

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO DE IgM COMO O FATOR DO SORO
DE PACIENTES HANSENIANOS RESPONSÁVEL PELA
SEDIMENTAÇÃO ACELERADA DE HEMÁCIAS DE
CARNEIRO FORMOLIZADAS.**

ADEMILSON PANUNTO CASTELO

RIBEIRÃO PRETO - SP
-1994-

ADEMILSON PANUNTO CASTELO

**IDENTIFICAÇÃO DE IgM COMO O FATOR DO SORO DE PACIENTES
HANSENIANOS RESPONSÁVEL PELA SEDIMENTAÇÃO ACELERADA
DE HEMÁCIAS DE CARNEIRO FORMOLIZADAS.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do grau de Mestre
em Imunologia Básica e Aplicada.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA ROQUE BARREIRA

RIBEIRÃO PRETO - SP
-1994-

"Desde os tempos antigos e em virtualmente todas as culturas, a lepra tem evocado imagens singulares de horror e fascinação. Pacientes com lepra sofrem de dois problemas: uma doença do corpo que leva a perda de sensibilidade, a mutilação e a deformidade, e uma doença da mente que leva a uma estigmatização ímpar. Não há na História nenhuma outra doença cujas vítimas tenham sido queimadas na fogueira por Henrique II da Inglaterra e Felipe V da Espanha, ou enterradas vivas por Eduardo I, neto de Henrique, ou que, vivos, tenham recebido as exéquias da morte pela Igreja da Europa medieval antes de serem expulsas para fora dos limites dos muros da cidade".

Brody, S.N. 1974

"Reciprocidade, reconhecida desde os tempos de Confúcio como um valor fundamental nas relações humanas, não tem sido considerada importante para o investimento científico. Contudo poucas áreas da ciência biomédica têm dado maiores oportunidades para interação recíproca entre ciência e o mundo real do que a imunologia...Refletindo sobre algumas das reciprocidades entre imunologia e o mundo real, estou chegando a conclusão de que a pesquisa biomédica tem potencial incalculável para contribuir com a humanidade..."

Barry R. Bloom, 1993

A Arlete, pelo amor,
paciência, carinho e atenção,
nem sempre devidamente
retribuídos.

Aos meus pais Franklin e Olga, aos meus irmãos Adilson e Andréia. à Jadirlei, D. Luzia, seu Getúlio, Adriano, Adriana e Vinícius, pelo carinho, apoio e incentivo constantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que colaboraram na realização deste trabalho, e de modo especial a:

Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira, pela amizade, confiança, incentivo e orientação segura, pelos importantes ensinamentos, pelo exemplo de professor e pesquisador. Muito obrigado.

Dra. Norma Tiraboschi Foss, pela assessoria de minha pesquisa, por suas sugestões valiosas, pelos soros cedidos e pelo apoio dado desde o nosso primeiro contato.

Dr. Lewis Joel Greene, pelos valiosos ensinamentos de redação científica, pelas críticas e sugestões enriquecedoras, que muito contribuíram na fase final de redação dessa dissertação.

Dra. Aldaísa Castanho Fosther, diretora do Centro de Saúde Escola, pela contribuição efetiva a este trabalho, ao colocar a nossa disposição a estrutura do Centro de Saúde.

Dr. Célio Lopes Silva, que gentil e prontamente cedeu determinados reagentes.

Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, pelo auxílio na confecção de coluna com anticorpos imobilizados e auxílio na resolução de alguns problemas envolvendo este trabalho.

Dra. Sandra A. Pinheiro e Flávio L. F. Oliveira, pelos dados epidemiológicos da hanseníase no Brasil, nos diversos estados e na região de Ribeirão Preto.

Sandra Maria Oliveira Thomaz e Imaculada Conceição Bragheto, pela amizade, carinho e competência no auxílio técnico.

Luiz Carlos Camargo, Maria Cecília Silveira, Eliana Aparecida Tonetto, Luzia Conceição Machado e Sílvia de Fátima Alves Rehver, médico e funcionárias do Centro de Saúde Escola, pela atenção dispensada, entusiasmo e interesse pela pesquisa, disponibilidade para a seleção e coleta de sangue de pacientes hansenianos.

Denise Brufato Ferraz, pela disponibilidade na coleta de sangue dos pacientes hansenianos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Maria Inez Anceschi, pela dosagem de IgM dos soros de pacientes hansenianos.

Ronaldo Sordi Campanini e Rosângela Catarina Peral Mesquita, pela amizade, disponibilidade e auxílio na resolução de problemas de secretaria.

Geraldo Cassio dos Reis, pelo auxílio na análise estatística das dosagens de IgM sérica dos pacientes hansenianos.

Adelino Rodrigues e Benedicto Felix Cavalcanti Fernandes, pela disponibilidade em coletar e ceder as hemácias de carneiro.

Docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia pela amizade, carinho e convivência agradável.

Funcionários e pós-graduandos do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas, por manterem as portas sempre abertas ao nosso laboratório, para a utilização de aparelhos.

Marcelo Dias Baruffi, Laura Maria de Vasconcelos, Gilson Freitas da Silva, João Tadeu Paes Ribeiro, amigos de todas as horas, pela solidariedade, companherismo, ensinamentos e amizade.

José Eduardo, Márcia, Ana Luiza, Deijanira, Tereza, Lúcia Maria, Giovanni, Duarte, Paulo, queridos amigos, pela amizade, incentivo e convívio sempre agradável.

Estagiários e Alunos de Iniciação Científica do laboratório de Imunoquímica, pela alegria, companherismo, carinho e amizade demonstrados no convívio cotidiano.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e à FAEPA pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

PREÂMBULO	01
INTRODUÇÃO	04
1 - Aspectos gerais da hanseníase	05
2 - Antígenos de <i>M. leprae</i> e resposta imunitária	06
3 - Ensaios para diagnóstico da hanseníase	10
4 - A Reação de Rubino	12
OBJETIVO	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
1. Soros humanos	19
2. Hemácias de carneiros	19
3. Reação de Rubino	20
4. Anti-soros	20
5. Dosagem de proteína	21
6. Precipitação de soros com polietileno glicol (PEG)	21
7. Atividade Rubino após digestão enzimática	21
8. Atividade Rubino na presença de EDTA	21
9. Cromatografia de afinidade	22
10. Cromatografia de troca iônica	23
11. Cromatografia por filtração em gel	24
12. Adsorção do fator Rubino a resinas com anticorpos imobilizados	24
13. Ensaios de inibição do fator Rubino contido no soro	25
14. Ensaios de inibição do fator Rubino adsorvido em hemácias sensibilizadas	25
15. Análise eletroforética e imunoblot	26
16. Análise estatística	27
RESULTADOS	28
1. Algumas características do fator Rubino	29
2. Isolamento do fator Rubino	29
3. Evidências da correspondência entre o fator Rubino e IgM	36
4. Dosagem de IgM sérica dos soros testados	41
DISCUSSÃO	43
RESUMO	51
SUMMARY	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

Preâmbulo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônico-granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, sendo este um bacilo álcool-ácido resistente, parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário e células de Schwann.

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 5,5 milhões de casos de hanseníase, e 2 a 3 milhões de indivíduos, com ou sem doença ativa, que apresentam como seqüela incapacidades físicas (NOORDEEN, S.K. et al., 1992); observando-se claramente uma tendência de diminuição da doença, o que não ocorre nas Américas, onde o Brasil lidera em números de casos e em taxa de prevalência (Weekly Epidemiological Records-WHO, 1992). Para avaliar a situação da patologia no Brasil, podemos utilizar três índices epidemiológicos: coeficiente de prevalência (considerado alto: índice é 1/1000 habitantes), coeficiente de detecção (considerado alto 10/100.000 habitantes) e porcentagem de crescimento anual da doença.

Alarmante é a situação do hanseníase no Brasil, que ocupa o 2º lugar em número de casos no mundo, com um coeficiente de prevalência de 1,32/1.000 habitantes, e coeficiente de detecção de 20,31/100.000 habitantes. Os estados mais afetados são os da região Norte com coeficiente de prevalência de casos 3,3/1.000 habitantes e coeficiente de de detecção de 47,93/100.000 habitantes. Em número de casos a maior prevalência é da região Sudeste (66.324 casos), apesar de que em números relativos é superada por outras regiões. Da região Sudeste, o estado de São Paulo é aquele que tem o maior registro ativo em números absolutos (30.122). A porcentagem de crescimento anual é maior na região Nordeste com 11%, sendo que, na região Sudeste temos essa taxa em 3%.

Considerando-se a distribuição dos casos dentro do estado de São Paulo, observa-se que ela não é homogênea, com municípios onde não se detectou caso novo nos últimos anos, enquanto outros apresentam taxa de detecção acima de 100/100.000 habitantes. Na região de Ribeirão Preto, como em todo o Brasil, a

hanseníase é endêmica com coeficiente de prevalência de 2,03/1.000 habitantes e coeficiente de registro anual de casos novos de 26,78/100.000 habitantes. Esses dados nos mostram que desde a região mais rica até a mais pobre, a prevalência, detecção e porcentagem de crescimento anual da hanseníase é alta, configurando-se num dos nossos principais problemas de saúde pública. (Manual de Vigilância Epidemiológica, 1992; Informe Epidemiológico do SUS, 1993; Flávio L.F. Oliveira e Sandra A. Pinheiro, comunicação pessoal).

Diretamente dependente da imunidade mediada por células, a manifestação da infecção na hanseníase caracteriza-se por ter um largo espectro; num polo estão os doentes que desenvolvem resposta protetora ao bacilo e um controle efetivo da disseminação da doença (forma tuberculóide-TT), e no polo extremo, aqueles que falham em responder aos antígenos do *M. leprae*, o que resulta em doença multibacilar e disseminada (forma lepromatosa-LL). Entre esses polos, há pacientes com quadros intermediários: "borderline" tuberculóide (BT), "mid-borderline" (BB) e "borderline" lepromatoso (BL) (RIDLEY & JOPLIN, 1966; MYRVANG et al., 1973; BLOOM & GODAL, 1983). A correlação entre o espectro imunológico da hanseníase e populações de células T sugere que tal espectro reflita o balanço entre as populações ativadas pela micobactéria e as linfocinas produzidas por cada uma delas (RAMOS et al., 1989; BLOOM et al., 1992; KAPLAN, 1993).

Introdução

1 - Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase é uma das mais antigas doenças humanas, com sua origem perdida nas brumas da antigüidade. Segundo Browne (1985), a Índia e África são possíveis berços dessa moléstia. Algumas evidências de relatos históricos incluindo citações do Velho Testamento, permitem inferir quão velha é essa patologia.

Por vários séculos a estigmatizante doença não conheceu estudos mais aprofundados. Em 1873, Armauer Hansen descreveu um microorganismo em forma de bastonete, associando-o como agente etiológico da hanseníase. Apesar do hanseníase ser a primeira doença humana correlacionada com um patógeno bacteriano como agente etiológico, esse ainda não foi cultivado *in vitro* (REES, 1985).

Em 1919, MITSUDA descreveu um teste que consiste na injeção intradérmica de tecidos lepromatosos (hansenoma) autoclavados e emulsificados, cuja padronização é feita de acordo com a quantidade de bacilos. Ocorre induração no local da injeção que atinge seu diâmetro máximo em 3 a 4 semanas. Embora tal reação tenha uso difundido, sabe-se hoje que ela pouco auxilia no diagnóstico da hanseníase, permitindo entretanto avaliar a resposta imunitária celular dos indivíduos, inclusive normais, ao bacilo de Hansen.

RUBINO, em 1926, demonstrou uma nova reação de aglutinação de hemácias de carneiro formolizadas, específica para os soros de pacientes hansenianos; cuja descrição está contida no ítem 4 desta introdução.

Na década de 40, com início da quimioterapia no tratamento do hanseníase, novas perspectivas para o controle dessa moléstia foram abertas (BROWNE, 1985).

SHEPARD, 1960, proporcionou uma melhor avaliação da resistência a medicamentos, com seus trabalhos pioneiros de crescimento localizado do bacilo de Hansen em coxim-plantar de camundongos isogênicos.

Em 1971, KEICHHEIMER & STORRS observaram o crescimento do bacilo de Hansen em *Dasipus novemcinctus* (tatu-galinha), meses após a sua inoculação, o que possibilitou a obtenção de grande quantidade de bacilos, uma vez que as tentativas de cultivo *in vitro* até hoje foram infrutíferas.

Outros animais vem sendo utilizados como modelo experimental na hanseníase, com especial destaque ao "nude mouse" (COLSTON & HILSON, 1976; KOHSAKA et al., 1976; HASTINGS et al., 1980) e macaco Mangabey (*Cercocebus atys*)(MEYERS et al., 1981).

2 - Antígenos de *M. leprae* e resposta imunitária

O conhecimento das atividades imunológicas associadas com o componentes do *M. leprae* são fundamentais para compreensão do espectro da resposta imune. A análise imunoquímica do *M. leprae* e a compreensão da sua interação com o sistema imune a nível molecular tem sido prejudicadas pela impossibilidade de cultivo *in vitro* desse microorganismo.

A parede de *M. leprae*, após extração do arabinogalactano e ácidos micólicos resultou em um complexo peptidoglicano-proteína (PPC) que contém a maioria dos antígenos de célula T imunodominantes de *M. leprae*. Apesar de conter glicídeos, a resposta imunodominante a esse complexo é dependente do componente protéico, uma vez que, a proteólise aboliu o reconhecimento por células T (MELANCON-KAPLAN et al., 1988; MUTIS et al., 1989; MEHRA et al., 1989).

O *M. leprae* ao ser rompido produz um antígeno altamente aniônico e imunogênico, reconhecido como um polímero composto de lipopolissacáride chamado de lipoarabinomanana (LAM-B). Soro de pacientes com hanseníase, inclusive tuberculóides, contém altos títulos de anticorpos anti-LAM-B, sendo esses anticorpos principalmente do isotipo G. Os anticorpos anti-LAM-B são mais prevalentes que anticorpos anti-glicolípido, persistindo por um tempo mais longo no curso da

quimioterapia. Outras espécies de micobactérias contêm lipoarabinomanana relacionadas. Há um outro tipo de polímero principal contendo carboidrato, não antigênico, chamado LAM-A. Esse é desprovido de arabinose e é provavelmente uma lipomanana (BRENNAN, 1986; GAYLOR & BRENNAN, 1987).

O glicolípido fenólico-I (PGL-I) é um antígeno específico para o *M. leprae*, devido a sua porção glicídica, correspondendo a um trissacarídeo espécie-específico [O- (3,6-di-O-metil- β -D-glucopiranosil) -O- (14) - (3,6-di-O-metil- α -L-ramnopiranosil) -O- (12) - (3-O-metil- α -L-ramnopiranosil)]. Além do trissacarídeo, o antígeno é formado de um grupo fenol e porção lipídica (ptiocerol dimicocerosate) (HUNTER & BRENNAN, 1981; HUNTER et al., 1982; HUNTER & BRENNAN, 1983). Se faz necessário para o reconhecimento do PGL-I a presença do açúcar terminal 3,6-di-O-glucopiranosil, reconhecimento esse feito principalmente por anticorpos IgM. A produção de componentes sacarídicos sintéticos do PGL-I culminou com a síntese da estrutura completa do trissacarídeo, que ao ser ligado a uma albumina (NT-O-BSA), propiciou a composição de neoglicoproteínas com antigenicidade comparável a do PGL-I nativo (BRENNAN, 1986).

Pacientes hansenianos apresentam resposta do tipo humoral para o PGL-I e LAM-B (HUNTER et al., 1986). Entretanto esses antígenos contribuem também para o estado de ausência de imunidade mediada por células, evidente entre os pacientes virchovianos. O PGL-I induz supressão de linfócitos T por clones supressores (MEHRA et al., 1984), depressão da resposta de célula T *in vitro* (PRASAD et al., 1987), supressão da resposta oxidativa dos macrófagos (VACHULA et al., 1989) e liberação de citocinas de monócitos (SILVA et al., 1993). O antígeno LAM-B suprime a proliferação de células T *in vitro* (KAPLAN et al., 1987) e inibe a ativação de macrófagos mediada por interferon- γ (SIBLEY et al., 1988).

A célula micobacteriana contém um grande número de diferentes proteínas que estão sendo identificadas e estudadas em detalhe, e agrupadas de

acordo com características comuns como propriedades físicas e químicas, função ou localização, como por exemplo: lipoproteínas, "heat shock proteins", proteínas citoplasmáticas, proteínas ligadas a membrana, proteínas secretadas (WIKER & HARBOE, 1992).

Recentemente a clonagem do genoma do *M. leprae* e de outras micobactérias, com a triagem da biblioteca resultante através de anticorpos monoclonais, tem aberto novas perspectivas nesses estudos (YOUNG et al., 1985). A imunização com lisados de micobactérias, bem como a doença no homem, leva a produção de anticorpos que reconhecem seis antígenos protéicos do *M. leprae* (ENGERS et al., 1985; ENGERS et al., 1986). Os genes que codificam esses antígenos foram clonados (YOUNG et al., 1985; BRITTON et al., 1986; HUSSON et al., 1987), e as proteínas recombinantes produzidas, reconhecidas por anticorpos monoclonais, foram utilizadas para investigar a resposta de linfócitos T a infecção, verificando-se que a maioria dos antígenos estavam envolvidos nessa resposta (MUSTAFA et al., 1986; OTTENHOFF et al., 1986; BRITTON et al., 1986; LAMB et al., 1987).

Tais evidências de envolvimento de antígenos protéicos nas respostas humoral e mediada por células motivou o início de estudos mais detalhados dessas proteínas. Seus tamanhos moleculares correspondem a 70, 65, 36, 28, 18 e 12 kDa, sendo comprovadamente reconhecidos por células T e incluídos entre a família das proteínas de "stress". É válido a suposição de uma relação entre esses antígenos de "stress" e a resposta do hospedeiro à infecção, pois sabe-se que as proteínas de "stress" são alvos de resposta imune, podendo corresponder aos antígenos imunodominantes da micobactéria (YOUNG et al., 1988).

A capacidade de produzir proteínas de "stress" está implicada ainda na sobrevivência de agentes patogênicos no macrófago (CHRISTMAN et al., 1985; MORGAN et al., 1986). Postula-se que as proteínas de "stress" estejam entre os

principais antígenos disponíveis para a apresentação para o linfócito T (YOUNG et al., 1988). A presença de proteínas de "stress" entre os alvos principais de resposta imune em uma certa variedade de patógenos humanos, *Plasmodium falciparum* (BIANCO et al., 1986), *Schistosoma mansoni* (HEDSTROM et al., 1987) e *Coxiella burnetii* (VODKIN & WILLIAMS, 1988), sugere que a resposta a elas seja um componente geral da infecção, o que as tornam possíveis candidatas a vacina. Entretanto, a distribuição ubiquitária e a homologia entre proteínas de "stress" encontradas em bactérias e em células de mamíferos levam a hipótese de que elas possam desencadear fenômeno de auto-imunidade, por reatividade cruzada ou mimetismo molecular (LEWIN, 1988; YOUNG & ELLIOTT, 1989; BLOOM & JACOBS, 1989; GEORGOPOULOS & McFARLAND, 1993).

Recentemente vem sendo estudado o complexo 85, denominação dada ao antígeno protéico micobacteriano secretado que se liga a fibronectina, que é constituído de três proteínas: 85A (31 kDa), 85B (30 kDa) e 85C (31,5 kDa). Esse complexo foi isolado primeiramente de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG. Há dificuldades em se obter esse tipo de proteína secretado pelo *M. leprae*, uma vez que ele não é cultivado *in vitro*, entretanto foi relatada recentemente a clonagem de um gene que codifica uma proteína de *M. leprae* que se liga a fibronectina, estritamente relacionada com a proteína 85B (WIKER & HARBOE, 1992; THOLE et al., 1992).

A partir do complexo antigênico 85 de *M. bovis* BCG observou-se sua associação com células T protetoras na hanseníase, sugerindo que ele seja um antígeno imunodominante para a célula T e que compartilhe epitopos importantes com *M. leprae* (LAUNOIS et al., 1993). Altos níveis de anticorpos IgG contra os componentes 85A e 85B foram observados em pacientes virchovianos; eles diminuem com o tratamento quimioterápico (DROWART et al., 1991; PESSOLANI et al., 1991; ESPITIA et al., 1992; VAN VOOREN et al., 1992; DROWART et al., 1993).

3 - Ensaio para diagnóstico da hanseníase

O exame clínico estabelece o diagnóstico da hanseníase, na grande maioria dos casos. Em casos duvidosos, com manifestações sutis, o exame histopatológico da pele e/ou nervo periférico pode evidenciar a presença de bacilos álcool-ácido resistente e/ou fibrose endoneural e formação de granuloma com redução acentuada do número de fibras. A conveniência do diagnóstico precoce justifica as tentativas de padronização de métodos de investigação laboratorial da infecção pelo *M. leprae*.

ABE et al., em 1980, propuseram um teste de imunofluorescência para o *M. leprae*, que incluía uma etapa preliminar de absorção dos soros a serem testados com *M. bovis* cepa BCG e *M. vaccae* (FLA-ABS). O teste foi positivo em 100% dos pacientes baciloscopicamente positivo e em aproximadamente 80% dos pacientes tuberculóides. Sua aplicação na detecção de infecção subclínica foi proposta a partir da observação de reações positivas em algumas crianças aparentemente não infectadas, mas provenientes de áreas endêmicas e em alguns contatos domiciliares de hansenianos.

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido (CHO et al., 1983), utilizando o antígeno natural glicolípido fenólico I (PGL-I), considerado específico do *M. leprae*, ou seus sacarídeos análogos sintéticos. Este ELISA é o teste mais amplamente empregado com resultados comparados entre diversos laboratórios. Aproximadamente 98% dos pacientes virchovianos apresentam anticorpos anti-PGL-I, enquanto que esses anticorpos ocorrem de 50 a 60% dos pacientes tuberculóides (BRENNAN, 1986). Os títulos de anticorpos anti-PGL-I diminuem com o curso da quimioterapia em pacientes bacilíferos (CHATURVEDI et al., 1991; CHO et al., 1991). David et al. (1991), demonstraram haver correlação entre níveis dos anticorpos anti-PGL-I e a induração decorrente da reação de Mitsuda; em pacientes com pequena ou

nenhuma induração observavam-se altos títulos de anticorpos anti-PGL-I, e naqueles classificados como Mitsuda positivos (que 6 mm de induração) os títulos eram baixos.

Ainda utilizando o antígeno PGL-I foram feitas outras tentativas de sorodiagnóstico da hanseníase, aplicáveis em estudos epidemiológicos, correspondentes aos testes hemaglutinação passiva (PETCHCLAI et al., 1988), aglutinação com partículas de látex (WU et al., 1990) e aglutinação de partícula de gelatina (IZUMI et al., 1990).

Ensaio de inibição (ELISA e radioimunoensaio) utilizando anticorpos monoclonais, permitem identificar anticorpos séricos específicos para antígenos protéicos (35, 36 e 65 kDa) ou antígeno lipopolissacarídico da parede da micobactéria (KLATSER et al., 1985, SINHA et al., 1985; ASHWORTH et al., 1986; MWATHA et al., 1988; KLATSER et al., 1989).

Outro estudo sorológico da hanseníase refere-se a detecção de anticorpos específico para o complexo antigênico 85 de *M. bovis* BCG. Este complexo é separado por isoelectrofocalização, seguindo-se "immunoblot" revelado com soro de pacientes hansenianos. Avaliou-se a ocorrência de anticorpos durante o tratamento quimioterápico da doença (DROWART et al., 1991; 1992; 1993).

Através da amplificação de seqüência de DNA espécie-específica de poucos microorganismos a um nível detectável, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem ganhando importância na de detecção de *M. leprae* em amostras obtidas de pacientes hansenianos (GILLIS & WILLIAMS, 1991). É possível utilizar a PCR para o diagnóstico da hanseníase, a partir de diferentes tipos de amostras clínicas (SANTOS et al., 1993), e detectando-se portadores nasais de *M. leprae* em populações nas quais a hanseníase é endêmica, sustentando a teoria de uma ocorrência disseminada do *M. leprae* nessas populações (KLATSER et al., 1993).

4 - A Reação de Rubino

Trabalhando com reação de fixação de complemento para sífilis em hemácias de carneiro formolizadas, Rubino (1926a), verificou em um soro a rápida sedimentação dessas células e a rápida clarificação do sobrenadante. Não tendo observado anteriormente esse fenômeno, identificou a procedência do soro como de um paciente com hanseníase.

Repetindo o processo com o soro de outros pacientes hansenianos, pode novamente evidenciar a reação. Em soros controles notou raras sedimentações de hemácias formolizadas. Observou a seguir que os soros de pacientes não-hansenianos que sedimentavam aceleradamente hemácias formolizadas também sedimentavam hemácias naturais (sem formolização), enquanto que o mesmo não ocorria com os soros dos pacientes hansenianos. Fundamentado nesses resultados, Rubino formulou a hipótese de que a sedimentação de glóbulos formolizados devia-se a aglutininas específicas presentes no soro de pacientes com hanseníase (RUBINO, 1926a; 1926b).

Muitos estudos utilizando a técnica de Rubino foram realizados *a posteriori*. Marchoux & Caro (1928), em 10 soros de hansenianos, obtiveram 50% de positividade, sem a ocorrência de reações inespecíficas; Rubino (1929), em 38 soros de hansenianos, obteve 84% de positividade e, em 300 reações com soros controles obteve um caso positivo, sendo este suspeito do hanseníase. Luz (1929), conseguiu 44% de positividade sem a ocorrência de reações inespecíficas; Bier e Arnold (1935), encontraram um soro positivo em 945 soros controles. Numerosos trabalhos fundamentaram a idéia que a reação de Rubino tenha especificidade absoluta (MONACELLI, 1928; FIGUEIREDO, 1931; RUBINO, 1931a; ADANT, 1932; AMBROGIO, 1932; FURTADO & LEITE, 1932; HOMBRIA, 1932; LEPINE et al., 1932; TRAVASSOS, 1932; ZEVALLOS, 1932; SILVEIRA & MESQUITA, 1933; ROCA DE VIÑALS, 1934; IMBERT, 1936; BIER, 1936; BESTA & MARIANI, 1936; ACANFORA, 1939). A utilização de critérios inexatos, incluindo a não realização de contra-prova

com hemácias naturais, parece ser responsável pelo relato de inespecificidade da reação feita por alguns autores (CASTRO-PAULLIER & ERRECART, 1926; 1927; PELTIER, 1928; AMIES, 1930; SPANNEDA, 1932).

Várias foram as conclusões a partir dos estudos realizados sobre a reação de Rubino.

- Ela não se deve a doença concomitante; o fator responsável pela reação é termolábil, pois sua atividade diminui após aquecimento a 56°C por uma hora e desaparece após aquecimento a 60°C por 30 minutos (MARCHOUX & CARO, 1928));
- não depende da gravidade da infecção (LUZ, 1929);
- o fator específico responsável pela reatividade Rubino é eletivamente adsorvido por hemácias formolizadas, diferindo das heteroaglutininas que reagem com hemácias naturais ou formolizadas. Esta reação não tem sua intensidade ligada a duração da doença (RUBINO, 1931b);
- hemácias sensibilizadas com o fator consomem complemento (RUBINO, 1931c);
- não é do tipo precoce, na maioria dos casos só se torna positiva quando está implícito o diagnóstico (LEPINE et al., 1932);
- e não apresenta porcentagem de positividade diferente entre casos curados e não-curados (BESTA & MARIANI, 1936).

Foram feitas algumas suposições referentes às bases físicas da reação de Rubino. Rubino (1929) considerou que a reação corresponde a uma aglutino-sedimentação das hemácias formolizadas, de mesma natureza que as aglutinações microbianas e as soro-flocluações. Ambroggio (1932) atribuía a reatividade a um princípio existente no soro positivo que agiria sinergisticamente com eletrólitos, causando uma mudança de potencial, aumento da repulsão entre os glóbulos e conseqüente sedimentação. Benetazzo (1933) considerava a reação relacionada a alterações coloidais do plasma, pelo aumento absoluto das globulinas.

A despeito de fatos e conjeturas sobre a reação de Rubino, Bier, em 1936, referia-se ao fator responsável pela reação de Rubino como um "fator enigmático", com independência dos fatores imunológicos então conhecidos.

Em conseqüência de sua aplicação limitada no diagnóstico, houve um hiato a partir da década de 30 no estudo da reação de Rubino.

Almeida, em 1962, evidenciou a ausência de correlação entre positividade da reação e nível de anticorpos específicos para o *M. tuberculosis*, bem como a atividade anti-complementar dos soros de pacientes com hanseníase. Nesse mesmo ano, Curban apresentou uma completa revisão de literatura, e chamou a atenção para a importância do teste, não mais como sorodiagnóstico, mas como um campo inexplorado que poderia contribuir para a compreensão da resposta imunitária na hanseníase.

Almeida, em 1970, em ampla revisão sobre sorologia da hanseníase, refere-se ao fator responsável pela reação de Rubino como sendo uma γ -globulina, afirmando não existir correspondência entre o fator e os anticorpos fixadores de complemento que reconhecem antígenos de preparações de micobactéria de tuberculosos. Posteriormente, o mesmo autor demonstrou haver inibição da reação de Rubino quando processada na presença de algumas preparações de antígenos de *M. leprae* e de micobactérias atípicas (ALMEIDA & KWAPINSKI, 1974; ALMEIDA, 1978).

Silva et al. (1976a; 1976b; 1976c), estudando 76 pacientes com hanseníase (60 com forma virchoviana e 16, tuberculóide) verificaram reação de Rubino invariavelmente negativa entre os tuberculóides e positiva em 50% dos virchovianos. Em todos pacientes virchovianos havia hipergamaglobulinemia, estando os níveis de IgM aumentados apenas nos soros Rubino positivos. Fator reumatóide foi observado em pacientes virchovianos; sua presença não se associou a positividade da reação de Rubino. Anticorpos anti-tireoglobulina foram detectados exclusivamente no soro de pacientes Rubino positivos.

Opromolla et al., em 1982, estudaram a reação de Rubino em 178 pacientes hansenianos, correlacionando a positividade com a forma clínica e atividade da doença. Confirmaram a negatividade entre indivíduos tuberculóides e detectaram 9% de positividade entre os "borderline". Dentre os pacientes virchovianos verificaram 55% de positividade nos indivíduos com doença ativa e 6% nos considerados clinicamente inativos. Sugeriram que a reação de Rubino pudesse ser incluída nos critérios de cura da doença. O mesmo grupo (ARRUDA et al., 1983), ampliou sua casuística, confirmando a especificidade da reação de Rubino para a hanseníase e sugerindo haver uma relação inversa entre sua positividade e a resistência do hospedeiro ao *M. leprae*. Arruda et al. (1987), observaram em hansenianos que os níveis séricos de IgG, IgM não estavam correlacionados com a reação de Rubino, interpretaram tais dados como indicativos da independência entre a reação de Rubino e esses isotipos de imunoglobulinas. A aplicabilidade da reação de Rubino como critério de cura, anteriormente proposta (OPROMOLLA et al., 1982), foi afastada pela posterior detecção (ARRUDA et al., 1988) de positividade em 57% de pacientes clinicamente curados.

Garcia-Lima & Laure (1990), em uma correspondência enviada ao periódico "International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease", anunciaram, sem mostrar dados, o isolamento do fator Rubino, descrevendo-o como uma substância de PM 76 kDa e pl 5,7.

Após a década de 30, foram raros os estudos sobre a reação de Rubino. Enquanto isso, houve intenso progresso nas investigações sobre os mecanismos que levam ao estado de deficiência de resposta específica na hanseníase virchoviana. É nessa forma da doença que se detecta a maior proporção de reações de Rubino positivas (OPROMOLLA et al, 1982; ARRUDA et al., 1988), levando a hipótese de que o fator responsável pela reação possa estar envolvido na mediação das alterações da resposta imunitária próprias da hanseníase virchoviana.

Objetivo

Esse trabalho teve como objetivo a identificação e isolamento do fator presente no soro de pacientes hansenianos responsável pela sedimentação acelerada de hemácias de carneiro formolizadas (reação de Rubino).

Material e Métodos

1. Soros humanos: soros de pacientes hansenianos foram obtidos no Centro de Saúde Escola do Departamento de Medicina Social e do ambulatório da Disciplina de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica, ambos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Cada soro foi submetido à reação de Rubino, os positivos foram reunidos num "pool" único, que foi a fonte do "fator Rubino". "Pool" de soros de voluntários sadios estudantes da FMRP-USP, foi utilizado como controle negativo, depois de individualmente comprovada a negatividade da reação de Rubino. Todos os soros utilizados foram inativados (30 minutos a 56°C) e submetidos a reação de Rubino. Amostras de soros de pacientes virchovianos (20 soros Rubino positivos e 20 soros Rubino negativos) e de controles negativos (5 soros humanos normais) foram submetidas a quantificação de IgM através de método nefelométrico (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA).

2. Hemácias de carneiros: foram obtidas de animais sadios mantidos no Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, a partir de sangue colhido em solução de Alsever; os eritrócitos foram separados por centrifugação a 280g, lavados 3 vezes com solução salina 0,85%. Após lavagem as hemácias foram ressuspensas em volume adequado de solução salina 0,85% para obter-se 3,5 a 4,0 x 10⁶ hemácias/ml. A essas hemácias acrescentou-se formaldeído (concentração final 10%, v/v). Após um período de 48 horas a temperatura ambiente, as hemácias foram lavadas e novamente ressuspensas em solução salina 0,85%. Hemácia naturais foram obtidas pelo mesmo procedimento, excetuando-se o tratamento com formaldeído. A suspensão de hemácias formolizadas (3,5 a 4,0 x 10⁶ hemácias/ml) foi mantida a 4°C enquanto a suspensão de hemácias naturais foi recentemente preparada antes do uso (RUBINO,1931).

3. Reação de Rubino: realizada com todos os soros ou frações séricas oriundos de processos de precipitação e/ou cromatográficos, constituiu-se basicamente de um teste com hemácias de carneiro formolizadas e um contra teste com hemácias de carneiro naturais, processados através do contato do material a ser testado ou respectivo controle com as hemácias de carneiro (suspensão final de 7 a 8×10^5) por 1 hora a 37°C , num volume final de 1 ml. Cada soro ou fração sérica foi testada nas diluições finais de $1/2$ e $1/10$. Considerou-se positiva a reação que resultou em sobrenadante claro e hemácias formolizadas sedimentadas, e estando em suspensão as hemácias do contra-teste; quando o contra-teste proporcionou sobrenadante claro e hemácias sedimentadas, sugerindo a presença de heteroaglutininas, não se considerou o teste positivo (RUBINO, 1931). Quando frações séricas foram testadas, o meio foi suplementado com SHN (diluição final de $1/3$) para garantir a presença do fator sérico inespecífico (MARCHOUX & CARO, 1928) envolvido na reação de Rubino.

4. Anti-soros: os seguintes anti-soros e conjugados foram utilizados: soro de coelho anti-cadeia γ de IgG humana, anti-cadeia α de IgA humana, anti-cadeia μ de IgM humana (Behringwerke AG, Marburg, Germany), anti- α_2 -macroglobulina humana (Dako A/S, Glostrup, Denmark), anticorpo monoclonal (IgG₁) anti-proteína de 65 kDa de *M. leprae* (gentilmente cedido pelo Prof. Célio Lopes Silva, FMRP-USP), IgG de cabra anti-cadeia μ de IgM humana conjugado com peroxidase (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA), IgG de cabra anti-cadeia γ de IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA), IgG de carneiro anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase e IgG de coelho anti-IgG de camundongo (WILSON & NAKANE, 1978).

5. Dosagem de proteína: obtida por estimativa, onde estabeleceu-se uma relação entre a densidade óptica (DO, absorvância 280 nm) e concentração protéica (1 de DO = 1 mg de proteína/ml); não foram utilizadas para o cálculo de estimativa DOs inferiores a 1 e superiores a 2, ajustando-se assim as amostras para se obter leitura de DO entre 1 e 2.

6. Precipitação de soros com polietileno glicol (PEG): o "pool" de soros Rubino positivos foi submetido a precipitação seriada com polietileno glicol 4.000 nas faixas de concentração 0-5%, 5-12% e 12-20% (HAO et al., 1980). Em cada etapa de precipitação o material foi mantido por uma noite sob agitação constante, a 4°C e centrifugado a 10.000g por 10 minutos. Após ressuspensão em volume correspondente ao volume inicial de soro precipitado e ultradiafiltração contra PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2 em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO.,MA, USA), amostra de cada um dos precipitados obtidos foi submetida a reação de Rubino. As preparações Rubino positivas foram alíquotadas e conservadas a -80°C.

7. Atividade Rubino após digestão enzimática: amostras (0,5 ml) de precipitados PEG 5% (6 mg de proteína) obtidos de "pool" de soros Rubino positivos (teste) e de soros humanos normais (controle negativo), foram incubadas com pronase (2 mg) a 20°C (volume final 1ml). Os mesmos precipitados foram incubados com solução salina 0,85% em condições semelhantes às anteriores (controles da atividade Rubino). Após 24 horas de incubação as amostras foram suplementadas com soro humano normal (1/3, v/v) e testadas quanto a atividade Rubino.

8. Atividade Rubino na presença de EDTA: precipitado PEG 5% (diluição final 1/2) de "pool" de soros Rubino positivos ou de soros humanos normais (controle), suplementado com soro humano normal (1/3, v/v), e hemácias de carneiro

formolizadas (diluição final de 1/5) foram incubados na presença de EDTA (concentração final de 10 mM) (volume final 1ml) por 1 hora a 37°C. Procedeu-se a leitura das reações como descrito no ítem "Reação de Rubino".

9. Cromatografia de afinidade: amostras obtidas por precipitação de soro com PEG 5% foram submetidas a cromatografia de afinidade em 6 colunas diferentes: D-galactose-agarose (Pierce Chemical Co., Rockford Illinois, USA); D-manose-agarose (Pierce Chemical Co., Rockford Illinois, USA); goma de guar (D-galactomanana - preparada e gentilmente cedida pelo Prof. Renato Moreira da UFCE); proteína A-agarose (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden); jacalina-agarose (preparada em nosso laboratório e gentilmente cedida pela Prof. Laura Maria de Vasconcelos); e concanavalina A-agarose (Con A-Sepharose; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). Esta última resina foi submetida a cross-linking com glutaraldeído na presença de D-manose (SCHER et al., 1989). Utilizou-se PBS 0,01 M NaCl 0,5 M pH 7,2 para equilibrar as colunas e eluir o material não ligante. O material ligante a cada uma das 6 colunas, foi eluído com: solução de D-galactose 0,1 M (D-galactose-agarose); solução de D-manose 0,1 M (D-manose-agarose); seqüencialmente, solução de D-galactose 0,1 M e tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5 (goma de guar); tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5 (proteína A-agarose); solução de D-galactose 0,1 M (jacalina-agarose); solução de D-manose 0,1 M (Con A-Sepharose). Todas as frações (2 ml cada) das 6 cromatografias foram avaliadas pela absorbância 280 nm (DU®-70 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA). Constituíram-se dois "pools" de frações eluídas de cada cromatografia - não ligante e ligante. Cada um dos "pools" foi ultradiafiltrado contra PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2 em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO., MA, USA) e concentrado para o volume inicial (1,5 ml), sendo a seguir submetido a reação de Rubino conforme descrito no ítem "reação de Rubino".

Cromatografia de afinidade em Con A-Sepharose, quando empregada na seqüência de procedimentos necessários à purificação do fator Rubino, foi procedida aplicando-se uma preparação do precipitado PEG 5% (12 mg de proteína), eluindo-se o material não ligante com PBS (aproximadamente 40 ml) e ou material retardado com solução de D-manose 0,1 M em PBS 0,01 M NaCl 0,5 M pH 7,2 (aproximadamente 22 ml). Após regeneração da coluna (conforme recomendação do fabricante), o material não ligante foi recromatografado e o procedimento descrito, repetido. Recromatografias foram repetidas até obtenção de leitura zero de absorbância 280 nm nas frações eluídas com D-manose. Os materiais eluídos com D-manose foram reunidos em um "pool" único, ultradiafiltrados em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO.,MA, USA) contra Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 e concentrados para um volume de 2 ml.

10. Cromatografia de troca iônica: eluato D-manose (4,5 mg) proveniente da cromatografia de afinidade do precipitado PEG 5% em coluna de Con A-Sepharose, dialisado e ressuspendido em tampão A (Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0), foi submetido a cromatografia de troca aniônica (HIMMELOCH, 1971) através de sistema de média pressão (HPLC) em coluna Mono Q® HR 5/5 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), equilibrada e inicialmente eluída com 10 ml de tampão A, a temperatura ambiente, com fluxo de 1 ml.min⁻¹. Um gradiente (20 ml) de força iônica crescente (até 1 M de NaCl) foi utilizado na eluição do material retardado na coluna. O volume de cada fração coletada foi de 1 ml. A corrida foi monitorizada pela absorbância 280 nm (Variable Wavelength Monitor, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) e pela reação de Rubino, onde utilizou-se aproximadamente 10% de cada fração, conforme descrito no ítem 3. Os materiais eluídos que apresentavam reação de Rubino positiva foram reunidos em um "pool" único, ultradiafiltrados em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO.,MA, USA) contra PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2 e concentrados para um volume de 200 µl.

11. Cromatografia por filtração em gel: material (1,0 mg de proteína em 200 ml) Rubino positivo obtido por troca aniônica, foi submetido a filtração em gel em coluna Superose® 6 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), equilibrada e eluída com o mesmo tampão da amostra, fluxo de $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, coletando-se frações de 1 ml. A corrida foi monitorizada pela absorvância 280 nm (Variable Wavelength Monitor, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) e pela reação de Rubino, onde utilizou-se aproximadamente 10% de cada fração, conforme descrito no ítem 3. A coluna foi previamente calibrada (ANDREWS, 1965) com Blue dextran 2000 (BD, ~2.000 kDa) e proteínas de PM conhecidos (IgM purificada - IgM; 950 kDa; Sigma® Chemical Company, St. Louis.; USA; Tiroglobulina - TIR, 669 kDa; Ferritina - FER, 440 kDa; Aldolase - ALD, 158 kDa; Albumina Sérica Bovina - BSA, 67 kDa; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden).

12. Adsorção do fator Rubino a resinas com anticorpos imobilizados: Sepharose® ativada com brometo de cianogênio (1 ml cada) (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) foi conjugada a IgG de coelho anti-IgM humana ou a IgG de coelho anti- α_2 -macroglobulina (α_2 M) humana (ambas as IgG de coelho foram purificadas em coluna de proteína A imobilizada). Precipitados PEG 5% (~6 mg de proteínas) de "pool" de soros Rubino positivos e soros humanos normais foram submetidas a adsorção a esses anticorpos imobilizados. O material não adsorvido foi recuperado pela lavagem com PBS 0,01 M NaCl 0,5 M pH 7,2. O material ligado foi eluído com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5, sendo posteriormente neutralizado com Tris-HCl 2 M pH 8,0. Recromatografias do material não adsorvido foram repetidas até obtenção de leitura zero de absorvância 280 nm (DU®-70 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA) nas frações eluídas com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5. As frações do material não ligado e ligado obtidas de cada procedimento foram

coleccionadas em "pools", ultradiafiltradas em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO., MA, USA) contra PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2, concentradas para o volume inicial e testadas quanto a atividade Rubino. Amostras dos materiais não adsorvido e adsorvido a coluna de IgG de coelho anti-IgM humana imobilizada foram analisados por SDS-PAGE e "immunoblot", utilizando-se anticorpos de coelho anti-IgM humana, anti-IgG humana e anti- α_2 M humana.

13. Ensaio de inibição do fator Rubino contido no soro: precipitado PEG 5% de "pool" de soros Rubino positivos (diluição final 1/10) e hemácias de carneiro formolizadas (diluição final de 1/5) foram incubados na presença de IgM humana (50 μ g) (Sigma® Chemical Company, St. Louis.; USA), preparação de glicolípido fenólico-I (1 e 10 μ g) (PGL-I gentilmente cedido pelo Prof. Célio Lopes Silva, FMRP-USP), anticorpos de coelho anti-IgM humana, anti-IgG humana, anti-IgA humana ou anti- α_2 M humana (100 μ g) (volume final 1ml), por 1 hora a 37°C. Todas as frações testadas foram suplementadas com soro humano normal (1/3, v/v). Procedeu-se a leitura das reações como descrito no ítem "Reação de Rubino".

14. Ensaio de inibição do fator Rubino adsorvido em hemácias sensibilizadas: precipitado PEG 5% de "pool" de soros Rubino positivos (diluição final 1/2) foram submetidos a contato com hemácias formolizadas (diluição final 1/5) (volume final 1 ml) por 1 hora a 37°C, com intuito de sensibilizá-las com o fator Rubino. Após a incubação, as hemácias formolizadas sensibilizadas foram lavadas (três vezes) com PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2 e ressuspendidas nesse mesmo tampão, contendo os inibidores a serem testados (veja ítem 12); o meio foi então suplementado com SHN na diluição final 1/3, com intuito de fornecer o fator sérico inespecífico necessário para o desencadeamento da reação de Rubino (volume final 1 ml) (MARCHOUX & CARO, 1928). Controle positivo correspondeu a meio contendo PBS e SHN, e controle

negativo, apenas PBS. Procedeu-se a leitura das reações como descrito no ítem "Reação de Rubino".

15. Análise eletroforética e "immunoblot": as análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida (7 ou 10%) em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) ou em "Phast Gel Gradient Media" (8-25%) no "Phast System" (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) (LAEMMLI, 1970). As amostras foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,5 com 2% de SDS e em algumas circunstâncias, adicionado de mercaptoetanol a 3,5%. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada 30 minutos (80-120 mA, 200 V) no sistema BRL e 20 minutos no "Phast System" (10 mA, 100-250 V). Os géis foram corados com PhastGel Blue R (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) ou pelo método da prata (BLUM, 1987).

As transferências das bandas protéicas obtidas por SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose foram feitas em "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) ou "Phast System" (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). Quando se utilizou o sistema Mini V-8.10, a eletrotransferência foi feita em cuba contendo Tris-glicina 0,02 M pH 8,3 por 1,5 hora (85-135 mA, 150 V); quando se utilizou o Phast System, a eletrotransferência foi feita em câmara semi-úmida de transferência por 15 minutos (25 mA, 0-20 V). O material transferido foi colocado para reagir com anticorpos primários respectivamente: (1) IgG de coelho anti-cadeia μ de IgM humana, (2) soro de coelho anti- α_2 M humana, (3) soro de coelho anti-albumina humana e (4) IgG monoclonal de camundongo anti-"heat shock protein" 65 kDa de *M. leprae*. Seguiu-se incubação com anticorpo anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado a peroxidase. Em alguns procedimentos o "immunoblot" foi revelado diretamente com IgG de cabra anti-cadeia γ de IgG humana ou anti-cadeia μ

de IgM humana. A reação antígeno-anticorpo foi detectada com diaminobenzidina (DAB) (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA) na presença de peróxido de hidrogênio 30 volumes (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA).

16. Análise estatística: os resultados obtidos nos diversos grupos foram comparados pelo teste "t" de Student ($p < 0,05$) e pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

Resultados

1. Algumas características do fator Rubino

Soros Rubino positivos colecionados em um "pool" foram submetidos a precipitação seriada com diferentes concentrações de polietileno glicol (PEG), estabelecendo-se que no precipitado obtido com a concentração final de 5% de PEG a atividade Rubino era recuperada, passando a constituir etapa inicial da purificação do componente responsável pela positividade da reação de Rubino (fator Rubino).

Com a finalidade de investigar algumas características do fator Rubino, incubou-se o precipitado PEG 5% de "pool" de soros Rubino positivos com pronase por 24 horas, ou com o quelante EDTA. A reação passou a ser negativa após o tratamento enzimático, mantendo-se positiva no respectivo controle (precipitado PEG 5% incubado apenas com salina). A presença do quelante EDTA não alterou a atividade Rubino do precipitado PEG 5%.

O precipitado PEG 5% de "pool" de soros Rubino positivos também foi submetido a cromatografia de afinidade em colunas com açúcares imobilizados (D-galactose e D-manose), de goma de Guar (D-galactomanana), de proteína A imobilizada e lectinas imobilizadas (jacalina e concanavalina A). Dentre os "pools" de frações ligantes nas diferentes cromatografias, apenas o obtido da coluna de concanavalina A (Con A) imobilizada foi positivo quanto a atividade Rubino. Nas demais cromatografias, a atividade foi recuperada no "pool" de frações não ligantes.

Esse conjunto de resultados indicam que o fator Rubino tenha natureza protéica, não dependa de cálcio e magnésio para efetuar a reação, seja glicosilado e, provavelmente, não corresponda a IgG, IgA ou a uma lectina com especificidade para os açúcares imobilizados testados.

2. Isolamento do fator Rubino

A etapa inicial da purificação do componente responsável pela positividade da reação de Rubino correspondeu ao tratamento do "pool" de soros de

pacientes Rubino positivos com PEG 5%, que proporcionou a precipitação de cerca de 10% das proteínas, dentre as quais o fator Rubino.

Com base na observação de que o fator Rubino interage com Con A-Sepharose, 1,5 ml (12 mg) de precipitado PEG 5% foram aplicados em 8 ml de resina; cerca de 20% da proteína recuperada (~86%) foi retardada na primeira cromatografia (figura 1). Recromatografia do material não ligante proporcionou mais 2 mg de material retardado. Na segunda recromatografia do material não retardado, já não foi detectada proteína no eluato D-manose. Um total de 4,5 mg de proteína foram obtidas através do procedimento descrito.

O material ligante à Con A-Sepharose (4,5 mg) foi submetido a troca aniônica através de cromatografia de média pressão em coluna Mono Q® HR 5/5. A atividade Rubino foi recuperada no material eluído com 40% do gradiente salino (0 a 1 M de NaCl), que continha cerca de 30% do material aplicado (1,3 mg de proteína) (figura 2). Tentativas de otimizar o gradiente salino, tais como lentificá-lo ou iniciá-lo a partir de fase isocrática com 0,2 M de NaCl, não melhoraram a separação do material ativo.

Material Rubino positivo (1 mg) obtido da cromatografia de troca aniônica (frações 20 e 21), foi submetido a gel filtração em coluna Superose® 6 HR 10/30, equilibrada e eluída com PBS. A atividade Rubino foi recuperada nas frações 10 e 11 (juntas continham 200 µg de proteína), correspondentes ao pico de máxima absorvância registrado, e cuja eluição é coincidente com a da IgM humana (figura 3). Esse material foi denominado **preparação Rubino**.

O "pool" de soros humanos normais (SHN) submetido à mesma seqüência de procedimentos forneceu perfis cromatográficos próximos aos obtidos com o "pool" de soros Rubino positivos (dados não mostrados). Frações obtidas a partir do "pool" SHN correspondentes àquelas que resultaram na preparação Rubino, proporcionaram a **preparação controle**.

As preparações Rubino e controle foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% em condições dissociantes (SDS-PAGE) (Figura 4, pista **a**). Em ambos os casos observou-se material de alto PM no alto do gel, não sendo detectados componentes que migrassem no gel. Eletroforese das mesmas amostras (SDS-PAGE 10%), em condições redutoras (figura 4, pista **b1**), revelou componentes cujas migrações correspondem a tamanhos moleculares de 70, 65, 55 e 25 kDa, sendo as três últimas pouco visíveis na reprodução fotográfica do gel.

A preparação Rubino submetida a eletroforese foi transferida para nitrocelulose, seguindo-se revelação com anticorpos diversos. Conjugado anti-IgM humana revelou banda cujo índice de migração eletroforética coincide com o de cadeia μ (70 kDa; figura 4, pista **b2**). Anticorpos anti- α_2 M, anti-albumina humana e anti-"heat shock protein" (hsp) 65 kDa de *M. leprae* nada revelaram nessa preparação (dados não mostrados).

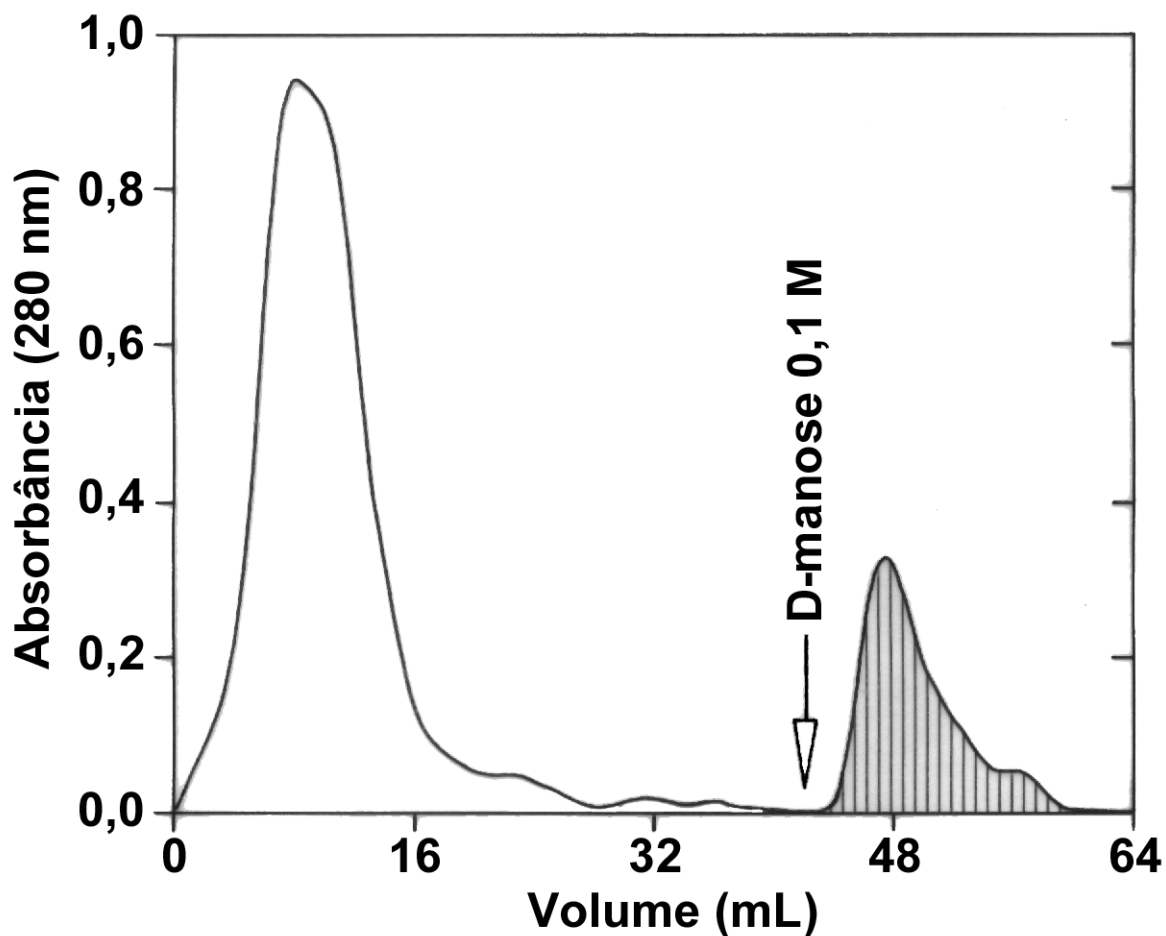


FIGURA 1: Cromatografia do precipitado PEG 5% (12 mg) do "pool" de soros Rubino positivos, em coluna de concanavalina A imobilizada (leito de 8 ml), equilibrada com PBS 0,01 M NaCl 0,5 M pH 7,2, a 4°C. Após aplicação da amostra, 42 ml do mesmo tampão foram utilizados para retirar o material não ligante. O material ligante foi eluído com 20 ml de solução de D-manose a 0,1 M em PBS. Foram coletadas frações de 2 ml e cada uma delas teve determinada a absorbância a 280 nm (λ). A recuperação total do material aplicado foi de aproximadamente 86%. O material adsorvido e eluído com D-manose corresponde a 20% do material recuperado.

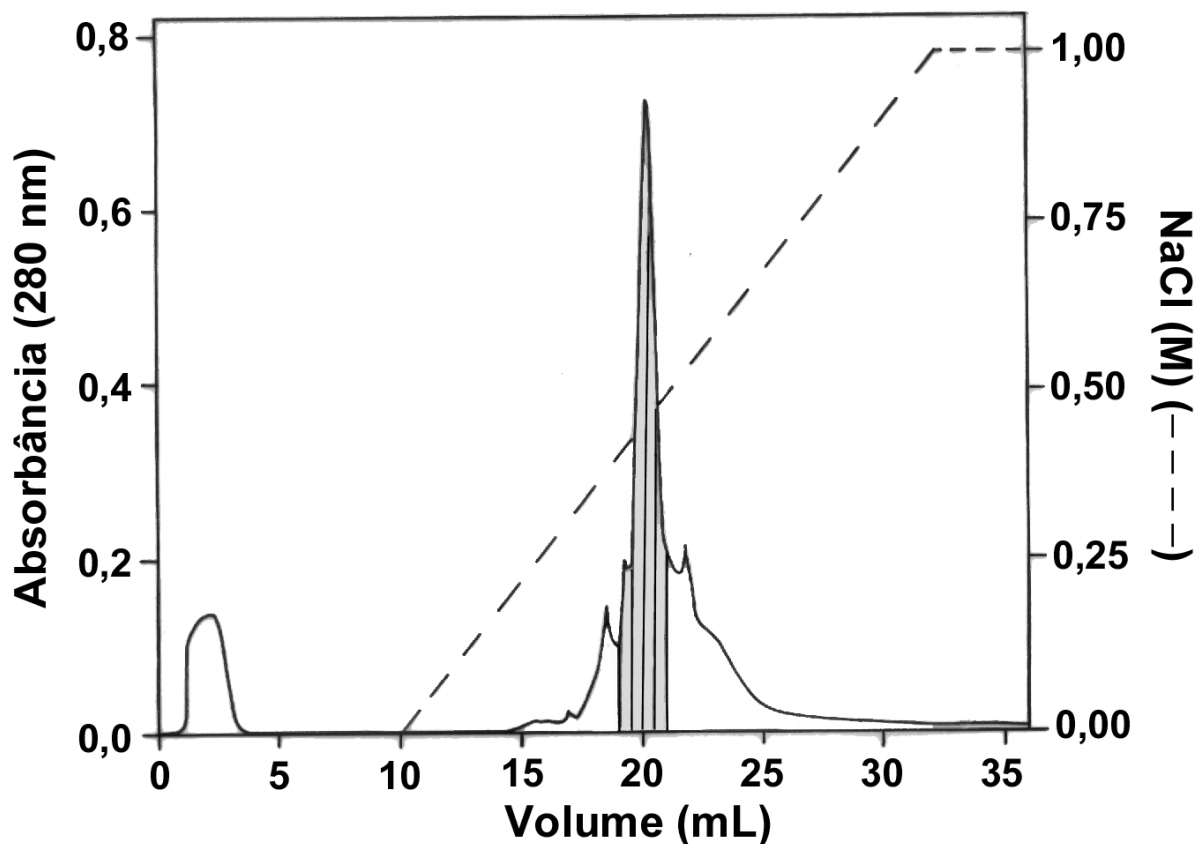


FIGURA 2: Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q[®] HR 5/5 (sistema HPLC), do material ligante de concanavalina A imobilizada (4,5 mg de proteína). A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com 10 ml de tampão A (Tris-HCl 0,02 M pH 8,0); fluxo de 1 ml.min⁻¹, à temperatura ambiente. O material retardado foi eluído através de gradiente (20 ml) de 0 a 1 M de NaCl em tampão A. A cromatografia foi monitorizada pela absorbância a 280 nm. De cada fração coletada (1 ml) foram retirados 100 µl para determinação da atividade Rubino. As hachuras indicam as frações com atividade Rubino positiva; nessas frações foram eluídas 30% do material aplicado.

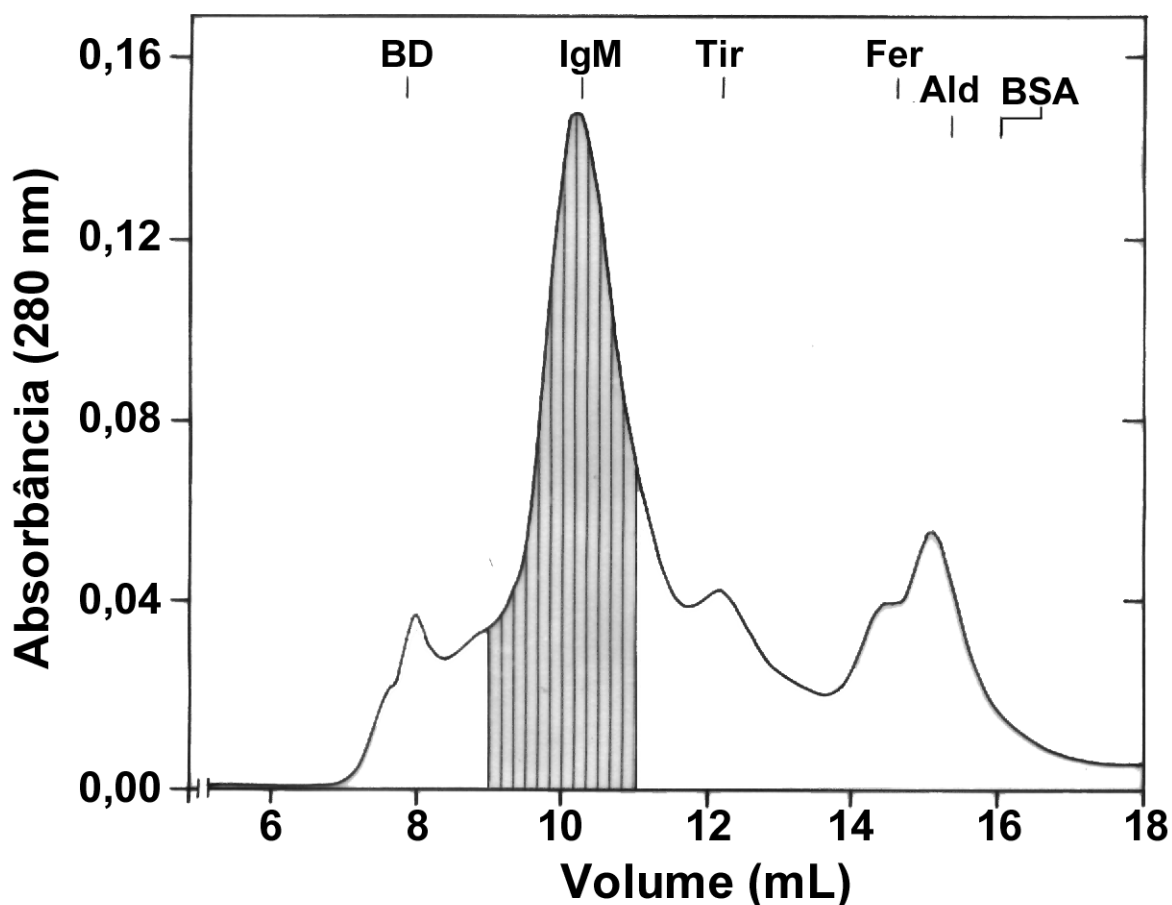


FIGURA 3: Filtração em gel (sistema HPLC) em coluna Superose[®] 6 HR 10/30, do material Rubino positivo (1 mg) obtido por cromatografia de troca aniônica da fração ligante de concanavalina A. Coluna equilibrada e eluída com PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2; num fluxo de 0,1 ml.min⁻¹, à temperatura ambiente. A cromatografia foi monitorizada pela absorbância a 280 nm. De cada fração coletada (1 ml) foram retirados 100 ml para determinação da atividade Rubino. As hachuras indicam as frações com atividade Rubino positiva; nessas frações foram eluídas 200 mg de proteína.. A coluna foi previamente calibrada com marcadores de PM conhecidos: BD, azul de dextran (~2.000 kDa); IgM, imunoglobulina M (950 kDa); TIR, tiroglobulina (669 kDa); FER, ferritina (440 kDa); ALD, aldolase (158 kDa); BSA, albumina sérica bovina (67 kDa), cujos volumes de eluição estão assinalados na figura.

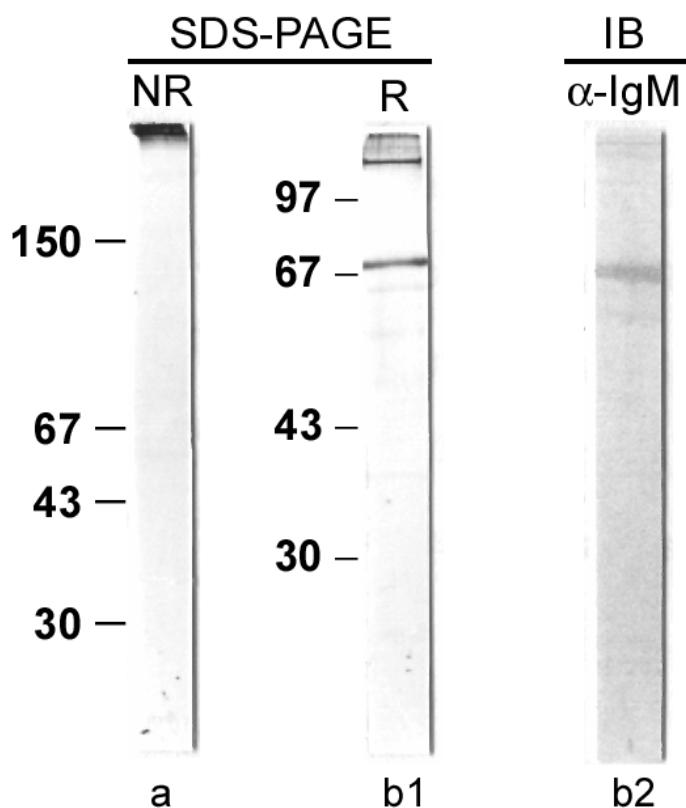


FIGURA 4: SDS-PAGE (pistas **a** e **b1**) e "immunoblot" (pista **b2**) da preparação Rubino positiva obtida através de processos seqüenciais de precipitação com PEG, cromatografia de afinidade em Con A-Sepharose (figura 1), cromatografia de troca iônica em Mono Q® HR 5/5 (figura 2) e filtração em gel em Superose® 6 HR 10/30 (figura 3). Pista **a**: preparação Rubino não reduzida (NR); gel (7%) corado pelo método da prata. Pista **b1**: preparação Rubino reduzida (R) pelo tratamento com mercaptoetanol; gel (10%) corado pelo método da prata. Pista **b2**: preparação Rubino reduzida (R) pelo tratamento com mercaptoetanol, separada em gel 10% e transferida para nitrocelulose; seguiu-se revelação com anticorpos de coelho anti-IgM humana conjugado a peroxidase. A migração eletroforética de proteínas de PM conhecidos está indicada na figura.

3. Evidências adicionais da correspondência do fator Rubino com IgM, e ausência de correspondência com α_2 M.

Estando IgM e, possivelmente, α_2 M presentes no material obtido nas etapas iniciais de purificação do fator, investigou-se a interação do fator Rubino com anticorpos anti-IgM ou anti- α_2 M imobilizados. A atividade foi recuperada no material da preparação Rubino retido na coluna de IgG de coelho anti-IgM humana imobilizada, e no material não adsorvido à resina com IgG de coelho anti- α_2 M humana imobilizada (tabela 1). Dessa forma, pôde-se demonstrar que o material da preparação Rubino reconhecido pelo anticorpo anti-IgM humana correspondia ao responsável pela atividade Rubino. Foi negativa a reação de Rubino das frações obtidas pela cromatografia da preparação controle nas mesmas resinas (dados não mostrados).

TABELA 1: Fator Rubino é adsorvido em coluna com anti-IgM humana imobilizada mas não em coluna com anti- α_2 M humana imobilizada.

Colunas	Reação de Rubino com material	
	Não Adsorvido	Adsorvido
IgG anti-IgM humana	negativa	positiva
IgG anti- α_2 M humana	positiva	negativa

Material Rubino positivo obtido pela precipitação com PEG 5% (~6 mg de proteína) de soros de pacientes foi submetido a cromatografia em colunas de IgG de coelho anti-IgM humana ou anti- α_2 M humana imobilizadas. Os materiais não adsorvidos foram eluídos com PBS 0,01 M NaCl 0,5 M pH 7,2. O material adsorvido foi eluído com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5 e neutralizado com tampão Tris-HCl 2 M pH 8,0. Recromatografias do material não adsorvido foram repetidas até obtenção de leitura de absorbância 280 nm zero nas frações eluídas com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5. As amostras, após concentração e diálise com PBS 0,01 M NaCl 0,15 M pH 7,2, foram submetidas a reação de Rubino, de acordo com descrição feita em Material e Métodos. Quando os mesmos procedimentos foram utilizados com material precipitado PEG 5% de soro de indivíduos saudáveis, obteve-se reação negativa em todos os eluatos.

Os materiais não adsorvido e adsorvido obtidos da cromatografia do precipitado PEG 5% Rubino positivo em coluna de anti-IgM humana, foram submetidos a eletroforese em condições redutoras. Cada um desses materiais apresentou 3 bandas mais proeminentes, cujas migrações correspondem ao PM de 60, 50 e 25 kDa no material não adsorvido (figura 5 pista A1) e 70, 50 e 25 kDa no material adsorvido (figura 5, pista A2). Os materiais separados por eletroforese foram transferidos para nitrocelulose, revelando-se a banda de 70 kDa do material adsorvido com anticorpos anti-cadeia μ (figura 5, pista B2); os componentes de 50 kDa de ambas os materiais foram reconhecidos por anticorpos anti-cadeia γ (figura 5, pistas C1 e C2). No material não adsorvido, duas bandas de migração eletroforética correspondente a proteínas de 85 kDa e > 97 kDa foram reconhecidas por anticorpos anti- α_2 -macroglobulina (figura 5, pista D1).

A reação de Rubino foi inibida quando soro positivo e hemácias de carneiro formolizadas foram incubados na presença de anticorpos de coelho anti-IgM humana; não houve inibição na presença de anticorpos com outras especificidades, incluindo anti- α_2 M humana. IgM obtida de soro normal não competiu com o fator Rubino no desenvolvimento da reação. Resultados coincidentes foram obtidos quando os mesmos anticorpos ou IgM foram colocados em contato com o fator Rubino já ligado a hemácias de carneiro formolizadas — apenas anticorpos anti-IgM inibiram a sedimentação desencadeada a partir da suplementação do meio com soro normal. A hipótese de que a IgM correspondente ao fator Rubino fosse específica para PGL-I motivou a tentativa de inibição da reação de Rubino por esse antígeno do *M. leprae*. Nenhuma das concentrações utilizadas (1 e 10 mg/ml) teve efeito sobre a reação (tabela 2).

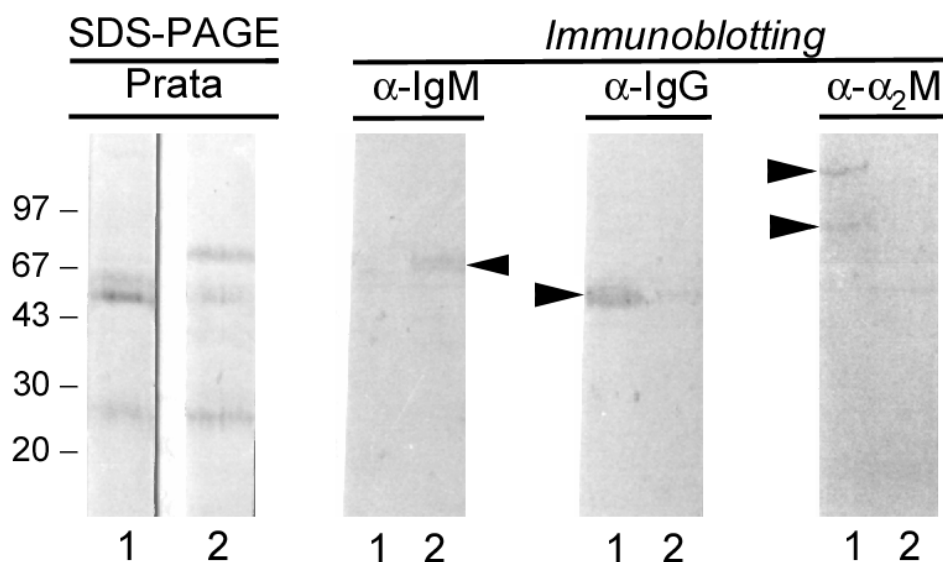


FIGURA 5: Análise eletroforética e "immunoblot" das amostras obtidas a partir do precipitado PEG 5% Rubino positivo submetido a cromatografia em coluna de IgG de coelho anti-IgM humana imobilizada. Utilizou-se o 8 a 25% Phast Gel Gradient Media em condições dissociantes. As amostras, reduzidas pelo mercaptoetanol, correspondem a material não adsorvido (pistas 1) e adsorvido (pistas 2) ao anticorpo anti-IgM. A - SDS-PAGE corado pelo PhastGel Blue R (comassie blue). B - "Immunoblot" revelado por conjugado anti-IgM humana. C - "Immunoblot" revelado por conjugado anti-IgG humana. D - "Immunoblot" revelado por anticorpo coelho anti- α_2 -macroglobulina humana e conjugado anti-IgG de coelho. A migração eletroforética de proteínas de PM conhecidos está indicada na figura.

TABELA 2: Teste de inibição da reação de Rubino por preparações de anticorpos de coelho, de proteína sérica humana e de antígeno de **M. leprae**.

Inibidores testados		Reação de Rubino
Anticorpos de coelho (100 µg)	anti-IgG humana	positiva
	anti-IgA humana	positiva
	anti-IgM humana	negativa
	anti- α_2 M humana	positiva
Proteína sérica humana (50 µg)	IgM	positiva
Antígeno do M. leprae	PGL-I (1 µg)	positiva
	PGL-I (10 µg)	positiva

O efeito de preparações de anticorpos de coelho, de proteína sérica humana e antígeno de **M. leprae** sobre a reação de Rubino foi testado obedecendo a dois protocolos:

- (a) o contato (1 h, 37°C) de hemácias de carneiro formolizadas (concentração final 5%) com soro Rubino positivo (diluição final 1/10) foi feito na presença do inibidor testado, em PBS (volume final 1 ml)
- (b) procedeu-se o contato das hemácias de carneiro formolizadas (concentração final 5%) com soro Rubino positivo (diluição final 1/2), em PBS (volume final 1 ml) durante 1 h a 37°C; no final desse período as hemácias foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com PBS (volume de cada lavagem correspondente a 10 vezes o volume de hemácias). Às hemácias sensibilizadas lavadas adicionaram-se soro humano normal (diluição final 1/3) e o inibidor testado (quantidades indicadas), diluídos em PBS (volume final 1 ml); seguiu-se contato de 1 h a 37°C.
- Ambos os procedimentos proporcionaram leituras coincidentes da reação de Rubino frente a cada inibidor testado.

4. Dosagem de IgM sérica dos soros testados

A determinação dos níveis séricos de IgM humana em 40 soros de pacientes virchovianos (20 Rubinos positivos e 20 Rubino negativos) e 5 soros humanos normais, estão ilustrados na figura 6, demonstrativa de que 50% dos virchovianos Rubino negativos e 35% dos Rubino positivos têm níveis de IgM superiores ao limite da normalidade (61 a 248 mg/dl). Não há diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos de IgM dos indivíduos Rubino positivos e negativos.

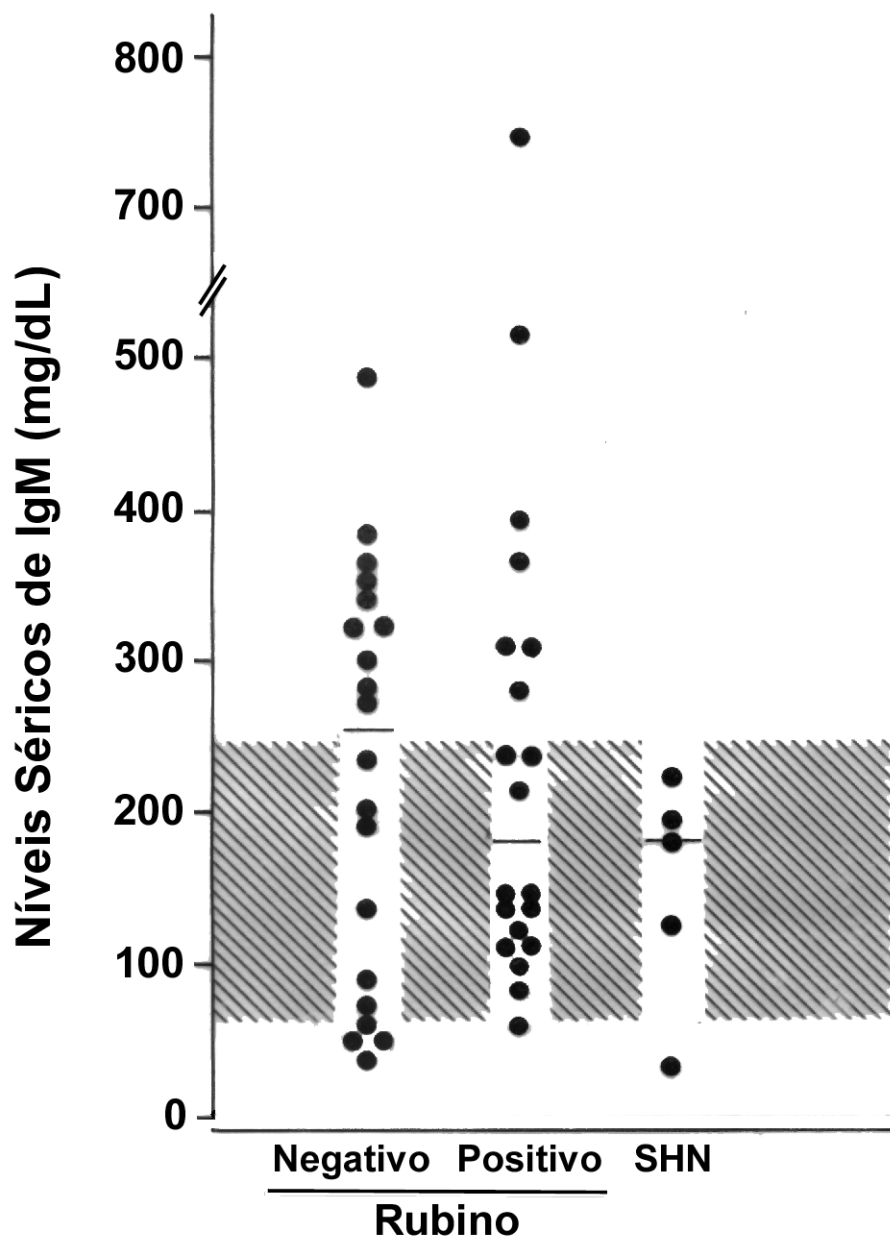


FIGURA 6: Níveis séricos de IgM de dois grupos de pacientes hansenianos virchovianos (40 soros - 20 Rubino negativos e 20 Rubino positivos), e de indivíduos sadios (5 soros). As hachuras indicam a faixa de normalidade e os traços horizontais a mediana de cada grupo.

Discussão

Neste trabalho, descreve-se o isolamento do fator responsável pela positividade da reação de Rubino a partir de soro de pacientes com hanseníase virchoviana e apresentam-se evidências da correspondência entre esse fator e imunoglobulina M. Dentre as evidências merecem destaque: 1) o material ativo purificado tem perfil eletroforético que coincide com o da IgM humana, sendo a banda correspondente a cadeia pesada (70 kDa) reconhecida por soro anti-cadeia μ ; 2) o fator Rubino é adsorvido em coluna de IgG de coelho anti-IgM humana imobilizada; recuperando-se a atividade no material retardado na coluna; e 3) a atividade Rubino de soro de pacientes hansenianos é abolida pela adição ao meio da reação de anticorpos anti-IgM humana. Verificou-se ainda não ser a IgM correspondente ao fator Rubino específica para o glicolípido fenólico-I de *M. leprae*.

A escassez de estudos sobre a reação de Rubino, deixava inicialmente abertas numerosas possibilidades em relação à natureza do fator responsável pelo fenômeno, não podendo nem mesmo se inferir se seria correspondente a um componente do hospedeiro ou do parasita. Nos trabalhos de isolamento verificou-se inicialmente a recuperação da atividade no precipitado PEG 5%; no material retardado na coluna de concanavalina A-Sepharose, e eluído com D-manose; no material retido em coluna Mono Q e eluído no gradiente salino e; no volume de eluição de proteínas de 950 kDa por filtração em gel. Essas características do fator Rubino são retrospectivamente identificadas como coincidentes com características da IgM humana. IgM é precipitada em concentrações de 10% de PEG (HAO et al., 1980), interage com concanavalina A (HARRIS & ROBSON, 1963; LEON, 1967; WEINSTEIN et al., 1972), é retardada em cromatografia de troca aniônica (SAMPSON et al., 1984). Uma segunda proteína sérica — a α_2 -macroglobulina — compartilha algumas dessas características (STAHLER et al., 1988; SILVESTRINI et al., 1989). A seqüência de procedimentos acima citadas (precipitação e cromatografias) proporcionou preparação cuja análise eletroforética, em condições redutoras, revelou uma banda proeminente

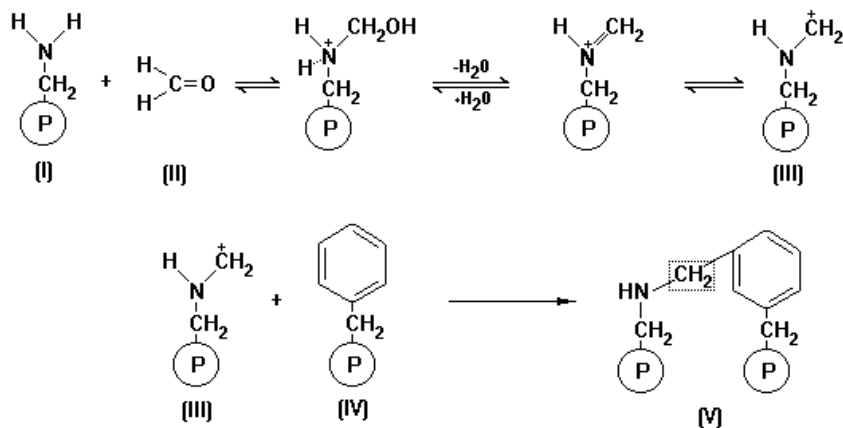
de 70 kDa, que foi reconhecida no "immunoblot" por soro anti- μ , e outras menos intensamente coradas 65, 55 e 25 kDa (figura 4, pista b1 e b2), tornando IgM forte candidata a responsável pela atividade Rubino.

A constatação de que fator Rubino se liga em coluna com IgG de coelho anti-IgM humana, sendo eluída com tampão ácido, indicou correspondência entre fator Rubino e IgM; excluiu-se a participação de α_2 M na determinação da atividade Rubino pelo fato de que α_2 M só foi detectada por "immunoblot" no material não adsorvido a coluna de anti-IgM, o qual era destituído de atividade. Confirmação adicional foi obtida com a não adsorção do fator Rubino em coluna com com IgG de coelho anti- α_2 M humana.

A partir da observação de que hemácias de carneiro formolizadas obtidas de reação de Rubino positiva, mesmo depois de lavadas continuavam a sedimentar aceleradamente quando colocadas em meio contendo soro humano normal, Marchoux e Caro (1928) propuseram que a reação era determinada por um fator específico do soro de certos pacientes hansenianos, que se liga eletivamente a hemácia de carneiro formolizada, e de um fator inespecífico, presente em todo soro normal. As observações de Marchoux e Caro, fundamentaram o ensaio onde tentou-se impedir a sedimentação acelerada das hemácias sensibilizadas, com anticorpos de coelho de diferentes especificidades. Tal hemossedimentação foi inibida quando anticorpos de coelho anti-IgM humana foram adicionados ao meio da reação, fato não observado quando foram utilizados anticorpos de coelho com outras especificidades (incluindo anticorpos anti- α_2 M humana). Resultados coincidentes foram obtidos quando os anticorpos de coelhos foram adicionados ao soro de pacientes previamente ao contato com as hemácias formolizadas. A partir desses resultados de inibição da reação e daqueles de adsorção do fator em coluna com anticorpos imobilizados, determinou-se que o fator Rubino correspondia a IgM sérica.

A correspondência entre o fator Rubino e IgM demonstrada no presente trabalho, e a descrição, por diversos autores (TAMBLYN & HOKAMA, 1969; BULLOCK et al., 1970; GUPTA et al., 1978; SAHA et al., 1978; AHMED et al., 1983), de níveis elevados de IgM sérica total em pacientes hansenianos, levaram a hipótese de estarem correlacionadas a positividade da reação e o aumento de IgM total; a correlação não foi observada (figura 6), confirmando o achado de Arruda et al. (1987) e contrapondo-se a descrição de Silva et al. (1976b). A observação de que 50% dos pacientes virchovianos Rubino negativos apresentam níveis elevados de IgM sérica total e 65% dos pacientes virchovianos Rubino positivos apresentam níveis normais de IgM sérica total, sugere que o aumento dos níveis de IgM envolva moléculas com especificidades diferentes da apresentada pelo fator Rubino, e que o atendimento ao requisito mínimo de fator sérico para sedimentar hemácias formolizadas não seja dependente do aumento dos níveis de IgM sérica total.

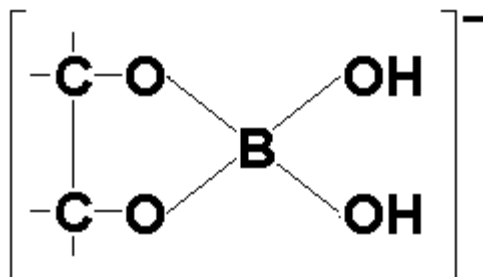
Supõe-se que o fator Rubino seja específico para determinado antígeno micobacteriano ou auto-antígeno, reagindo também com estrutura presente na superfície da hemácia formolizada. As modificações que ocorrem na hemácia submetida ao tratamento com formaldeído, basicamente são alquilação e "cross-linking" dos glicolípídeos e proteínas de membrana, via grupos amínicos (Esquema 1) (MEANS, 1977; MEHTA, 1980).



Esquema 1: Em pH básico ou neutro, grupos amínicos de proteínas (I) reagem, de modo reversível com formaldeído (II), num processo de alquilação que leva à formação do íon de carbono (III). Este íon sofre ataque nucleofílico de centros com alta densidade eletrônica, como grupos aromáticos (IV) ou o grupo tiol, presentes nas cadeias laterais de aminoácidos, formando ponte metilênica entre dois aminoácidos (V). Na superfície de células tratadas com formaldeído, há formação de uma rede de pontes metilênicas, o que confere aumento da resistência e do tempo de conservação dessas células.

Desconhece-se a eventual repercussão de tais modificações sobre a antigenicidade da hemácia. Entretanto é possível conjecturar que o estabelecimento da rede de pontes metilênicas entre aminoácidos e/ou açúcares da superfície da membrana proporcionem neo-estruturas com epitopo de conformação semelhante a do imunógeno que desencadeou o aparecimento da IgM correspondente ao fator Rubino. Como descrito anteriormente, as hemácias de carneiro formolizadas obtidas de reação de Rubino positiva, mesmo após serem lavadas continuavam a sedimentar aceleradamente. Uma observação preliminar, não mostrada no presente trabalho, sugere que o fator Rubino tenha especificidade para antígeno carboidrato: o fator é

eluído da superfície de hemácias formolizadas por tampão borato 0,1 M pH 6,5. Íons borato ligam-se a açúcares formando complexos (Esquema 2) (KABAT & MAYER, 1961) podendo conseqüentemente deslocar o fator Rubino supostamente adsorvido a antígeno carboidrato da superfície da hemácia.



Esquema 2.

Correspondência entre o antígeno reconhecido pelo fator Rubino e o glicolípido fenólico-I (PGL-I) de *M. leprae* foi sugerida por: a) a porção carboidrato do PGL-I é o determinante antigênico da molécula (YOUNG & BUCHANAN, 1983; CHO et al., 1983); b) PGL-I é um antígeno específico do *M. leprae* (HUNTER & BRENNAN, 1981; HUNTER et al., 1982); c) PGL-I é reconhecido predominantemente por IgM (mais de 80% dos anticorpos específicos) (YOUNG et al., 1984). Entretanto, PGL-I, utilizado nas concentrações finais de 1 e 10 µg/ml, não inibiu a reação de Rubino (tabela 1).

O fator Rubino pode ser um auto-anticorpo. Fenômenos de auto-imunidade na hanseníase podem ser decorrentes da resposta do hospedeiro a proteínas de "stress" do *M. leprae*, altamente conservadas na escala evolutiva, levando ao reconhecimento de estruturas próprias (YOUNG & ELLIOT, 1989). A ativação policlonal de linfócitos B, outro fenômeno observado na hanseníase (RAMOS

et al., 1989), também pode levar a formação de auto-anticorpos, dentre os quais a IgM correspondente ao fator Rubino.

No presente trabalho, houve tentativas de avaliação quantitativa da atividade Rubino, através da reação utilizando-se duas diferentes diluições do soro, 1/2 e 1/10. Dentre todos os soros testados, 34 (27,4%) produziram reação positiva em ambas as diluições e 14 (11,3%) apenas na diluição de 1/2. Também foram infrutíferas as tentativas de quantificação da atividade Rubino das frações séricas obtidas por procedimentos cromatográficos; a reação só se desenvolveu quando se utilizaram frações não diluídas. Uma segunda tentativa de quantificar a atividade Rubino correspondeu ao tempo necessário para que ocorresse a sedimentação das hemácias formolizadas. Não se obteve êxito, uma vez que as reações, tanto do soro bruto como de frações cromatográficas, eram definidas em 15 minutos, sem que ocorresse diferenças significativas entre os diversos materiais testados, ou entre diferentes diluições de um mesmo material.

Aproximadamente 50% dos soros de pacientes virchovianos apresentam reação de Rubino negativa (OPROMOLLA et al., 1982; ARRUDA et al., 1988). Tal fato não implica na ausência de fator Rubino no soro desses pacientes, sendo possível a sua presença em uma concentração inferior àquela requerida para o processamento da reação. Tal suposição associada à correspondência entre o fator Rubino e IgM sérica, fundamenta a proposta de um ensaio imunoenzimático utilizando hemácias de carneiro formolizadas revestindo poços de microplacas de ELISA ("cell-ELISA", RAVINDRAN et al., 1988), servindo para capturar o fator Rubino contido em amostras testes, cuja presença seria revelada por anticorpos anti-IgM conjugado à peroxidase. Além da sua utilização para a quantificação do fator Rubino, detectando concentrações inferiores as necessárias para desencadear a sedimentação de hemácias, o "cell-ELISA" poderá ser aplicado à determinação da especificidade do fator Rubino. A hipótese levantada de que o epitopo reconhecido pelo fator seja de natureza

sacarídica, seria avaliada testando-se a inibição da ligação do fator Rubino à hemácia por monossacarídeos e oligossacarídeos.

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, concluímos que o fator responsável pela sedimentação acelerada de hemácias de carneiro formolizadas é uma imunoglobulina de isotipo M, com especificidade a ser determinada. Dados preliminares indicam que essa IgM tenha especificidade para um antígeno de natureza glicídica, sendo provavelmente diferente do glicolípido fenólico-I, uma vez que a reação de Rubino não foi inibida na presença desse antígeno. Estudos de determinação da especificidade desses anticorpos poderão abrir novas perspectivas na compreensão das alterações da resposta imunitária que ocorrem nos pacientes com hanseníase virchoviana.

Resumo

Soro de alguns pacientes hansenianos sedimentam aceleradamente hemácias de carneiro formolizadas, o que constitui a reação de Rubino, cuja positividade ocorre nas formas da doença com comprometimento da imunidade celular específica para o *M. leprae*. Tal associação motivou a identificação e isolamento do componente responsável pelo fenômeno (fator Rubino). Determinou-se inicialmente que a precipitação do soro com polietileno glicol (PEG) na concentração final de 5% era capaz de precipitar esse fator. A partir do precipitado PEG 5%, recuperou-se a atividade Rubino na fração ligante de Con A-Sepharose, eluída com D-manose. Cromatografia desse eluato em coluna Mono Q (pH 8,0) permitiu eluir o material ativo com 40% do gradiente salino (0 a 1 M de NaCl). Subseqüente filtração em gel em coluna Superose 6 caracterizou o fator Rubino como eluído em volume coincidente com o da IgM sérica humana. A presença de IgM foi detectada na preparação obtida por tal seqüência de procedimentos cromatográficos e sua correspondência com fator Rubino foi demonstrada pelas observações: (a) o fator Rubino foi adsorvido em agarose-IgG de coelho anti-IgM humana; a atividade foi recuperada no eluato ácido da coluna; (b) houve inibição da reação de Rubino quando esta foi procedida na presença de anticorpos de coelho anti-IgM humana. Tais efeitos não foram verificados quando utilizou-se anticorpo de coelho anti- α_2 -macroglobulina como controle. A sedimentação acelerada de hemácias de carneiro formolizadas, determinada por soro de pacientes virchovianos, não foi inibida na presença do glicolípideo fenólico-I, sugerindo que a IgM correspondente ao fator Rubino não seja específica para esse antígeno do *M. leprae*. Não houve correlação entre a positividade da reação de Rubino e o aumento dos níveis de IgM sérica detectado em 42% dos pacientes virchovianos avaliados, o que seria esperado se a IgM/fator Rubino representasse uma proporção alta da IgM sérica total. A demonstração de que o fator Rubino é uma IgM permite agora a determinação do epitopo por ela reconhecido e seu uso como ferramenta para a compreensão da ausência de resposta celular específica para o *M. leprae*, própria da hanseníase virchoviana.

Summary

The serum of some leprosy patients causes rapid sedimentation of formalized sheep erythrocytes, a phenomenon known as the Rubino reaction which is positive only in forms of the disease involving impaired specific cell immunity for *M. leprae*. The Rubino factor precipitated from positive sera by 5% (w/v) polyethylene glycol (PEG) was bound to a Con A-Sepharose column and eluted with D-mannose. The factor was eluted from a Mono Q column, pH 8.0, with 0.4 M NaCl. Subsequent gel filtration on a Superose 6 column indicated that the Rubino factor was eluted in a volume which coincided with human serum IgM. IgM was present in the preparation obtained by this sequence of chromatographic procedures and its correspondence with the Rubino factor was demonstrated by the following observations: (a) the Rubino factor was adsorbed to rabbit IgG anti-human IgM-agarose and the activity was recovered in the acid eluate of the column; (b) the Rubino reaction was inhibited when carried out in the presence of rabbit anti-human IgM antibodies. These effects were not observed when the same procedures were carried out using anti- α_2 -macroglobulin antibodies as a control. The rapid sedimentation of formalized sheep red cells caused by the serum of lepromatous patients was not inhibited by phenolic glycolipid-I, suggesting that the IgM responsible for Rubino reaction is not directed to this antigen which is specific of *M. leprae*. There was no correlation between positivity of the Rubino reaction and increase in total serum IgM levels observed in 42% of the lepromatous patients evaluated. This would have been expected if Rubino factor IgM represented a large fraction of total IgM. The demonstration that Rubino factor is an IgM now permits the determination of the epitope recognized by it and this can be used as a tool to understand the specific cell immune unresponsiveness which characterizes lepromatous leprosy.

Referências Bibliográficas

ABE, M.; MINAGAWA, F.; YOSHICO, Y.; OZAWA, T.; SAIKAWA, K.; SAITO, T.
Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr**, **48**: 109-19, 1980.

ACANFORA, G. Sulla reazioni di Rubino. **Ann. Igiene**, **49**: 152-9, 1939.

ADANT, M. Au sujet de la réaction de Rubino. **C. R. O. Soc. Biol.**, **110**: 119-20, 1932.

AHMED, H.A.; TOUW, J.; STONER, G.L.; BELEHU, A. Immunoglobulin A (IgA) in nasal washings and saliva of leprosy patients. **Int. J. Lepr.**, **51**: 22-8, 1983.

ALMEIDA, J.O. Serological studies on leprosy. A comparison of complement-fixation tests using antigens prepared from tubercle bacilli and beef-heart lipids with others serological reactions. **Bull. WHO**, **26**: 233-40, 1962.

ALMEIDA, J.O. Serology in leprosy. **Bull. WHO**, **42**: 673-702, 1970.

ALMEIDA, J.O.; KWAPINSKI, J.B. Reatividade de antígenos de actinomicetos com soros de lepra, avaliada por imunofluorescência em suporte de acetato de celulose. **Publicões Cent. Estud. Lepr.**, **14**: 73-89, 1974.

ALMEIDA, J.O. Inhibition of Rubino factor as a test for detecting antigens common to leprosy bacilli. **Int. J. Lepr.**, **46**: 436, 1978.

AMBROGIO, A. La reazione di Rubino nella lepra. **Pathologica**, **24**: 258-68, 1932.

AMIES, C.R. The Rubino's reaction in leprosy. **Bull. Inst. Pasteur.**, **28**: 828, 1930./Resumo/

ANDREWS, J. The gel filtration over a wide range. **J. Biochem.**, **96**: 595-606, 1965.

ARRUDA, M.S.P.; ARRUDA, O.S.; ASTOLFI, C.S.; NOGUEIRA, M.E.S.; BASTAZINI, I.; OPROMOLLA, D.V.; URA, S. Reação de Rubino. Critério de branqueamento para pacientes virchowianos. **Med. Cut. Ibero Lat. Am.**, **11**: 423-30, 1983.

ARRUDA, M.S.; COSTA, H.C.; SOUZA, L.C.D.; NOBRE, L.A.S. Avaliação das imunoglobulina séricas em pacientes com hanseníase virchowiana. **Salusvita**, **6**: 96-101, 1987.

ARRUDA, M.S.P.; ARRUDA, O.S.; SOUZA, L.C.D.; OPROMOLLA, D.V.A.; URA, S. Aspectos da imunidade humoral de pacientes hansenianos clinicamente curados. **Salusvita**, **7**: 22-30, 1988.

ASHWORTH, M. The detection of subclinical leprosy using a monoclonal antibody based radioimmunoassay. **Lepr. Rev.**, **57**: 237-42, 1986.

BENETAZZO, G. Rapporti tra reazioni di Rubino, velocità di sedimentazione e reazione sierologiche nella lebbra. **Dermosif.**, **8**: 241-55, 1933.

BESTA, B; MARIANI, G. Il valore pratico della reazione di Rubino per la lebbra, studiato in Somalia. **Giorn. Ital. Mal. Esot. Trop. Ig. Col.**, **9**: 11-14, 1936.

BIANCO, A.E.; FAVALORO, J.M.; BURKOT, T.R.; CULVENOR, J.G.; CREWETHER, P.E.; BROWN, G.V.; ANDERS, R.F.; COPPEL, R.L.; KEMP, J. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock protein 70 of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 8713-7, 1986.

BIER, O & ARNOLD, K. Estudos sobre a sorologia da lepra.I. Sobre a especificidade e a sensibilidade da reação de Rubino. Pesquisas sobre o mecanismo da reação. **Folia Clin**, **7**: 1-7, 1935.

BIER, O. Sorologia da lepra. **Rev. bras. leprol.**, **4**: 221-2, 1936

BLOOM, B.R.; GODAL, T. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. V. **Leprosy. Rev. Infect. Dis.**, **5**: 765-80, 1983.

BLOOM, B.R.; JACOBS, W.R.Jr. New strategies for leprosy and tuberculosis and for developmental of bacillus Calmette-Guérin into a multivaccine vehicle. **Ann. New York Acad. Sci.**, **569**: 155-73, 1989.

BLOOM, B.R. Stigma variation: Observation on suppressor T cell and leprosy. **Annu. Rev. Immunol.**, **10**: 453-88, 1992.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-9, 1987.

BRENNAN, P.J. The carbohydrate-containing antigens of *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev**, **57 (suppl 2)**: 39-51, 1986.

- BRITTON, W.J.; GARSIA, R.J.; HELLQVIST, L.; WATSON, J.D.; BASTEN, A. The characterization and immunoreactivity of a 70 kD protein common to *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* (BCG). **Lepr Rev**, **57 (suppl 2P)**: 67-75,1986.
- BROWNE, S.G. The history of leprosy. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. 1st edn. New York, Churchill Livingstone Inc., 1985.Chapter 1, p.1-14.
- BULLOCK, W.E. Jr.; HO, M.F.; CHEN, N.J. Studies of immune mechanisms in leprosy. II. Quantitative relationships of IgG, IgA, and IgM immunoglobulins. **J. Lab. Clin. Med.**, **75**: 863-70, 1970.
- CASTRO-PAULLIER, V.; ERRECART, L. Reacción de los globulos formolados y naturales de oveja frente a algunos sueros humanos. **Rev. méd. lat.-amer.**, **11**: 2197-2201, 1926.
- CASTRO-PAULLIER, V.; ERRECART, L. Nuevos casos de reacción de Rubino en sujetos no leprosos. Manera de obtenerla experimentalmente en leprosos y no leprosos. **Rev. méd. lat.-amer.**, **12**: 711-6, 1927.
- CHATUVERDI, V.; SINHA, S.; GIRDHAR, B.K.; SENGUPTA, V. On the value of sequential serology with *Mycobacterium leprae*-specific antibody competition ELISA in monitoring leprosy chemotherapy. **Int. J. Lepr.**, **59**: 32-40, 1991.
- CHO, S.N.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; GELBER, R.H.; BRENNAN. P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* and use serodiagnosis of leprosy. **Infect Immun**, **41**: 1077-83, 1983.

CHO, S.N.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.T.Jr.; ABALOS, R.M.; DELA CRUZ, E.C.; WALSH, G.P.; KIM, J.D.; BRENNAN, P.J. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. **Int. J. Lepr.**, **59**: 25-31, 1991.

CHRISTMAN, M.F.; MORGAN, R.W.; JACOBSON, F.S.; AMES, B.N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. **Cell**, **41**: 753-62, 1985.

COLSTON, M.J.; HILSON, G.R.F. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature**, **262**: 399-401, 1976.

CURBAN, G.V. Contribuição para o estudo da reação de Rubino. **Rev. bras. Leprol.**, **30**: 179-216, 1962.

DAVID, H.L.; MAROJA, M.F.; CRUAUD, P. Quantitative relationship between anti-PGL-I-specific antibody levels and the lepromin reaction. **Int. J. Lepr.**, **59**: 332-4, 1991.

DROWART, A.; LAUNOIS, P.; DE COCK, M.; HUYGEN, K.; DE BRUYN, J.; YERNAULT, J.-C.; VAN VOOREN, J.-P. An isoelectric focusing method for the study of the humoral response against the antigen 85 complex of *Mycobacterium bovis* BCG in different forms of leprosy. **J. Immunol. Methods**, **145**: 223-8, 1991.

DROWART, A.; DE BRUYN, J.; HUYGEN, K.; DAMIANI, G.; GODFREY, H.; STELANDRE, M.; YERNAULT, J.-C.; VAN VOOREN; J.-P. Isoelectrophoretic characterization of protein antigens present in mycobacterial culture filtrates and recognized by monoclonal antibodies directed against the *Mycobacterium bovis* BCG antigen 85 complex. **Scand. J. Immunol.**, **36**: 697-703, 1992.

DROWART, A.; CHANTEAU, S.; HUYGEN, K.; DE COCK, M.; CARTEL, J.-L.; DE BRUYN, J.; LAUNOIS, P; YERNAULT, J.-C.; VAN VOOREN; J.-P. Effects of chemotherapy on antibody levels directed against PGL-I and 85A and 85B protein antigens in lepromatous patients. **Int. J. Lepr.**, **61**: 29-34, 1993.

ENGERS, H.D.; ABE, M.; BLOOM, B.R.; MEHRA, V.; BRITTON, W.; BUCHANAN, T.M.; KHANOLKAR, S.K.; YOUNG, D.B.; CLOSS, O.; GILLIS, T.; HARBOE, M.; IVANYI, J.; KOLK, A.H.J.; SHEPARD, C.C. Results of a World Health Organization-sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.**, **48**: 603-5, 1985.

ENGERS, H.D.; HOUBA, V.; BENNEDSEN, J.; BUCHANAN, T.M.; CHAPARAS, S.D.; KADIVAL, G.; CLOSS, O.; DAVID, J.R.; van EMBDEN, J.D.A.; GODAL, D.; MUSTAFA, S.A.; IVANYI, J.; YOUNG, D.B.; KAUFMANN, S.H.E.; KHOMENKO, A.G.; KOLK, A.H.J.; KUBIN, M.; LOUIS, J.A.; MINDEN, P.; SHINNICK, T.M.; TRNKA, L.; YOUNG, R.A. Results of World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by Mycobacterium specific monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, **51**: 718-20, 1986.

ESPITIA, C.; SCIUTTO, E.; BOTTASSO, O.; GONZALEZ-AMARO, R.; HERNANDEZ-PANDO, R.; MANCILLA, R. High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kD in tuberculosis and lepromatous leprosy. **Clin. exp. Immunol.**, **87**: 362-7, 1992.

FIGUEIREDO, A.P. O diagnóstico sorológico da lepra pela reação de Rubino. Fac. Med. Rio de Janeiro, 1931.(Tese de Doutorado).

FURTADO, D.; LEITE, S. A reação de Rubino e o diagnóstico precoce da lepra. **Lisboa Medica**, **9**: 1019-27, 1932.

GARCIA LIMA, E.; LAURE, C.J. Isolation and identification of a substance from serum of leprosy patients. **Int. J. Lepr**, **58**: 726, 1990./correspondência/

GAYLOR, H.; BRENNAN, P.J. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, **41**: 645-75, 1987.

GEORGOPOULOS, C.; McFARLAND, H. Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. **Immunol. Today**, **14**: 373-5, 1993.

GILLIS, T.P.; WILLIAMS, D.L. Polymerase chain reaction and leprosy. **Int. J. Lepr.**, **59**: 311-6, 1991.

GUPTA, S.C.; SINHA, S.N.; SHARMA, D.; BAJAJ, A.K.; BISHT, D.; MEHROTRA, T.M.; GUPTA, R.M. Serum protein and immunoglobulins in leprosy. **Int. J. Lepr.**, **46**: 9-13, 1978.

HAO, Y.L.; INGHAM, K.C.; WICKERHAUSER, M. Fractionation precipitation of proteins with polyethylene glycol. In: CURLING, I.M. **Methods of plasma protein fractionation**. Academic Press Inc. London, 1980. Section 1. p.57-74.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B. Precipitin reaction between extracts of seeds of *Canavalia Ensiformis* (jack bean) and normal and pathological serum proteins. **Vox Sang**, **8**: 348, 1963.

HASTINGS, R.C.; CHEHL, S.P.K.; MORALES, M.J.; SHANNON, E.J.; KIRCHHEIMER, W.F. Multiplication of acid-fast bacilli in nude mice inoculated with armadillo-derived *M. leprae*. **Int. J. Lepr.**, **48**: 490-1, 1980./resumo/

HEDSTROM, R.; CULPEPPER, J.; HARRISON, R.A.; AGABIAN, N.; NEWPORT, G. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat shock protein Hsp70. **J. Exp. Med.**, **165**: 1430-1435, 1987.

HIMMELOCH, S.R. Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents. **Methods Enzymol.**, **22**: 273, 1971.

HOMBRIA, M. contribución al estudio sorologica de la lepra. **Acta dermo.-sifiliogr.**, **25**: 193-200, 1932.

HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J. Bacteriol.**, **147**: 728-35, 1981.

HUNTER, S.W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.**, **257**: 10557-78, 1982.

HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacylphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.**, **258**: 7556-62, 1983.

HUNTER, S.W.; GAYLORD, H.; BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from leprosy and tubercle bacilli. **J. Biol. Chem.**, **261**: 12345-51, 1986.

HUSSON, R.N.; YOUNG, R.A. Genes for the major protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: the etiologic agents of tuberculosis and leprosy share an immunodominant antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 1679-83, 1987.

IMBERT, M.F.P. La reacción de Rubino en la lepra. **Puerto Rico J. publ. Hlth.**, **12**: 246-256, 1936.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. CENEPI. Ano II, nº 2. 1993. p. 91.

IZUMI, S.; FUJIWARA, T.; IKEDA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; KAWATSU, K. Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 525-9, 1990.

KABAT, E.V.; MAYER, M.M. Ion exchange chromatography. In: **Experimental Immunochemistry**. 2nd. Edn. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, USA, 1961. Chapter.31, p. 606-15.

KAPLAN, G.; GANDHI, R.R.; WEINSTEIN, D.E.; LEWIS, W.R.; PATARROYO, M.E.; BRENNAN, P.J.; COHN, Z.A. **Mycobacterium leprae** antigen-induced suppression of T cell proliferation *in vitro*. **J. Immunol.**, **138**: 3028-34, 1987.

KAPLAN, G. Recent advances in cytokine therapy in leprosy. **J. Infect. Dis.**, **167 (suppl. 1)**: S18-22, 1993.

KEICHHEIMER, W.F.; STORRS, E.E. Attempts to establish the armadillo as a model for the study of leprosy.I. Report of lepromatoid leprosy in a experimentally infected armadillo. **Int J Lepr**, **39**: 693-702, 1971.

KLATSER, P.R.; DE WIT, M.Y.L.; KOLK, A.H.J. An ELISA-inhibition test using monoclonal antibody for serology of leprosy. **Clin. exp. Immunol.**, **62**: 468-73, 1985.

KLATSER, P.R.; DE WIT, M.Y.L.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.; ABALOA, R.M.; MADARANG, M.G. Serological activity to a 36 kDa antigen **M. leprae** among household contacts of lepromatous patients. **Int. J. Lepr.**, **57** suppl 000-000, 1989./Resumo/

KLATSER. P.R.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M.Y.L. Detection of **Mycobacterium leprae** nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 2947-51, 1993.

KOHSAKA, K.; MORI, T.; ITO, T. Lepromatoid lesion developed in nude mouse inoculated with *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr**, **44**: 540, 1976./Resumo/

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 660-685, 1970.

LAUNOIS, P.; NIANG, M.N.; DE BRUYN, J.; SARTHOU, J.-L.; RIVIER, F.; DROWART, A.; VAN VOOREN, J.-P.; MILLAN, J.; HUYGEN, K. The major antigen complex (Ag 85) from *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin is associated with protective T cell in leprosy: a follow-up study of 45 household contacts. **J. Infect. Dis.**, **167**: 1160-7, 1993.

LAMB, J.R.; IVANYI, J.; REES, A.D.M.; ROTHBARD, J.B.; HOWLAND, K.; YOUNG, R.A.; YOUNG, D.B. Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. **EMBO J.**, **6**: 1245-9, 1987.

LEON, M.A. Concanavalin A reaction with human normal immunoglobulin G and myeloma immunoglobulin G. **Science**, **158**: 1325, 1967

LEPINE, P.; MARKIANOS, J.; PAPAYOANNOU, A. Valeur pratique de la réaction de Rubino pour le sérodiagnostic de la lèpre. **Bull. Soc. Path. exot.**, **25**: 543-6, 1932.

LEWIN, R. Stress protein: are links in diseases. **Science**, **240**: 1732-3, 1988.

LUZ, A.C. Contribuição ao estudo sorológico da lepra. **Brasil Médico**, **43**: 1526-29, 1929.

MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Hanseníase - Normas e Instruções.**

Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjak"Secretaria do Estado da Saúde. São Paulo. 1992.

MARCHOUX, E.; CARO, J. Méthode de diagnostic sérologique de la lèpre. **Ann. Inst. Pasteur., 42:** 542-52, 1928.

MEANS, G.E. Reductive alkylation of amino groups. **Methods Enzimol., 47:** 469-78, 1977.

MEHRA, V.; BRENNAN, P.J.; RADA, E.; CONVIT, J.; BLOOM, B.R. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. **Nature, 308:** 194-6, 1984.

MEHRA, V.; BLOOM, B.R.; TORIGIAN, V.K.; MANDICH, D.; REICHEL, M.; YOUNG, S.M.M.; SALGAME, P.; CONVIT, J.; HUNTER, S.W.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P.J.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Characterization of *Mycobacterium leprae* cell wall-associated proteins with the use of T lymphocyte clones. **J. Immunol., 142:** 2873-8, 1989.

MEHTA, N.G. ABO (H) blood group antigens of the human erythrocytes membrane: contribution of glycoprotein and glycolipid. **J. Membrane Biol., 52:** 17-24, 1980.

MELANCON-KAPLAN, J.; HUNTER, S.W.; MCNEIL, M.; STEWART, C.; MODLIN, R.L.; REA, T.H.; CONVIT, J.; SALGAME, P.; MEHRA, V.; BLOOM, B.R.; BRENNAN, P.J. Immunological significance of *Mycobacterium leprae* cell walls. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:** 1917-21, 1988.

- MEYERS, W.M.; WALSH, G.P.; BROWN, H.L.; BINFORD, C.H.; GEROME, P.J.; WOLF, R.H.; GORMUS, B.J.; MARTIN, L. Leprosy in the mangabey monkey (*Cercocebus torquatus atys*, sooty mangabey). **Int. J. Lepr.**, **49**: 500-2, 1981.
- MITSUDA, K. On value of skin reaction to suspension of leprous nodules. **Int. J. Lepr.**, **21**: 347-58, 1953./Reimpresso, 1919/
- MONACELLI, M. Sulla reazione di Rubino nella lepra. **G. ital. Derm. Sif.**, **69**: 1472-6, 1928.
- MORGAN, R.W.; CHRISTMAN, M.F.; JACOBSON, F.S.; STORZ, G.; AMES, B.N. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat-shock and other stress proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 8059-63, 1986.
- MUSTAFA, A.S.; GILL, H.K.; NERLAND, A.; BRITTON, W.J.; MEHRA, V.; BLOOM, B.R.; YOUNG, R.A.; GODAL, T. Human T-cell clones recognize a major *M. leprae* protein antigen expressed in *E. coli*. **Nature**, **319**: 63-6, 1986.
- MUTIS, T.; van SCHOOTEN, W.C.A.; de VRIES, R.R.P. A peptidoglycan protein complex purified from *M. leprae* cell walls contains most or all immunodominant *M. leprae* T cell antigens. **Int. J. Lepr.**, **57**: 788-93, 1989.
- MWATHA, J.; MORENO, C.; SENGUPTA, U.; SINHA, S.; IVANYI, J. A comparative evaluation of serological assays for lepromatous leprosy. **Lepr. Rev.**, **59**: 195-9, 1988.

MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D.S.; FROLAND, S.S.; SONG, Y.K. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and the histopathological spectrum of leprosy. **Clin. exp. Immunol.**, **14**: 541-53, 1973.

NOORDEEN, S.K.; LOPEZ-BRAVO, L.; SUNDARESAN, T.K. Estimated number of leprosy cases in the world. **Bull. WHO**, **70**: 7-10, 1992.

OPROMOLLA, D.V.A.; ARRUDA, M.S.; URA, S.; PERNAMBUCO, J.C.; BASTAZINI, I.; FLEURY, R.N.; TOLENTINO, M.M.; TONELO, C.L.; ARRUDA, O.S. Aspectos evolutivos da reação de Rubino. **Med. Cutan. Ibero Lat. Am.**, **10**: 9-14, 1982.

OTTENHOFF, T.H.M.; KLATSER P.R.; IVANYI, J.; ELFERINK, D.G.; DE WIT; DE VRIES, R.R.P. *Mycobacterium leprae*-specific protein antigens defined by cloned human helper T-cells. **Nature**, **319**: 66-8, 1986.

PELTIER, M. De la valeur technique de la méthode de Rubino dans la recherche de la sédimentation globulaire chez les lépreux. **Bull. Soc. Path. exot.**, **21**: 836-838, 1928.

PESSOLANI, M.C.; PERALTA, J.M.; RUMJANEK, F.D.; GOMES, H.G.; DE MELO MARQUES, M.A.; ALMEIDA, E.C.C.; SAAD, M.H.F.; SARNO, E.N. Serology leprosy: immunoassays comparing immunoglobulin G antibody responses to 28 and 30 kilodalton proteins purified from *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 2285- 90, 1991.

PETCHCLAI, B.; KHUPULSUP, K.; HIRANRAS, S.; SAMPATAVANICH, S.; SAMPOONACHOT, P.; LEELARUSAMEE, A. A passive hemagglutination test for leprosy using a sunthetic disaccharide antigen. **Int. J. Lepr.**, **56**: 255-258, 1988.

PRASAD, H.K.; MISHRA, R.S.; NATH, I. Phenolic glicolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. **J. Exp. Med.**, **165**: 239-44, 1987.

RAMOS, T.; ZALCBERG-QUINTANA, I.; APPELBERG, R.; SARNO, E.N.; SILVA, M.T. T-helper cell subpopulation and the immune spectrum of leprosy. **Int. J. Lepr.**, **57**: 73-81, 1989.

RAVINDRAN, B.; SATAPATHY, A.K.; DAS, M.K. Naturally-occurring anti- α -galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections – a possible role for autoantibodies in malaria. **Immunol. Letters**, **19**: 137-42, 1988.

REES, R.J.W. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. 1st edn. New York, Churchill Livingstore Inc., 1985. Chapter 3, p.31-52.

RIDLEY, D.S.; JOPLIN, W.H. Classification of leprosy according to immunity; a five group-system. **Int. J. Lepr.**, **34**: 255-73, 1966.

ROCA DE VIÑALS, R. Contribución al estudio del serodiagnóstico de la lepra. La reacción de Rubino. **Cron. méd.-quir. Habana**, **60**: 27-30, 1934.

RUBINO, M.C. Nueva reacción sorológica en la lepra. **Rev. méd. Uruguay**, **29**: 143-55, 1926a.

RUBINO, M.C. Nueva reacciones sorológicas en la lepra. **Rev. Soc. arg. Biol.**, **2**: 407-16, 1926b.

RUBINO, M.C. Nouvelle réaction sorologique dans la lèpre. **Rev. méd. Uruguay**, **32**: 85-116, 1929.

RUBINO, M.C. Séro-diagnostic de la lèpre par la agglutino-sédimentation des globules rouges de mouton formolés. **Bull. Acad. Med.**, **105**: 890-3, 1931a.

RUBINO, M.C. Séro-diagnostic de la lèpre par l'agglutino-sédimentation des globules de mouton formolés. **Ann. Inst. Pasteur**, **47**: 147-72, 1931b.

RUBINO, M.C. Untersuchungen zur Verwendung formolfixierter Hammelblutkoerperchen in der Serodiagnostik. **Zbl. Bakt. I. abt. orig.**, **120**: 378-384, 1931c.

SAHA, K.; AGARWAL, S.K.; MISRA, R.C. Gut associated IgA deficiencie in lepromatous leprosy. **Scand. J. Immunol.**, **8**: 397-402, 1978.

SAMPSON, I.A.; HODGEN, A.N.; ARTHUR, I.H. The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography. **J. Immunol. Methods**, **69**: 9-15, 1984.

SANTOS, A.R.; DE MIRANDA, A.B.; SARNO, E.N.; SUFFYS, P.N.; DEGRAVE, W.M. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **J. Med. Microbiol.**, **39**: 298-304, 1993.

SCHER, M.G.; RESNECK, W.G.; BLOCK, R.J. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Anal. Biochem.**, **177**: 168-71, 1989.

SHEPARD, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli in the footpads of mice. **J. Exp. Med.**, **112**: 445-54, 1960.

SIBLEY, L.D.; HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J.; KRAHENBUHL, J.L. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. **Infect. Immun.**, **56**: 1232-6, 1988.

SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H.; FOSS, N.T. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr.**, **61**: 107-8, 1993. /Correspondência/

SILVA, O.P.; FERRI, R.G.; MORAES, N.; MARQUES, A.L.V. Estudos imunoquímicos na hanseníase. I - Eletro e imunoeletroforeses das proteínas séricas. Tentativa de associação com a reação de Rubino. **Hansen. Int.**, **1**: 33-41, 1976a.

SILVA, O.P.; FERRI, R.G.; MORAES, N.; MARQUES, A.L.V. Estudos imunoquímicos na hanseníase. II - Quantificação de imunoglobulinas séricas. Tentativa de associação com a reação de Rubino. **Hansen. Int.**, **1**: 43-51, 1976b.

SILVA, O.P.; FERRI, R.G.; MORAES, N.; MARQUES, A.L.V. Estudos imunoquímicos na hanseníase. III - Pesquisa de auto-anticorpos séricos. Tentativa de associação com a reação de Rubino. **Hansen. Int.**, **1**: 120-4, 1976c.

SILVEIRA, G.F.; MESQUITA, M.P. Contribuição ao estudo da reação de Rubino. **Rev. Ass. paul. Med.**, **3**: 21-31, 1933.

SILVESTRINI, B.; GUGLIELMOTTI, A.; SASO, L.; CHENG, C.Y. Changes in concanavalin A-reactive proteins in inflammatory disorders. **Clin. Chem.**, **35**: 2207-11, 1989.

SINHA, S.; SENGUPTA, U.; RAMU, G.; IVANYI, J. Serological survey of leprosy and control subjects by a monoclonal antibody-based immunoassay. **Int. J. Lepr.**, **53**: 33-8, 1985.

SPANNEDA, A. Sulla reazione di Rubino nella lepra. **Rev. sud-amer. Endocr.**, **15**: 508-516, 1932.

STAHLER, M.S.; GUGLIELMOTTI, A.; MATHUR, P.P.; SILVESTRINI, B.; BARDIN, C.W.; CHENG, C.Y. CMB-18 is a new Sertori cell secretory protein for studying testicular physiology. **J. Cell Biol.**, **107**: 630a, 1988./resumo 3572/

TAMBLYN, E.; HOKAMA, Y. C-reactive protein, immunoglobulin and serum protein analyses of sera from cases of lepromatous leprosy and tuberculosis. **Int. J. Lepr.**, **37**: 68-73, 1969.

THOLE, J.E.R.; SCHÖNING, R.; JANSON, A.A.; GARB, T.; CORNELISSE, Y.E.; CLARK-CURTISS, J.E.; KOLK, A.H.J.; OTTENHOFF, T.H.M.; DE VRIES, R.R.P.; ABOU-ZEID, C. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. **Mol. Microbiol.**, **6**: 153-63, 1992.

TRAVASSOS, J. Reação de Rubino. **Arch. Riogrand. Med.**, **7**: 7-11, 1932.

VACHULA, N.; HOLZER, T.J.; ANDERSEN, B.R. Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae*. **J. Immunol.**, **142**: 1696-701, 1989.

VAN VOOREN, J.-P.; DROWART, A.; DE BRUYN, J.; LAUNOIS, P.; MILLAN, J.; DELAPORTE, E.; DEVELOUX, M.; YERNAULT, J.-C.; HUYGEN, K. Humoral immune response against the 85A and 85B antigens of *Mycobacterium bovis* BCG in patients with leprosy and tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 1608-10, 1992.

VODKIN, M.H.; WILLIAMS, J.C. A heat shock operon in *Coxiella burnettii* produces a major antigens homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **170**: 1227-34, 1988.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. Leprosy situation in the world and the multidrug therapy coverage. **67**: 153-60, 1992.

WEINSTEIN, Y.; GIVOL, D.; STRAUSBAUCH, P.H. The fractionation of immunoglobulins with insolubilized concanavalina A. **J. Immunol.**, **109**: 1402-4, 1972.

WIKER, H.G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiol. Rev.**, **56**: 648-61, 1992.

- WILSON, M.B.; NAKANE, P.K.. **Immunofluorescence and related techniques**. Knapp, W. Holubar, K. and Wick, G. (editors). Elseviers, Amsterdam, 1978. p. 215-221.
- WU, Q.X.; YE, G.Y.; YIN, Y.P.; LI, X.Y.; LIU, Q.; WEI, W.H. Rapid serodiagnosis for leprosy - a preliminary study on latex agglutination test. **Int. J. Lepr.**, **58**: 328-33, 1990.
- YOUNG, D.B.; BUCHANAN, T.M A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. **Science**, **221**: 1057-9, 1983.
- YOUNG, D.B.; DISSANAYAKE, S.; MILLER, R.A.; KHANOLKAR, S.R.; BUCHANAN, T.M. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. **J. Infect. Dis.**, **149**: 870-3, 1984.
- YOUNG, D.; LATHIGRA, R.; HENDRIX, R.; SWEETSER, D.; YOUNG, R.A. Stress protein are immune targets in leprosy and tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 4267-70, 1988.
- YOUNG, R.A.; MEHRA, V.; SWEETSER, D.; BUCHANAN, T.; CLARK-CURTISS, J.; DAVIS, R.W.; BLOOM, B.R. Genes for the major protein antigens of leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. **Nature**, **316**: 450-2, 1985.
- YOUNG, R.A.; ELLIOTT, T.J. Stress proteins, infection and immune surveillance. **Cell**, **59**: 5-8, 1989.

ZEVALLOS, C.A. La lepra en el ecuador. La reacción de Rubino en el diagnóstico de la lepra. **Arch. de Lepra, 4:** 22-64, 1932.