

REGULAÇÃO DA RESPOSTA BLASTOGÊNICA MEDIADA POR
ANTÍGENO ANTICORPO ESPECÍFICO. I – EFEITO DE COMPLEXOS
IMUNES PRÉ-FORMADOS NA RESPOSTA PROLIFERATIVA
DE LINFÓCITOS

EDGAR M. CARVALHO
JOHN S. DAVIS

Estudos prévios em animais de experimentação têm mostrado que complexos imunes formados por antígeno e anticorpo exercem uma influência reguladora na resposta proliferativa de linfócitos.

Utilizando-se de indivíduos previamente imunizados ou não com Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) o presente trabalho compara a resposta blastogênica induzida pelo antígeno (KLH) com aquela induzida por complexos imunes sob a forma de precipitado constituídos por KLH e IgG anti-KLH. Em cultura de linfócitos de indivíduos previamente imunizados, complexos formados por KLH e IgG anti-KLH induziram in vitro uma resposta proliferativa significativamente maior que o antígeno. Este aumento da blastogênese verificado quando o anticorpo foi acoplado ao antígeno não dependeu da presença de complemento, da quantidade de moléculas do anticorpo no complexo, e foi específico com relação ao antígeno pois não houve blastogênese significativa em cultura de linfócitos de indivíduos não imunizados, quando estimulados com complexos de KLH e IgG anti-KLH. Linfócitos que não são nem T nem B mas possuem receptor Fc para moléculas de IgG desempenham papel importante na resposta mediado por complexos imunes, haja vista a depleção destes linfócitos reduziu a resposta proliferativa mediada por complexos imunes à observada com o antígeno isoladamente.

Complexos imunes formados por antígeno e anticorpo têm sido documentados em uma série de condições clínicas tais como doenças reumáticas Barnet et al (1979), Eisenberg, Theofilopolus, & Dixon (1977), doenças neoplásicas Carpentier et al (1977) e infecções bacterianas Bayer et al (1977) e parasitárias Chaves et al (1979). Utilizando animais de experimentação, vários estudos têm mostrado que complexos imunes podem alterar a resposta imunológica tanto no aspecto celular como humoral Banks (1973), Harris (1968) e Abrahams, Philipps & Miller (1973). Com relação à resposta proliferativa de linfócitos, estes trabalhos têm mostrado que complexos imunes podem induzir uma resposta maior ou menor àquela verificada com o antígeno Banks (1973), Harris (1968) e Oppenheim (1972). Todavia o mecanismo pelo qual complexos imunes exercem seus efeitos não está esclarecido, assim como somente alguns estudos têm avaliado seu efeito na

Trabalho realizado nos Laboratórios de Imunologia da Universidade de Virginia e Hospital Prof. Edgard Santos. Univ. Fed. da Bahia – 40000 – Salvador, Brasil. Suportado pelos Grants AM 20967 e AM 11766 da USPHS.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1979.

blastogênese de linfócitos provenientes da espécie humana Bloch-Shtacher, Hirschhorn & Uhr (1968), Möller (1969) e Leikin & Oppenheim (1971).

No presente trabalho utilizando indivíduos previamente imunizados com o antígeno "Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)" a resposta proliferativa de linfócitos mediada por este antígeno foi comparada com aquela induzida por complexos imunes. Complexos precipitados formados por KLH e IgG anti-KLH consistentemente induziram uma resposta proliferativa superior à observada com o antígeno. A especificidade antigênica da estimulação mediada por complexos imunes, o efeito do complemento e as células envolvidas neste fenômeno foram avaliadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Imunização: seis indivíduos adultos normais foram imunizados com KLH por via intradérmica com a dose de 500 microgramas. Teste cutâneo para determinar sensibilidade retardada foi realizado com a administração de 50ug por via intradérmica, 2 semanas após a imunização.

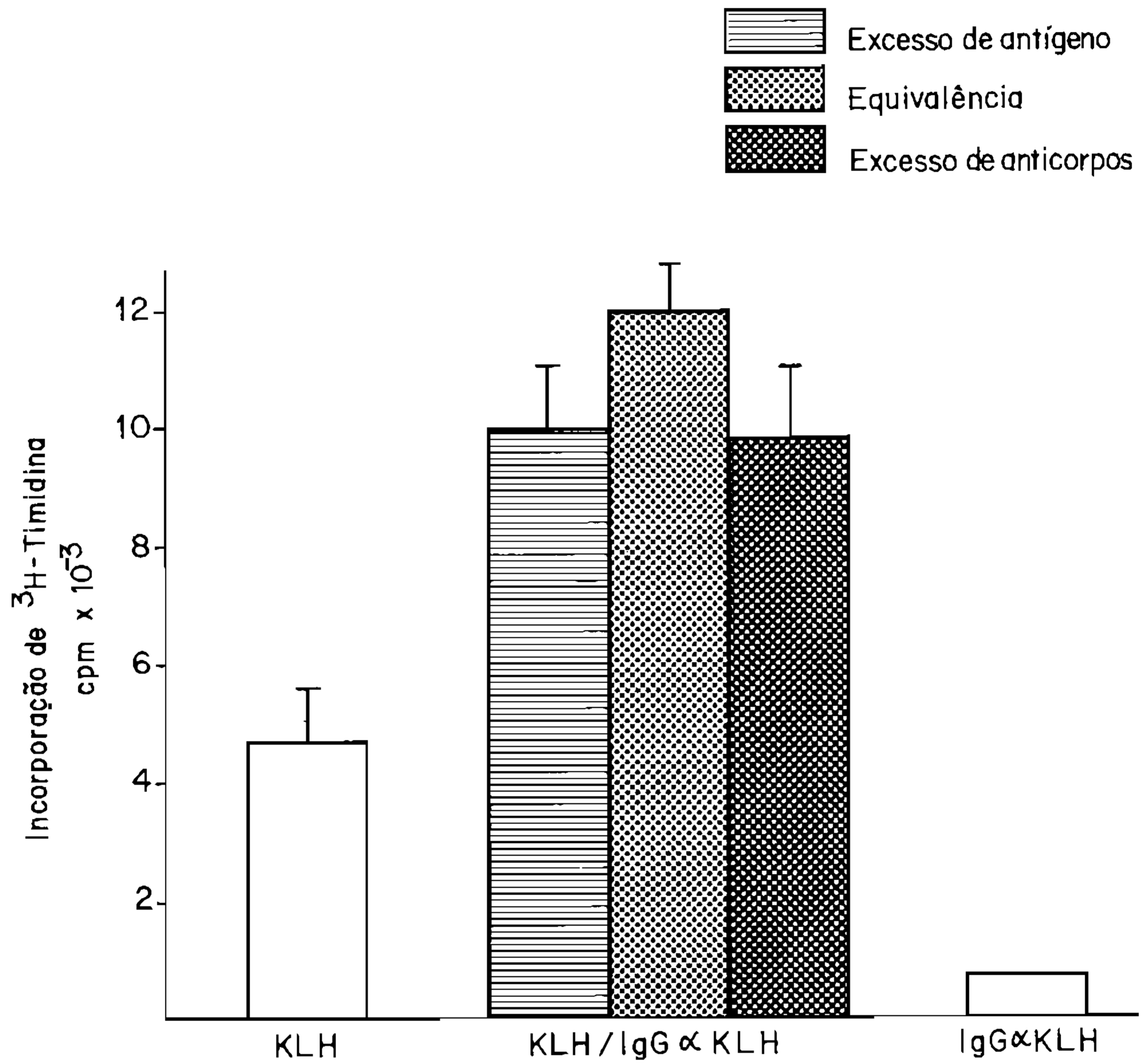
Antígeno: KLH foi obtido através da "Pacific Biomarine Company", Venice, California, e foi purificado pelo procedimento descrito por Campbell et al (1967). O produto após re-suspensão em 0,9% NaCl foi filtrado e estocado a 4°C na concentração de 10mg/ml. O material usado para injeções foi re-suspensão em solução bacteriostática de NaCl.

Preparação do Anticorpo: dois coelhos (NZW) foram imunizados com 4mg de KLH em adjuvante de Freund completo administrado por via intramuscular. Um mês após, uma segunda dose do antígeno na concentração de 500ug em adjuvante de Freund incompleto foi ministrado por via subcutânea em sítios diferentes. Duas semanas após a última injeção, os coelhos foram sacrificados e os soros misturados. A fração IgG foi isolada através de metodologia clássica Garvey, Cremer & Sussendorf (1977), concentrada através de diálise com Amicon, e o material final foi filtrado e estocado a 4°C na concentração de 10mg/ml em 0,9% NaCl.

Preparação de complexos imunes: uma curva de precipitação usando KLH marcado com I₁₂₅ Marchalonis (1969) foi realizada para determinar complexos formados em equivalência, em zonas de excesso de antígeno ou de anticorpo. Através do KLH marcado (I₁₂₅) pode-se avaliar a quantidade de antígeno presente no complexo. Na maioria dos experimentos, os complexos foram formados em equivalência. Complexos em excesso de antígeno ou de anticorpo foram formados conservando-se a mesma quantidade de antígeno e adicionando-se uma quantidade de anticorpo vinte vezes menor ou maior àquela utilizada para a formação de complexos em equivalência. Para a preparação dos complexos, KLH e IgG anti-KLH eram misturados e incubados a 37°C por 1 hora e, posteriormente, deixados a 4°C por 24 horas. Após centrifugação usando 800g, o sobrenadante era aspirado e o precipitado re-suspensão em 0,9% NaCl.

Suspensão de células: células mononucleares foram obtidas através de sangue heparinizado pelo processo de centrifugação em um gradiente de densidade usando LSM ("Lymphocyte Separation Medium"). Após a separação, as células foram lavadas em meio de cultura RPMI (Grand Island Biological Company), incubadas a 37°C por 1 hora para remoção de proteínas aderidas e, após nova lavagem com RPMI foram re-suspensas na concentração de 1x10⁶/ml contendo 15% de soro humano AB⁺ inativado pelo calor. Com a finalidade de depletar linfócitos com grande afinidade para a porção Fc da imunoglobulina, o seguinte procedimento foi utilizado: 1. Células mononucleares na concentração de 20x10⁶ por ml em RPMI contendo 20% de soro de feto bovino foram incubadas por 45 minutos a 37°C com a finalidade de separar os macrófagos dos linfócitos. Após este procedimento, as células não aderentes foram colhidas e os macrófagos recolhidos pe-

GRÁFICO - 1



Blastogênese de linfócitos estimulados com complexos imunes formados em equivalência, ou excesso de antígeno ou excesso de anticorpo.

Valores representam média e erro padrão de 4 diferentes experimentos.

la passagem de uma borracha sobre a placa. 2. As células não aderentes ($96 \pm 2\%$ de linfócitos) foram re-suspensas na concentração de $4 \times 10^6/\text{ml}$ e 2ml desta suspensão adicionadas a placas de Petri contendo complexos imobilizados de BSA/ α BSA Horwitz & Juul-Nielsen (1977). Estes linfócitos foram incubados por 45' à temperatura ambiente. As células não aderentes foram recolhidas e o processo repetido mais uma vez. A população resultante continha $85 \pm 9\%$ de linfócitos T, e $10 \pm 3\%$ de linfócitos B e menos que 1% de linfócitos com receptores para porção Fc da imunoglobulina detectados por uma técnica semelhante ao Ea repley Horwitz, Cooper & Carvalho (1979). Esta população de células para diferenciar das células mononucleares no presente trabalho vai ser denominada *população depleta de linfócitos com receptores Fc*. Como macrófagos são necessários para uma resposta proliferativa *in vitro* Seeger & Oppenheim (1977), 10% de macrófagos foram adicionados a esta população de células, pois esta era, aproximadamente, a média de macrófagos detectada na população de células mononucleares.

Condições de cultura: 2×10^5 células em 0,2ml foram adicionados a placas de microtitulação (Falcon 3040) em tríplice e estimuladas com KLH ou complexos de KLH/IgG anti-KLH. Ao fim do 5º dia, 2mCi de H^3 -timidina, com atividade específica de 1,3Ci por mMol ("New England Nuclear") eram adicionados e, após 4 horas, as células eram colhidas para determinação da captação de H^3 Timidina num contador de Acetilação. Os resultados são apresentados como a média e o erro padrão das contagens por minuto (CPM).

RESULTADOS

1. Resposta proliferativa de linfócitos a KLH e complexos formados de KLH/IgG anti-KLH

A resposta proliferativa de linfócitos (incorporação de ^3H -timidina) em indivíduos imunizados (Grupo 1) ou não imunizados (Grupo 2) é mostrada na Tabela I. Somente indivíduos previamente sensibilizados responderam à estimulação com complexos imunes. Estes induziram uma resposta proliferativa duas a três vezes maior que a do antígeno isoladamente. A quantidade de moléculas de anticorpo no complexo imune não pareceu alterar a resposta mediada por este. O Gráfico 1, por exemplo, demonstra que tanto em zona de excesso de antígeno como excesso de anticorpo complexos precipitados foram mais eficientes que o antígeno.

TABELA I

Resposta Blastogênica de Linfócitos Humanos a KLH e Complexos Imunes Formados por KLH-IgG α KLH

Estimulantes	Doadores	
	Não Imunizados	Imunizados
	CPM \pm EP	
Ausente	410 \pm 41*	662 \pm 98
KLH	589 \pm 133	7,097 \pm 823
KLH-IgG α KLH**	731 \pm 174	15,251 \pm 1,089

* Valores representam a média e o erro padrão das cpm de 6 diferentes experimentos.

** A quantidade de KLH no complexo imune precipitado de KLH-IgG α KLH era igual à quantidade utilizada para estimulação somente com o antígeno.

2. Efeito do complemento na blastogênese de linfócitos estimulados com complexos de KLH/IgG anti-KLH

Alguns observadores têm sugerido que complexos de antígeno e anticorpo são capazes de induzir uma resposta proliferativa em linfócitos não previamente imunizados, quando as condições de cultura contêm complemento Bloch-Shtacher, Hirschhorn & Uhr (1968), Möller (1969). Para avaliar este aspecto, linfócitos provenientes de indivíduos previamente imunizados ou não foram estimulados com KLH/IgG anti-KLH em presença de soro fresco ou inativado pelo calor. A Tabela II mostra que complexos de KLH/IgG anti-KLH só estimularam linfócitos previamente imunes, mesmo em presença de complemento. Além disto, as culturas com complemento mostraram um grau de estimulação menor, tanto para o Ag como para os complexos imunes.

TABELA II

Efeito do Complemento na Resposta Proliferativa de Linfócitos a Complexos Imunes

Doadores	Culturas Estimuladas em Presença de:			
	Soro Fresco		Soro Inativado pelo Calor	
	KLH	KLH-IgG α KLH	KLH	KLH-IgG α KLH
Não Imunizados N = 4	543 \pm 145*	839 \pm 178	668 \pm 109	892 \pm 250
Imunizados	4,536 \pm 171	8,197 \pm 1,069	5,860 \pm 641	13,102 \pm 2,285

*Valores representam a média e o erro padrão das cpm de 4 diferentes experimentos.

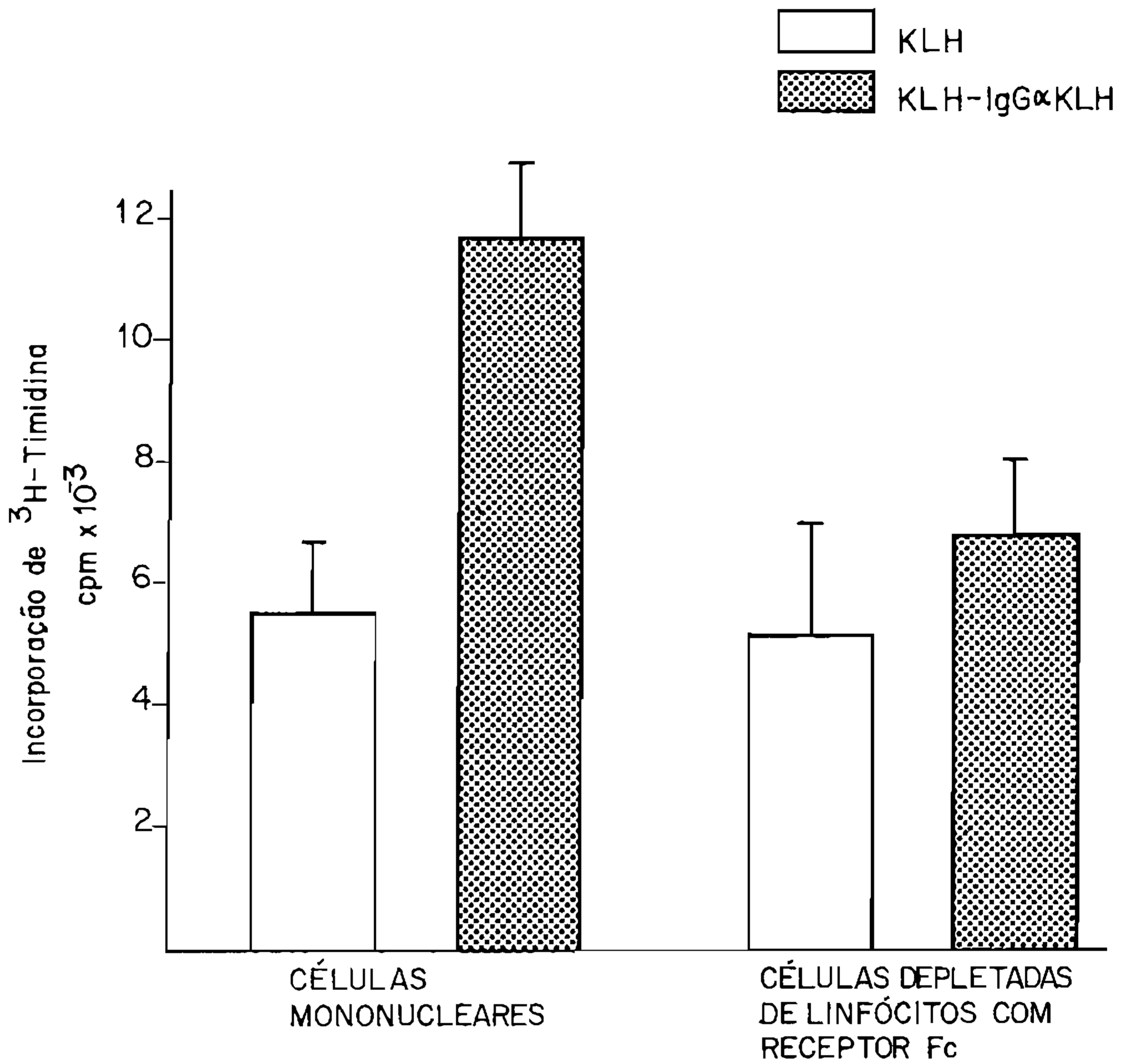
3. Células envolvidas no aumento da resposta proliferativa mediada por complexos de antígeno e anticorpo

Estudos têm demonstrado que complexos imunes podem se ligar a algumas células do sistema imunológico que têm receptores para porção Fc da imunoglobulina Ferrarini et al (1975); deste modo resolvemos, por um processo de imuno-aderência, usando complexos formados por albumina sérica bovina (ASB) e soro de coelho anti-ASB, depletar linfócitos que têm estes receptores e, avaliar se esta depleção teria alguma alteração na resposta blastogênica mediada por complexos imunes. O Gráfico 2 mostra que em presença de macrófagos, mas na ausência de linfócitos possuidores de receptores para a porção Fc da imunoglobulina, os complexos de KLH/IgG anti-KLH não induziram uma resposta superior à verificada com o antígeno. O fato de que a população depletada de linfócitos possuidores de receptores para a porção Fc da imunoglobulina continha mais linfócitos T e B que previamente à depleção, revela que a maioria das células depletadas não eram constituídas nem de linfócitos T nem B, mas possuíam receptores para a porção Fc da imunoglobulina G.

DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* avaliando o efeito de complexos de antígeno e anticorpo com relação à resposta proliferativa de linfócitos têm mostrado resultados contraditórios Banks (1973), Harris (1968), Oppenheim (1972), Bloch-Shtacher, Hirschhorn & Uhr (1968), Möller (1969) & Leikin & Oppenheim (1971). Provavelmente a fonte de células utilizadas (diferentes espécies de animais) e a maneira de preparar os complexos, contri-

GRÁFICO - 2



Efeito da depleção de linfócitos com receptor Fc na resposta blastogênica mediada por complexos imunes.

Valores representam média e erro padrão de 5 diferentes experimentos.

buíram para estas observações discordantes. Na presente investigação, foi documentado que complexos formados por KLH e IgG anti-KLH, em equivalência ou em excesso de antígeno ou de anticorpo, foram consistentemente mais eficientes que o antígeno sozinho em induzir blastogênese de linfócitos. Esta estimulação foi específica, pois só linfócitos de indivíduos previamente imunizados responderam à estimulação mediada por complexos imunes, e o anticorpo por si só não foi um agente estimulador. Estes achados estão em concordância com os trabalhos de Oppenheim e col (1972) realizados com cobaias e não oferecem apoio às observações anteriores de que complexos imunes podem induzir proliferação de linfócitos que não tiveram previamente contato com o antígeno Bloch-Shtacher, Hirschhorn & Uhr (1968) e Möller (1969).

O mecanismo pelo qual a associação do anticorpo ao antígeno pode aumentar a resposta proliferativa de linfócitos não está esclarecido. Agregação do antígeno pela molécula do anticorpo Harris (1968), maior habilidade de macrófago em processar complexos imunes do que o antígeno isoladamente Oppenheim (1972) ou ativação de linfócitos B via receptores do complemento Thorbecke & Siskind (1973), têm sido sugeridos como as possíveis explicações para este fato. No presente trabalho, complemento não foi necessário para que o aumento da resposta proliferativa mediada por complexos imunes fosse observada e, em presença de soro inativado pelo calor, a síntese de DNA foi até maior que em presença de soro fresco. Em trabalho a ser publicado, chamamos a atenção que o papel do anticorpo não é, somente, o de agregar o antígeno, pois complexos formados com a porção F (ab')₂ do anticorpo não induzem blastogênese semelhante a complexos imunes formados com uma molécula intata de IgG. Deste modo foi, então, testada a possibilidade de que uma interação de complexos imunes, com células possuidoras de receptores para a porção Fc da imunoglobulina, fosse uma etapa necessária para que o anticorpo exercesse seu efeito. Trabalhos anteriores têm documentado que macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e uma subpopulação de linfócitos que não são T e nem B e denominados de linfócitos L possuem receptores para a porção Fc da imunoglobulina Lobo, Westervelt & Horwitz (1975) e Ferranini et al (1975). Estes últimos têm a peculiaridade de possuírem receptores Fc com grande avidéz para moléculas de IgG Lobo, Westervelt & Horwitz (1975), e são os linfócitos que podem ser depletados, pela sua capacidade de aderir a complexos imunes imobilizados em superfície plástica Horwitz & Juul-Nielsen (1977). A demonstração de que, na presença de macrófagos, mas na ausência de linfócitos com alta afinidade pela porção Fc da imunoglobulina, a resposta proliferativa induzida por complexos de antígeno e anticorpo foi reduzida à resposta mediada pelo antígeno, prova que a presença de linfócitos que possuem grande avidéz pela porção Fc da imunoglobulina, são necessários para que a resposta blastogênica mediada por complexos seja superior à mediada pelo antígeno. O mecanismo pelo qual estes linfócitos participam na estimulação mediada por complexos imunes está sob investigação. Resultados preliminares indicam que estes linfócitos não sofrem transformação blástica em presença de complexos de antígeno e anticorpo, mas a sua habilidade de fixar complexos imunes pelo receptor Fc, se constitui numa forma peculiar de apresentação antigênica para linfócitos T.

SUMMARY

Previous studies in experimental animals have documented that immune complexes consisting of antigen and antibody exert a regulatory effect in immunological response. Using peripheral blood human lymphocytes from subjects previously immunized with Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), the present study compared the *in vitro* lymphocyte blastogenesis induced by KLH with that mediated by precipitated immune complexes formed by KLH and IgG anti KLH. The IgG antibody complexed to the antigen consistently induced a proliferative response significantly higher than that mediated by the antigen alone. The enhancement observed with the immune complexes was neither

dependent of the presence of complement or the amount of antibody molecules in the complexes. Depletion of non T, non B lymphocytes with high avidity Fc receptors for molecules of IgG, reduced the blastogenesis response induced by immune complexes to levels observed with the antigen alone. We conclude that these lymphocytes played an important role in the enhancement of lymphocyte blastogenesis mediated by immune complexes, probably by their ability to bind the IgG through Fc receptors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, S., PHILIPPS, R. A. & MILLER, R. G., 1973 – Inhibition of the immune response by 75 antibody-mechanism and site of action. *J. Exp. Med.*, *137* :870-892.
- BANKS, K., 1973 – The effect of antibody on antigen-induced lymphocyte transformation. *J. Immunol.*, *110* :709-716.
- BARNETT, E. V., KNUTSON, D. W., ABRASS, C. K., CHIA, O. S., YOUNG, L. S & LIEBLING, M. R., 1979 – Circulating immune complexes: their immunochemistry, detection and importance. *Ann. Int. Med.*, *91* :430-440.
- BAYER, A. S., THEOFILOPOULOS, A. N., EISENBERG, R., DIXON, F. J., GUZE, L. B., 1976 – Circulating immune complexes in infective endocarditis. *N. Eng. J. Med.*, *295* :1500-1505.
- BLOCH-SHACHER, N., HIRSCHRON, K. & UHR, J. W., 1968 – The response of lymphocytes from non-immunized humans to antigen-antibody complexes. *Clin. Exp. Immunol.*, *3* :889-899.
- CAMPBELL, D. H., GARVEY, J. S., CREMER, N. E. & SUSSADORF, D. H., 1967 – Methods in immunology. W. A. Benjamin, New York. pp. 69-70.
- CARPENTIER, N. A., LANGE, G. T., FIERE, D. M., FOURNIE, G. J., LAMBERT, P. H. & MIESCHER, P. A., 1977 – Clinical relevance of circulating immune complexes in human leukemia: association in acute leukemia of the presence of complexes with unfavorable prognosis. *J. Clin. Invest.*, *60* :874-884.
- CHAVES, J., FERRI, R. G., KLIEMANN, T. A. E., IRULEGUI, I. & De SOUZA, H. B. W. T., 1979 – Complexes imunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, *21* :77-81.
- EISENBERG, R. A., THEOFILOPOULOS, A. N. & DIXON, F. G., 1977 – Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes. *J. Immunol.*, *118* :1428-1434.
- FERRARINI, M., MORETTA, L., ABRILE, R. & DURANTE, M. L., 1975 – Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells. *Eur. J. Immunol.*, *5* :70-72.
- GARVEY, J. S., CREMER, N. E., SUSSADORF, D. H., 1977 – Methods in immunology. W. A. Benjamin, Inc., Reading, Massachusetts, pp. 135-139.
- HARRIS, G., 1968 – Further studies of antigen stimulation of desoxyribonucleic acid synthesis in rabbit spleen cell culture. *J. Immunol.*, *14* :415-425.
- HORWITZ, D. A. & JUUL-NIELSEN, K., 1977 – Human blood L. lymphocytes in patients with active lupus erythemathosus, rheumatoid arthritis and scleroderma: a comparison with T and B cells. *Clin. Exp. Immunol.*, *30* :370-378.
- HORWITZ, D. A., COOPER, M. & CARVALHO, E. – Binding characteristics of Fc receptor for IgG on human peripheral blood T lymphocyte and L lymphocyte: a technical report. *Clin. Exp. Immunol.* In press.
- LEIKIN, S. & OPPENHEIM, J. J., 1971 – Differences in transformation of adult and newborn lymphocytes stimulated by antigen, antibody and antigen-antibody complexes. *Cell. Immunol.*, *1* :468-475.

- LOBO, P. I., WESTERVELT, F. B. & HORWITZ, D. A., 1975 – Identification of two populations of immunoglobulin – bearing lymphocytes in man. *J. Immunol.*, *114* :116-119.
- MARCHALONIB, J. J., 1969 – An enzyme method for the trace iodination of immunoglobulins and others proteins. *Biochem. J.*, *113* :209-217.
- MÖLLER, G., 1969 – Induction of DNA synthesis 1 – normal human lymphocyte cultures by antigen-antibody complexes. *Clin. Exp. Immunol.*, *4* :65-82.
- OPPENHEIM, J. J., 1972 – Modulation of “in vitro” lymphocyte transformation by antibodies: Enhancement by antigen-antibody complexes and inhibition by antibody excess. *Cell. Immunol.*, *3* :341-360.
- SEEGER, R. C. & OPPENHEIM, J. J. O., 1970 – Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen induced transformation of lymphocytes. *J. Exp. Med.*, *132* :44-65.
- THORBECKE, G. J. & SISKIND, G. W., 1973 – Effect of specific antibody on the antigen-induced proliferative response of rabbit lymph node cells. *J. Immunol.*, *110* :648-651.