por cromatografia de troca iônica e verificou-se que essas imunoglobulinas são imunoeletroforeticamente distinguíveis, sendo uma mais lenta e outra mais rápida, de acordo com subcategorias de IgG de outras espécies como IgG1 e IgG2 de cobaia, hamster e camundongo (BENACERRAF et al., 1968; COE, 1968; FAHEY et al., 1964). As observações descritas aqui sugerem duas formas isotípicas para a IgG de Tayassu, visto que as variantes apresentadas entre a IgG lenta e a IgG rápida de Tayassu são comuns a todos os indivíduos normais de uma dada espécie. Pelos resultados obtidos não foi possível detectar variantes alotípicas, onde pequenas diferenças antigênicas são segregadas alelicamente e não estão presentes em todos os indivíduos de uma dada espécie, como reflexo de pequenas diferenças entre genes alélicos. Assim dentro de uma mesma subclasse é possível detectar estes marcadores alotípicos, como os marcadores Gm de cadeia pesada de imunoglobulinas humanas (NATVIG and KUNKEL, 1973).

Os dados apresentados neste trabalho indicam di-

ferenças imunoquímicas entre as IgGs lenta e rápida de *Tayassu*. Essas diferenças são relacionadas com o fragmento Fab, de acordo com os resultados obtidos por SELA et al., 1963, onde duas populações de IgG de coelho, por digestão pela papaína, liberaram fragmentos Fab tipo II e tipo I relacionados com a mobilidade eletroforética da molécula nativa (nomenclatura I,  $\square\square$ , I ou  $\square$ ,  $\square\square$ ,  $\square$  adotada nos estudos de PORTER, 1959, para os fragmentos Fab e Fc) e foram interpretados como populações moleculares que diferiram entre si nos respectivos fragmentos Fab.

No porco doméstico, animal artiodáctilo, de evolução paralela a dos *Tayassuidae*, foram descritas pelo menos três populações moleculares interpretadas como IgG1, IgG2 e IgG3 (KALTREIDER, e JOHNSON, 1972).

A Tabela III permite a comparação entre as classes e subclasses de imunoglobulina G de vários vertebrados, incluindo o modelo IgG de *T. tajacu*.

As proteínas homólogas, aquelas que executam a mesma função biológica em espécies diferentes, geralmente têm cadeias polipeptídicas idênticas, ou quase idênticas, em tamanho. Muitas posições na seqüência de aminoácidos de proteínas homólogas são ocupadas pelo mesmo aminoácido em todas as espécies, mas em outras posições pode haver uma variação considerável de uma para outra espécie. Este conjunto de semelhanças na seqüência de aminoácidos de proteínas homólogas é chamado de homologia seqüencial; ela sugere que as espécies portadoras de tais proteínas ho

mólogos devem ter uma origem evolutiva comum. Assim, as seqüências de proteínas homólogas indicam que os organismos onde são encontradas evoluíram de um ancestral comum, mas sofreram modificações à medida que as diferentes espécies divergiram durante a evolução. Os resultados sobre a especificidade de anticorpos para antígenos de espécies homólogas levam a conclusões desta natureza. O conhecimento do número de resíduos diferentes entre proteínas homólogas de espécies diferentes permite a construção de mapas evolutivos mostrando a origem e o desenvolvimento de diferentes plantas e animais durante a evolução das espécies.

Este trabalho contribui para a identificação e caracterização da classe de imunoglobulina IgG no Tayassu tajacu, cuja família, Tayassuidae, apresenta linha evolutiva independente da família Suidae desde o Oligoceno (ROMER, 1966). Esta proteína representa um ponto nodal ancestral fornecendo um modelo experimental cuja determinação de sua seqüência de aminoácidos da estrutura primária possibilitará a comparação com a de outras espécies de artiodáctilos fornecendo dados de homologia seqüencial para o enriquecimento do quadro de evolução filogenética de imunoglobulinas.

TABELA III

Espécies	Classes e Subclasses	Mobilidade eletroforética em relação ao anodo	Peso Molecular	Coefficiente de Sedimentação	Composição global de aa
Tayassu t.	IgG rápida IgG lenta	rápida lenta	150.000(4) 150.000	7S (6) 7S	(7)
Porco	IgG1 IgG2 IgG3(1)	lenta rápida rápida(1)	170.000(10)	7S (10)	(11)
Cobaia	IgG1 IgG2	rápida (2) lenta	165.000(5) 161.000	7S (5) 7S	(8)
Homem	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	lenta (3) lenta lenta lenta	140.000(3)	7S (3) 7S 7S 7S	(9)
Coelho	IgG	-	150.000(9)	7S (9)	(9)

- (1) KALTREIDER and JOHNSON, 1972.  
 (2) BENACERRAF et al. (1963)  
 (3) COHEN e MILSTEIN (1967); ISHIZAKA et al. (1967)  
 (4) Determinado segundo filtração em gel G 150 do marcador utilizado.  
 (5) LESLIE e COHEN (1970).  
 (6) Valores determinados por POSKUS, E.; BELACHA, J.M. e PALADINI, A. (Resultados não publicados), no Depto. de Química Biol. da U. Buenos Aires.  
 (7) Vide Tabela I.  
 (8) LAMM, M.E., 1969; LESLIE e COHEN (1970).  
 (9) CRUMPTON & WILKINSON, 1963.  
 (10) SETCAVAGE and KIM, 1976.  
 (11) METZGER et al., 1971.

## V - RESUMO E CONCLUSÕES

## RESUMO E CONCLUSÕES

A análise imunoeletroforética do soro imune de Tayassu, utilizando-se como revelador o soro de coelho antisoro de Tayassu, revelou uma fração protéica de mobilidade eletroforética menos anódica característica de imunoglobulinas do isotipo IgG.

Do soro imune deste animal, foi purificada, por cromatografia de troca iônica em DEAE celulose, uma fração protéica que por análise imunoeletroforética apresentou mobilidade eletroforética lenta em relação ao anodo. Da fração restante, denominada RC, foi purificada a fração protéica, por cromatografia de exclusão molecular, que apresentou volume de eluição típico de imunoglobulinas IgG. A análise imunoeletroforética demonstrou que a fração obtida por purificação do RC, possui mobilidade eletroforética rápida em relação ao anodo.

Por imunodifusão, as frações protéicas denominadas IgG lenta e IgG rápida de Tayassu apresentaram relação de identidade parcial com a IgG monoclonal GOB quando reveladas com o soro específico anticadeia gama humana, evidenciando que estas proteínas são parte integrante da classe IgG de vertebrados.

A digestão pela papaína, da IgG lenta de Tayassu, permitiu a separação desta imunoglobulina nos fragmentos Fab e Fc, por cromatografia de troca iônica em DEAE celulose.

Estes resultados indicam que as imunoglobulinas G de Tayassu devem guardar relação de semelhança estrutural com as demais imunoglobulinas de vertebrados.

Por imunodifusão, utilizando-se como revelador o soro de coelho antifrimento Fc de IgG lenta de Tayassu, não foi observada linha de precipitação entre o antisoro e o fragmento Fab de IgG lenta de Tayassu, mas reagiu formando arcos de precipitação com o fragmento Fc purificado e as imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida, onde se nota um "esporão" indicativo de relação de identidade antigênica parcial entre as proteínas IgG lenta e rápida.

A composição global de aminoácidos das imunoglobulinas IgG lenta e IgG rápida de Tayassu apresentou um número de meias cistinas, na forma de ácido cisteico, de 38 resíduos para a IgG lenta e 39 para a IgG rápida, o que sugere um número aproximado de cinco meias cistinas intercadeia pesada (H-H). A IgG rápida apresentou um total de 1314 resíduos e a IgG lenta 1308.

O perfil cromatográfico, em Sephadex G100, da separação das cadeias H (pesada) e L (leve) da imunoglobulina IgG lenta de Tayassu é semelhante às descritas na literatura para imunoglobulinas G de outras espécies.

A cromatografia de afinidade em Proteína A - Sepharose do soro de Tayassu mostra dois picos correspondentes às frações A e B. A análise imunoelctroforética do material contido na fração B demonstra que a imunoglobulina G de Tayassu ligou-se à protei

na A, visto que, esta contém sítios de ligação que mostram uma alta afinidade pela porção Fc da molécula de IgG. Da mesma maneira, a cromatografia de afinidade da fração RC, obtida do soro de Tayassu em DEAE celulose, mostra dois picos correspondentes às frações RCA e RCB. A análise imunoelctroforética do material contido no pico RCB demonstra que a IgG rápida de Tayassu ligou-se à proteína A, como ocorre com IgG de muitas espécies.

A análise em gel de poliacrilamida da forma reduzida das imunoglobulinas G lenta e rápida de Tayassu apresentaram pesos moleculares semelhantes ao dos marcadores IgG utilizados. Na forma reduzida as imunoglobulinas G lenta e rápida apresentaram cadeias pesadas (H) com pesos moleculares correspondentes a 50 K (50.000 daltons) e as cadeias leves (L) pesos moleculares correspondentes a 25 K (25.000 daltons), de acordo com os marcadores utilizados: a proteína de Bence Jones, que após redução apresenta-se na forma de monômero, migrando como única banda correspondente àquelas das cadeias leve de imunoglobulinas e a proteína monoclonal (GOB) do isotipo IgG1 reduzida.

As proteínas, IgG lenta e rápida de Tayassu, de acordo com as metodologias utilizadas neste trabalho puderam ser qualificadas como imunoglobulinas do isotipo IgG, podendo ser comparadas com classes e subclasses de imunoglobulinas G de vários vertebrados e utilizadas para estudos de filogenia molecular do modelo IgG.



**VI - SUMMARY**

Agar immunoelectrophoretic analysis of Tayassu immune serum developed with rabbit anti-whole Tayassu serum, revealed the presence of a protein fraction with a cathodal electrophoretic migration characteristic of the IgG isotype immunoglobulins.

Fractionation in DEAE-cellulose of individual Tayassu immune serum gave rise to a protein fraction that was characterized by agar gel immunoelectrophoresis as a single precipitin arc present in the region of slow electrophoretic mobility towards the anode. A second fraction obtained from the anion exchange chromatography on DEAE-cellulose, called RC, when submitted to Sephadex gel filtration, gave rise to a protein fraction that had a typical behaviour of 7S IgG immunoglobulins. This fraction purified from RC showed a fast electrophoretic mobility towards the anode when characterized by immunoelectrophoresis.

In Ouchterlony analysis an antiserum specific to human  $\gamma$  chains showed a cross-reaction with both slow and fast mobility Tayassu immunoglobulin populations and also with a human monoclonal IgG (IgG GOB). This indicates that both Tayassu protein fractions integrate the IgG class of vertebrate immunoglobulins.

Two fragments, Fab and Fc, were obtained after papain digestion of the Tayassu slow IgG. These findings indicate that the Tayassu G immunoglobulin must follow the structural arrangement characteristic of other vertebrate IgG immunoglobulins.

In immunodiffusion analysis a rabbit antiserum to Tayassu slow IgG Fc fragment did not react with Tayassu slow IgG Fab

fragment but showed precipitating lines with purified Fc fragment and also with slow and fast IgG immunoglobulins. A spur between these two IgG proteins was also detected and is indicative of partial antigenic identity between them.

The global aminoacid composition showed: a) 38 residues of half-cystine (determined as cysteic acid) for the slow IgG immunoglobulin and 39 residues for the fast IgG immunoglobulin. This suggests an overall number of 5 half-cystine inter heavy chains (H-H) and b) a total of 1308 aminoacid residues for the slow IgG and a total of 1314 aminoacid residues for the fast IgG.

The elution profile obtained from gel filtration (Sephadex 6100) indicates that the heavy (H) and light (L) chains of the *Tayassu* slow IgG immunoglobulin can be separated in a manner similar to that described in the literature for IgG immunoglobulins of other species.

Two peaks, A and B, were obtained from *Tayassu* serum submitted to affinity chromatography on Protein A-Sepharose. Immuno-electrophoretic analysis of peak B shows that the *Tayassu* G immunoglobulin was bound to protein A since this protein displays binding sites with high specificity for the Fc portion of the IgG molecule. The fraction RC, obtained from DEAE-cellulose, also showed two peaks corresponding to fractions RCA and RCB. Immuno-electrophoretic analysis of the RCB fraction showed that the *Tayassu* fast IgG was bound to protein A, as observed for IgGs of many species.

Polyacrylamide gel electrophoresis of the reduced Tayassu slow and fast immunoglobulins showed that the heavy (H) and light (L) chain molecular weights correspond to 50K and 25K, respectively. This is in agreement with the markers used as reference: a human monoclonal IgG1 protein (GOB) in the reduced form and a human  $\lambda$  Bence Jones protein (JJ0) also in the monomeric form after reduction.

Based on the immunochemical characterization described both slow and fast Tayassu immunoglobulins can be identified as IgG immunoglobulins. They can be used for further studies concerning the molecular phylogeny of the IgG model.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, N. and HIRS, C.H.W. - Automation of sample application in aminoacid analysis. *Analyt. Biochem.*, 23, 272-275, 1968.
- AMBROSIUS, H. - Comparative investigation of immunoglobulins of various vertebrate classe. *Nature*, 209:524-527, 1966.
- BAILEY, J.L. - *Techniques in protein chemistry* 2ed. Amsterdam, Elsevier, 310p. 1962.
- BENACERRAF, B.; OVARY, Z.; BLOCH, K.J. and FRANKLIN, E. C. - Properties of guinea-pig 7 S antibodies. I - Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7 S antibodies. *J. Exp. Med.*, 117; 937-949, 1963.
- BURSTEIN, Y. and SCHECHTER, I. - Aminoacid sequence of the NH<sub>2</sub> terminal extra piece segments of the precursors of mouse immunoglobulins  $\lambda$  - type and K type light chains. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 716-720, 1977.
- COE, J.E. - The immune response in the hamster. - Definition of two 7 S globulin classes: 7 S  $\gamma$ 1 and 7 S  $\gamma$ 2. *J. Immunol.*, 100:507-515, 1968.
- COHEN, S. and MILSTEIN, C. - Structure and biological properties of immunoglobulins. *Adv. in immunology*, 7:1-6, 1967.

- CRUMPTON, M.S. and WILKINSON, J.M. - Amino acid composition of human and rabbit  $\gamma$  globulins. *Biochem. J.*, 88:228-234, 1963.
- DUHAMEL, R.C.; SEHUR, P.H.; BRENDAL, K. and MEEZAN, E. - pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from Protein A-Sepharose. *J. Immunol. Methods*, 31:211-217, 1979.
- EDELMAN, G.M. - Dissociation of gammaglobulins. *J. Am. Chem. Soc.*, 81:3155-3160, 1959.
- EDELMAN, G.M. and GALLY, J.A. - The nature of Bence Jones proteins. *J. Exp. Med.*, 116, 207-227, 1962.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; GALL, W.E.; GOTTLIEB, P. D.; RUTHISHAUSER, V. and WAXDAL, M.J. - The covalent structure of an entire IgG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63:78-85, 1969.
- ENDRESEN, J. - Protein A reactivity of whole rabbit IgG and of fragments of rabbit IgG. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C*, 86:211-214, 1978.
- EISEN, H.N. - Immunology. Second Edition. Harper & Row Publishers. Hagerstow. 342p. 1980.

- FAHEY, J.L.; WENDERLICH, J. and MISHELL, R. - The immunoglobulins of mice. II - Two sub classes of mouse 7 S globulins: gamma 2a and gamma 2b globulins. J. Exp. Med., 120:243-251, 1964.
- FORSGREN, A. and SJÖQUIST, J. - "Protein A" from S. Aureus. I - Pseudo-Immune reaction with human  $\gamma$ -globulin. J. Immunol., 97:822-827, 1966.
- FORSGREN, A. - Protein A from Staphylococcus aureus. V - Reaction with guinea pig  $\gamma$ -globulins. J. Immunol., 100:921-926, 1968.
- GARCIA-PARDO, A.; LAMM, M.E.; PLANT, A.G. and FRANGIONE, B. - J. chain is covalently bound to both monomer subunits in human secretory IgA. J. Biol. Chem., 256(22):11734-11738, 1981.
- GILBERT, W. - Why genes in piece? Nature, 271:501-507, 1978.
- GOUDSWAARD, J.; VAN DER DONK, J.A. and NOORDZIJ, A. - Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. Scand. J. Immunol., 8, 21-28, 1978.
- GRABAR, P. and WILLIAMS, C.A. - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunocliniques d'un mélange des protéines application au sérum sanguin. Biochem. Biophys. Acta., 10, 193-196, 1953.



- GROV, A. - Human colostrum IgA interacting with staphylococcal protein A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C.*, 84: 71-72, 1976.
- HOOD, L. and TALMAGE, D.W. - Mechanism of antibody diversity: germ-line basis for variability. *Science*, 168:325-334, 1970.
- HOZUMI, N. and TONEGAWA, S. - Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3628-3634, 1976.
- ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K.; SALMON, S. and FUDENBERG, H. Biologic activities of aggregated  $\gamma$ -globulin. VIII-Aggregated Immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.*, 99(1): 82-91, 1967.
- KALTREIDER, H.B. and JOHNSON, J.S. - Porcine Immunoglobulins. I - Identification of classes and preparation of specific antisera. *J. Immunol.*, 109:992-998, 1972.
- KIM, Y.B.; BRADLEY, S.G. and WATSON, D.W. - Ontogeny of the immune response. I - Development of Immunoglobulins in germ-free and conventional colostrum - deprived piglets. *J. Immunology*, 97(1), 52-63, 1966a.

- KIM, Y.B.; BRADLEY, S.G. and WATSON, D.W. - Ontogeny of the immune response. II - Characterization of 19 S  $\gamma$ G - and 7 S  $\gamma$ 6 immunoglobulins in the true primary and secondary responses in piglets. J. Immunol., 97(2):189-196, 1966b.
- KRONVALL, G. and WILLIAMS, R.C. - Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. J.Immunol., 103,828-833,1969.
- KRONVALL, G.; GREY, H.M. and WILLIAMS, R.C. - Protein A reactivity with mouse immunoglobulins: Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins. J. Immunol., 105:116-123, 1970.
- KRONVALL, G.; SEAL, U.S.; FINSTAD, J. and WILLIAMS, R.C.- Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of  $\gamma$ G globulin using staphylococcal protein A. J.Immunol., 104:140-147, 1970.
- LAMM, M.E.; NUSSENEZWEIG, V. and BENACERRAF, B. - Isolation of purified H and L polypeptide chains from guinea - Pig  $\gamma$ 2 immunoglobulin after mild reduction. Immunology, 10, 309-319, 1968.
- LAMM, M.E. - Further comparison of guinea pig gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins. Amino acid compositions of the polypeptide chains and papain fragments. Immunochemistry, 6:235-240, 1969.

LESLIE, R.G.Q.; MELAMED, M.D. and COHEN, S. - The products from papain and pepsin hydrolyses of Guinea-pig immunoglobulins  $\gamma 1G$  and  $\gamma 2G$ . *Biochem. J.*, 121:829-837, 1971.

LÖFKVIST, T. and SJÖQUIST, J. *Acta. Path. Microbiol.Scand.*,56: 295-301, 1962.

LOVO, M.F.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - Resultados não publicados.

LOVO, M.F.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - Resultados não publicados.

MARQUES, M.R.F.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - Chemical Studies of a urinary Bence Jones protein; aminoacid composition and evidence of a covalently bound dimeric structure. *I.R.C.S. Med. Sci.*, 12:1008-1009, 1984a.

MARQUES, M.R.F.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - The interchain disulphide bridge of Bence Jones (JJ0) protein: isolation and characterization of the C-terminal end, cysteine containing, tryptic and peptic-tryptic peptides which stabilize the dimeric configuration. *I.R.C.S. Med. Sci.*, 12:1010-1011, 1984b.

- MARQUES, M.R.R.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - The variable region of a human Bence Jones protein (JJ0) assignment to the  $\nu$   $\lambda$ III subgroup. *Med. Sci. Res.*, 15:121-122, 1987a.
- MARQUES, M.R.F.; MARANGONI, S. and OLIVEIRA, B. - Tryptic peptides of human Bence Jones protein JJ0: partial characterization of the C domain. *Med. Sci. Res.*, 15:123-124, 1987b.
- MEDGYESI, G.A.; FÜST, G. and GERGELY, J. - Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochem.*, 15:125-129, 1978.
- METZGER, J.J.; NOVOTNY, J. and FRANEK, F. - Heterogeneity of pig immunoglobulins  $\nu$ -chains. *Febs Letters*, 14(4):23--240, 1971.
- MURPHY, F.A.; OSEBOLD, J.W. and AOLUND, O. - Physical heterogeneity of bovine  $\gamma$ -globulins: characterization of  $\gamma$ M and  $\gamma$ G globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 112:126-136, 1965.
- NATVIG, J.B.; KUNKEL, H.G. - Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Adv. Immunol.* 16:1, 1973.
- NUSSENSWEIG, V. and 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, 1008-1011, 1964.

- 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: 320-328, 1970.
- OLIVEIRA, B. and LAMM, M.E. - Interchain disulphide bridges of guinea pig  $\gamma 2$  immunoglobulin. *Biochem.* 10(1), 26-31, 1971.
- OUTCHERLONY, O. - Antigen-antibody reaction in gels. IV - Types of reactions in co-ordinated system of diffusion. *Acta path. microbiol. scand.*, 32:231-240, 1953.
- PORTER, R.R. - The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *J. Biochem.*, 73:119-126, 1959.
- POSKUS, E.; DELLACHA, J.M. and PALADINI, A. - Resultados não publicados.
- ROMER, A.S. - Vertebrate Paleontology. Third Edition, The University of Chicago Press, Chicago and London, 1966.
- SALUK, P.H. and CLEM, W. - The unique Molecular weight of the heavy chain from human IgG3. *J. Immunol.*, 107(1):298-301, 1971.

- SANDBERG, A.L.; OLIVEIRA, B. and OSLER, A.G. - Two complement fixation by Guinea pig gamma 1 and gamma 2 Immunoglobulins. Fed. Proceedings, 28, 187-191, 1969.
- SANDBERG, A.L.; OSLER, A.G.; SHIN, H.S. and OLIVEIRA, B. - The biologic activities of Guinea pig immunoglobulins. II - Modes of complement interaction with gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins. J. Immunol., 104, 329-334, 1970.
- SANGER, F. and THOMPSON, A. - Halogenation of Tyrosine during acid hydrolysis. Biochem. Biophys. Acta, 71:468-471, 1963.
- SELA, M.; GIVOL, D. and MOZES, E. - Resolution of rabbit gamma globulin into two fractions by chromatography of diethylaminoethylcellulose-Sephadex. Biochem. Biophys. Acta, 78:649, 1963.
- SETCAVAGE, M.T. and KIM, Y.B. - Characterization of porcine serum immunoglobulins IgG, IgM and IgA and the preparation of monospecific anti-chain sera. Immunochemistry, 13:643-652, 1976.
- SINAGANIAN, R.P. and OLIVEIRA, B. - The allergic response of rabbit platelets. Federation Proceedings, 27:315, 1968.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. and MOORE, S. - Automation recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Analyt. Chem., 30, 1190-1196, 1958.

- SJÖQUIST, J.; FORSGREN, A.; GUSTAFSON, G.T. and STALENHEIM, G.  
- In Novel Symposium: Gammaglobulin structure and control of biosynthesis, p.341, John Wiley, and Sons, New York, 1968.
- UTSUMI, S. - Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments. *Biochem. J.*, 112:343-355, 1969.
- TERRY, W.D. - Skin-sensitizing activity related to  $\gamma$ -polypeptide chain characteristics of human IgG. *J.Immunol.*, 95(6): 1041-1047, 1965.
- WEIGERT, M.; GATMAITAN, L.; LOH, E.; SCHILLING, J. and HOOD, L.  
- Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature*, 276:785-795, 1978.
- WEILER, E. - Differential activity of allelic globulin genes in antibody-producing cells. *Proc. Natn. Acad. Sci., USA*, 54: 1765-1772, 1965.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

- DITTEBRANDT, M. - Application of the weich selbaum Biuret Reagent to the determination of Spinal fluid protein. Am. J. Clin. Path., 18:439-443, 1948.
- FREUND, J. - The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuber. Res., 7:130-132, 1965.
- MACKENZIE, M.R.; WARNER, M.R. and MITCHELL, G.F. - The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A. J. Immunol., 120:1493-1496, 1978.
- SANDBERG, A.L.; OLIVEIRA, B. and OSLER, A.G. - Two complement interaction sites in Guinea-pig immunoglobulins. J. Immunol., 106:282-285, 1971.
- SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E. and MARZEL, Jr., J.V. - Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrilamide gels. Biochem. biophys. Res. Comm., 28(5):815-820, 1967.
- WEBER, K. and OSBORN, M. - The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. J. biol. Chem., 244(16):4406-4412, 1969.