

ADEMILSON PANUNTO CASTELO

**ANTICORPOS IgM ANTI-FOSFOLIPÍDIOS, DEPENDENTES DE
 β_2 -GLICOPROTEÍNA I, DETERMINAM A POSITIVIDADE DA
REAÇÃO DE RUBINO NA HANSENÍASE.**

A QUEBRA DO PARADIGMA DA ESPECIFICIDADE ABSOLUTA.

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA ROQUE BARREIRA

RIBEIRÃO PRETO - SP
-1998-

ADEMILSON PANUNTO CASTELO

**ANTICORPOS IgM ANTI-FOSFOLÍPIDIOS, DEPENDENTES DE
 β_2 -GLICOPROTEÍNA I, DETERMINAM A POSITIVIDADE DA
REAÇÃO DE RUBINO NA HANSENÍASE.**

A QUEBRA DO PARADIGMA DA ESPECIFICIDADE ABSOLUTA.

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA ROQUE BARREIRA

RIBEIRÃO PRETO - SP
-1998-

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus

Administrativo de Ribeirão Preto - USP

Panunto-Castelo, Ademilson

Anticorpos IgM anti-fosfolípidios, dependentes de β_2 -glicorproteína I, determinam a positividade da reação de Rubino. A quebra do paradigma da especificidade absoluta.

Ribeirão Preto, 1998.

90 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria-Cristina

TOCANDO EM FRENTE

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe,
Eu só levo a certeza
De que muito pouco eu sei,
Ou nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso o amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
De ser feliz
Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
De ser feliz.

MAR PORTUGUÊS

(Fernando Pessoa)

Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

*Temos fome de saber, porém muitas vezes nos falta apetite.
Anorexia imposta por algo insondável
Apelo pela busca de sentido nas emoções de nossos dias
Grito do inconsciente por uma vida mais vivida.*

*Á Arlete, companheira de todas as horas,
Pelo de carinho, incentivo, atenção...
Pelo amor que me estabiliza,
Me dá leveza e me traz sustentação.*

Aos meus pais Franklin e Olga, pela vida, pelo amor e por minha formação. Aos meus irmãos Adilson e Andréia pelo incentivo. A Jadirlei, Adriano, Adriana, Wagner, Mônica, José Getúlio, Luzia, Vinícius, Daniel, Vítor e Lucas, pelo carinho e apoio.

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.

Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, pela assessoria de minha pesquisa, por suas sugestões valiosas, pelas portas abertas de seu laboratório e pelo apoio dado desde do nosso primeiro contato.

Dr. Célio Lopes Silva por suas sugestões críticas e enriquecedoras, pelo convívio sempre agradável.

Dr. Diltor Vladimir Araújo Opromolla, diretor do Instituto Lauro de Souza Lima, local onde tive meu primeiro contato com a reação de Rubino, pelo incentivo e espírito científico.

Dra. Eloísa Dutra de Oliveira Bonfá, por mostrar-se sempre empenhada em participar dessa banca.

Dr. João Santana da Silva, pela amizade, incentivo e cooperação.

Dr. Lewis Joel Greene e José César Rosa, pelo excelente trabalho de seqüenciamento da porção N-terminal do co-fator.

Dr. Igor Correia de Almeida, pela colaboração nos experimentos com lipídios e ensaios de quimioluminescência.

Dr. Francisco Leoni, pelo auxílio nos experimentos iniciais com lipídios.

Imaculada (Maco), Sandra e Alexandra (Le Re), pelo primor e competência no auxílio técnico e carinho em nosso convívio.

Maria Inez Anceschi, pela disponibilidade em obter dados e soros de pacientes.

Ana Cristine S. Ferreira, pela amizade, convívio agradável e presteza em resolver assuntos diversos. Muito obrigado.

Ronaldo Sordi Campanini e Rosângela Catarina Peral Mesquita, pela amizade e disponibilidade.

Marcelo Dias Baruffi, Laura, Vânia, Alexandra (Xan), Jianne, Gilson, João Tadeu, Júlio, Jane, Luciane, Gabi, Saka, Margareth, Anderson, Zé Eduardo, amigos de todas as horas, pela solidariedade, companheirismo, ensinamentos e amizade.

Companheiras de laboratório, Érica, Sula, Andréa, Patrícia, Elaine, Flávia, pelo companheirismo, carinho e amizade demonstrados no convívio cotidiano.

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

Médicos e funcionários Centro de Saúde Escola, pela atenção dispensada, entusiasmo e interesse pela pesquisa, disponibilidade para a seleção e coleta de sangue de pacientes hansenianos.

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

Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior, pela bolsa de doutorado.

ABREVEATURAS

DTH — Hipersensibilidade do tipo tardia

HPTLC — Cromatografia de camada delgada de alta resolução

IFN- γ — Interferon- γ

IgE — Imunoglobulina E

IgG — Imunoglobulina G

IgM — Imunoglobulina M

IL-1 — Interleucina 1

IL-2 — Interleucina 2

IL-4 — Interleucina 4

IL-5 — Interleucina 5

IL-6 — Interleucina 6

IL-13 — Interleucina 13

MM — massa(s) molecular(es)

PBS — Solução salina tamponada com fosfato

PEG — Polietileno glicol 4.000

Ppt — precipitado

PQT — Poliquimioterapia

Rf — (do inglês "*running front*" ratio) Distância percorrida por uma substância dividida pela distância percorrida pelo solvente (frente).

SHN — Soro humano normal

Th1 — células T "helper" do tipo 1

Th2 — células T "helper" do tipo 2

TNF — Fator de necrose tumoral

ÍNDICE

PREÂMBULO	01
INTRODUÇÃO.....	04
1. Resposta imunitária na hanseníase, com ênfase à auto-imunidade.....	05
2. Ensaios para diagnóstico da hanseníase	07
3. Reação de Rubino	10
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
1. Soros humanos.....	19
2. Hemácias de carneiros	19
3. Reação de Rubino	20
4. Inibição da reação de Rubino	20
5. Precipitação do fator Rubino/IgM com polietileno glicol.....	21
6. Purificação do fator Rubino/IgM.....	21
7. Purificação do co-fator sérico da reação de Rubino	22
- Precipitação com polietileno glicol	22
- Precipitação com ácido perclórico.....	22
- Cromatografia de afinidade em coluna de heparina imobilizada.....	23
- Cromatografia de afinidade em coluna de proteína A e G imobilizadas.....	23
- Cromatografia de troca iônica	24
- Cromatografia por filtração em gel	25
8. Análise eletroforética e “immunoblot”	26
9. Produção e purificação de anticorpos anti-co-fator da reação de Rubino	27
- Imunização do coelho	27
- Precipitação com sulfato de amônia	27
- Cromatografia de afinidade em coluna de proteína A	28
10. Seqüenciamento dos aminoácidos N-terminais e identificação do co-fator da reação de Rubino	28
11. Clivagem por brometo de cianogênio	29
12. Biotinização do fator Rubino/IgM e β_2 -glicoproteína I	29

13. Citometria de fluxo.....	30
14. Preparação de estromas de hemácias naturais.....	31
15. Extração de componentes de estromas de hemácia	31
16. Partição de Folch.....	32
17. Cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC)	33
- Uma fase móvel	33
- Duas fases móveis consecutivas	33
- Preparativas	34
- Protocolo de estudo de lipídio com HPTLC.....	34
- Visualização dos lipídios	35
18. Ensaio imunoenzimático em microplaca.....	35
- "Cell-ELISA"	35
- Poços recobertos com frações lipídicas de eritrócito de carneiro	37
- Poços recobertos com cardiolipina	37
RESULTADOS	39
1. Novo processo de purificação do fator Rubino/IgM.....	40
- Purificação do fator Rubino/IgM.....	40
- Análise da homogeneidade do fator Rubino/IgM purificado por afinidade a hemácias formalizadas	41
2. Estudo do ligante da hemácia envolvido na reação de Rubino	43
- Sugestão da natureza lipídica do ligante	43
- Inibição da reação de Rubino com uma fração extraída de estromas de hemácias naturais	43
- Ensaio imunoenzimático com as frações extraídas de estromas de hemácias naturais	44
- Componentes de superfície de hemácias de carneiro extraídos com mistura de solventes orgânicos: perfil da separação por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC).....	45
- Teste de inibição da reação de Rubino com açúcares.....	46
- Isolamento do ligante da hemácia envolvido na reação de Rubino	47
3. Isolamento e caracterização do co-fator da reação de Rubino.....	49

- Precipitação do co-fator com polietileno glicol (PEG).....	49
- Purificação do co-fator	50
- Análise eletroforética e “immunoblotting” do co-fator	51
- Análise da seqüência N-terminal do co-fator da reação de Rubino	52
- Análise da seqüência N-terminal de nova preparação do co-fator.....	54
4. Interação entre fator Rubino/IgM, co-fator e ligante eritrocítico	55
- Inibição da reação de Rubino por cardiolipina	55
- Ligação do co-fator e do fator Rubino/IgM às hemácias formalizadas.....	56
- Detecção imunoenzimática de anticorpos anti-fosfolípido em soros de pacientes hansenianos.....	58
- Fator Rubino/IgM reconhece epitopo topográfico dependente de pontes dissulfeto de β_2 -glicoproteína I	59
5. Quebra de um paradigma. Reatividade Rubino do soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	61
DISCUSSÃO.....	62
RESUMO	73
SUMMARY	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

PREÂMBULO

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

A classificação da hanseníase sofreu uma profunda transformação no curso dos últimos 150 anos, da classificação de Danielsen & Boeck em nodular e anestésica àquela com cinco pontos de Ridley & Joplin (TALHARI, 1996). Essa última classificação é diretamente dependente da imunidade mediada por células. A manifestação da infecção na hanseníase caracteriza-se por ter um largo espectro; num pólo estão os doentes que desenvolvem resposta protetora ao bacilo e um controle efetivo da disseminação da doença (forma tuberculóide-TT), e no pólo oposto, aqueles que falham em responder aos antígenos do *M. leprae*, o que resulta em doença multibacilar e disseminada (forma virchowiana-LL). Entre esses pólos, há pacientes com quadros intermediários: "borderline" tuberculóide (BT), "mid-borderline" (BB) e "borderline" virchowiano (BL) (RIDLEY & JOPLING, 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; YAMAMURA et al., 1992; KAPLAN, 1993)

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 1.150.000 casos de hanseníase, com 888.340 casos registrados para tratamento (prevalência de 1,54 casos/10.000 habitantes) (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORDS, 1997). Há uma clara tendência de diminuição da doença, exceto nas Américas, onde o Brasil lidera em números de casos e em taxa de prevalência (WEEKLY

EPIDEMIOLOGICAL RECORDS, 1997). Em 1992, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um plano de ação global para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública, tendo como principal arma a poliquimioterapia (PQT). Em 1985, antes da implementação da PQT em larga escala, 122 países apresentavam taxas de prevalência acima de 1 caso/10.000 habitantes. Após a implementação global da PQT, a taxa de prevalência da hanseníase tem diminuído em todo mundo, sendo que o número de países com prevalência de 1 caso/10.000 habitantes diminuiu de 122 em 1985 para 55 no começo de 1997. O problema tem se tornado cada vez mais focal, com 16 países destacando-se como endêmicos, onde se concentram 91% dos problemas referentes a hanseníase no mundo. Apesar da eficácia do tratamento com a PQT, a dificuldade de se cobrir, com esse tratamento, toda a população infectada, tornou-se um dos principais impedimentos do cumprimento da meta de eliminação da hanseníase, prevalência menor de 1 caso/10.000 habitantes, até o ano 2000 (NOORDEEN, 1995).

O Brasil ocupa o segundo lugar em número de casos de hanseníase no mundo, suplantado apenas pela Índia. A situação brasileira é alarmante pelo fato de haver aqui a maior taxa de prevalência mundial (6,56 casos/10.000 habitantes), acompanhada de uma tendência de aumento da doença (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORDS, 1997). No Brasil a população mais afetada é a da região Norte e a menos afetada, a da região Sul. Desde a região mais rica até a mais pobre, a prevalência, detecção e porcentagem de crescimento anual da hanseníase são altas, configurando-se num dos nossos principais problemas de saúde pública.

INTRODUÇÃO

1. Resposta imunitária na hanseníase, com ênfase à auto-imunidade

A resposta imunitária em pacientes hansenianos produz um surpreendente contraste entre os pólos de manifestação da doença, com uma profunda anergia ou ausência de resposta imunitária específica para o *M. leprae* no pólo virchowiano e uma forte resposta de células T no pólo oposto, tuberculóide. Ainda há muitas controvérsias e debates sobre a anergia que ocorre nesta doença, no entanto alguns modelos têm emergido. O modelo mais discutido e mais citado tem sido o da dicotomia existente entre células T. Várias subpopulações do compartimento imune celular estão envolvidas na resposta ao *M. leprae* (CHOUDHURI, 1995). Sabe-se que numa resposta imunitária específica o mediador central é a célula T CD4, responsável por distintos padrões de citocinas, padrões esses que poderiam correlacionar-se com o espectro da doença. As células T CD4⁺ “helper” (Th) 1 produzem IFN- γ , linfotóxina e interleucina (IL-) 2 e promovem predominantemente a imunidade mediada por células; as células Th2 que produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, promovem forte resposta de anticorpos, incluindo IgE, e inibição de várias funções dos macrófagos (MOSMANN et al., 1986; MOSMANN & COFFMAN, 1989a; 1989b). Na hanseníase, a efetiva ativação de macrófagos através de resposta Th1 permitiria o controle da infecção observado no pólo tuberculóide; já a indução de citocinas Th2 — que reduz a produção de IFN- γ , TNF, IL-1 e IL-6 — possibilitaria a persistência e replicação do *M. leprae* dentro de macrófagos, levando à doença multibacilar e disseminada (CHOUDHURI, 1995). O paradigma Th1/Th2, deduzido de estudos em modelos murinos tem motivado o uso de citocinas na terapia da hanseníase. O uso de IL-2 e IFN- γ em lesões de pacientes virchowianos, resulta na reconstituição da DTH, na diminuição na carga bacilar e

na recuperação da atividade citotóxica (KAPLAN, 1993; 1994; SAMPAIO et al., 1996).

Numa resposta predominantemente Th2, como a que se assume ocorrer no polo virchowiano da hanseníase, há intensa ativação policlonal de linfócitos B, o que pode gerar anticorpos contra antígenos próprios (auto-anticorpos) (CHOUDHURI, 1995; COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1995).

Auto-anticorpos anti-proteínas citoplasmáticas e ácidos nucleicos, constituem uma das principais características do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e doenças relacionadas (CHRISTIAN & ELKON, 1986). Além disso, auto-anticorpos estão envolvidos na patogênese das doenças reumáticas ou nas lesões obtidas em animais que foram induzidos a desenvolver auto-imunidade (SCHWARTZ, R.S., 1994). Entretanto, na hanseníase a presença de auto-anticorpos não tem sido relacionada às manifestações clínicas específicas, exceto quando ocorrem depósitos de imunocomplexos (COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1995). Além disso, parece haver comprometimento auto-imune de nervos periféricos, cuja destruição é responsável pelas deformidades próprias da hanseníase. O mecanismo da injúria neural não é completamente entendido; sabe-se que células Schwann são importantes reservatórios de infecção, e apresentam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II. Alguns estudos têm apontado para a proteína de estresse de 70 kDa (hsp70) de *M. leprae* — com 47% de identidade com a de mamíferos — como um antígeno que poderia desencadear resposta celular e quebrar o estado de tolerância para a proteína hsp70 do hospedeiro. Fato similar ocorre em modelos animais onde a proteína de estresse de 65 kDa de micobactéria produz artrite auto-imune, com clones de células T

artritogênicas. A apresentação de peptídeos dessa proteína por células de Schwann para células T poderia gerar resposta imunitária celular e humoral contra o nervo, e contribuir para a neurite observada em pacientes hansenianos (CHOUDHURI, 1995).

Os auto-anticorpos na hanseníase aparecem em diferentes padrões que variam de acordo com a população estudada, os métodos usados e os períodos em que foram avaliados. Diversos auto-anticorpos tem sido descritos em pacientes hansenianos, principalmente os virchowianos; dentre eles o fator reumatóide (GIBSON et al., 1994; COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1997), fator anti-nuclear (GARCIA-DE LA TORRE, 1993), anti-tiroglobulina, anti-músculo liso, anti-cardiolipina, anti-colágeno I e II, bem como falsa reação positiva para sífilis, que indicam a presença de anticorpos anti-fosfolípidos e/ou uma reação cruzada com componentes antigênicos da micobactéria (COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1995; GUEDES-BARBOSA et al., 1996).

2. 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, do monitoramento da eficácia da quimioterapia e do estudo da epidemiologia da infecção, justifica as tentativas de padronização de métodos de investigação laboratorial da infecção pelo *M. leprae*.

Um dos primeiros ensaios sorológicos utilizando o *M. leprae* como antígeno foi o da detecção de anticorpos anti-*M. leprae* utilizando-se imunofluorescência como marcador de reação, sendo incluída uma etapa preliminar de absorção dos soros a serem testados com *M. bovis* cepa BCG e *M. vaccae* (FLA-ABS) (ABE et al., 1980). O teste foi positivo em 100% dos pacientes baciloscopicamente positivos 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. Recentemente esse ensaio e outras técnicas de sorodiagnóstico foram avaliadas por uma equipe internacional. Concluiu-se que o FLA-ABS demonstra sensibilidade de 70,6 a 82,4% e especificidade de 83%. Apesar de ser um marco no sorodiagnóstico para hanseníase, seu uso ficou restrito à detecção de infecção subclínica na população (GUPTE, 1996).

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido (CHO et al., 1983), utilizando o antígeno altamente específico do *M. leprae*, o glicolípido fenólico I (PGL-I) natural ou seus sacarídeos análogos sintéticos. Este ELISA é o teste mais amplamente empregado com resultados comparados entre diversos laboratórios. Entre 70 e 100% dos pacientes multibacilares apresentam anticorpos anti-PGL-I, enquanto que esses anticorpos ocorrem de forma muito variável entre os pacientes paucibacilares (GUPTE, 1996; KLATSER et al., 1996). Os títulos de anticorpos anti-PGL-I diminuem com o curso da quimioterapia em pacientes bacilíferos (CHATURVEDI et al., 1991; CHO et al., 1991; ROCHE 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 (mais de 6 mm de induração) os títulos eram baixos.

Ainda utilizando o antígeno PGL-I foram feitas outras tentativas de sorodiagnóstico da hanseníase, aplicáveis a estudos epidemiológicos, correspondentes aos testes hemaglutinação passiva (PETCHLAI 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; 1989; SINHA et al., 1985; ASHWORTH et al., 1986; MWATHA et al., 1988).

Outro estudo sorológico da hanseníase refere-se a detecção de anticorpos específicos para o complexo antigênico 85 de *M. bovis* BCG. Este complexo é separado por isoeletrofocalização, 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; 1994).

Graças a possibilidade de 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 detecção de *M. leprae* em amostras obtidas de pacientes hansenianos (GILLIS & WILLIAMS, 1991; JOB et al., 1997). É possível utilizar a PCR para o diagnóstico da hanseníase, a partir de diferentes tipos de amostras clínicas (SANTOS et al., 1993; 1997). Detecção de

portadores nasais de *M. leprae* em populações nas quais a hanseníase é endêmica, contribui para a teoria de uma ocorrência disseminada do *M. leprae* nessas populações, além de aumentar a chance de se detectar precocemente a hanseníase (KLATSER et al., 1993; JOB et al., 1997).

3. Reação de Rubino

Setenta anos atrás, o médico uruguaio Miguel C. Rubino (RUBINO, 1926a), enquanto trabalhava com reações de fixação de complemento para o diagnóstico de sífilis usando hemácias formolizadas, notou que entre aproximadamente oitocentos soros testados, um induzia rápida sedimentação das hemácias e clarificação do sobrenadante. Esse fenômeno, não observado anteriormente por Rubino, o levou a determinar a origem do soro e identificá-lo como uma amostra de paciente hanseniano.

Rubino passou então a (1) estudar a natureza da reação, (2) padronizá-la, (3) determinar as condições em que ocorre e (4) aplicá-la a um grande número de soros de diferentes origens (RUBINO, 1926b; 1929; 1931a; 1931b; 1931c). Ele reproduziu o fenômeno em 84% de 38 soros de pacientes com hanseníase, observando hemossedimentação em menos de uma hora (RUBINO, 1929). Observou-se haver soros de indivíduos não hansenianos causando sedimentação acelerada de hemácias formolizadas (em tempo menor ou igual a uma hora); entretanto esses soros, ao contrário do soros de pacientes hansenianos, também sedimentavam hemácias naturais (não formolizadas). Rubino concluiu que a reatividade dos soros de pacientes hansenianos era caracterizada por um comportamento diferente na presença de hemácias formolizadas ou de naturais (RUBINO, 1929; 1931b; 1931c). As observações de

Rubino foram consideradas indicativas da especificidade da reação, positiva somente em pacientes hansenianos. Houve apenas uma exceção dentre 300 soros testados, referente à positividade de um soro de paciente com filariose; entretanto, o paciente foi considerado suspeito de estar concomitantemente infectado por *M. leprae* (RUBINO, 1931a).

Os trabalhos pioneiros de Rubino motivaram o estudo da reação por diversos investigadores. MARCHOUX & CARO (1928), testaram 10 soros de pacientes hansenianos e obtiveram 50% positividade, sem ocorrência de reações inespecíficas. LUZ (1929) detectou 44% de reações positivas entre soros de pacientes com hanseníase, com ausência de reação inespecífica. BIER & ARNOLD (1935) obtiveram somente uma reação positiva entre 954 soros de indivíduos não hansenianos. Em 1929, RUBINO relatou que ele já havia testado mais de 2.000 soros de indivíduos sadios ou com outras patologias, não observando reação positiva em nenhum soro. Evidências indicativas da especificidade absoluta acumularam-se nos anos seguintes (MONACELLI, 1928; ACANFORA, 1930; FIGUEIREDO, 1931; ADANT, 1932; AMBROGIO, 1932; FURTADO & LEITE, 1932; HOMBRIA, 1932; LEPINE et al., 1932; TRAVASSOS, 1932; ZEVALLOS, 1932; FLEURI-DA-SILVEIRA & MESQUITA, 1933; ROCA-DE-VIÑALS, 1934; BIER & ARNOLD, 1935; BESTA & MARIANI, 1936; IMBERT, 1936). A não realização de contraprova com hemácias naturais parece ter sido responsável pelo relato de inespecificidade da reação feita por alguns autores (PAULLIER & ERRECART, 1926; PELTIER, 1928; AMIES, 1930; SPANNEDA, 1932).

A natureza da reação de Rubino foi extensivamente estudada por MARCHOUX & CARO (1928) que atribuíram-na à presença de um fator

específico presente no soro de pacientes hansenianos que era seletivamente adsorvido à superfície da hemácia formolizada. Observaram ainda que a adsorção desse fator específico requeria a participação de um segundo fator, presente até mesmo em soro humano normal, e que hemácias formolizadas podiam destituir completamente o soro de hanseniano da substância ativa. Eles relataram que não foi possível isolar o fator específico por solubilização do fator adsorvido à superfície das hemácias formolizadas.

Foram feitas algumas suposições referentes às bases físicas da reação de Rubino. RUBINO (1929) considerou que a reação corresponderia a uma aglutino-sedimentação das hemácias formolizadas, de mesma natureza que as aglutinações microbianas e as soro-floculações. 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. Apesar 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.

Todos os estudos realizados invariavelmente indicavam que (1) a reação de Rubino era absolutamente específica, (2) sua sensibilidade era baixa e variável, e (3) sua positividade ocorria somente quando o diagnóstico de hanseníase já estava implícito. Essas características limitaram sua aplicabilidade como auxílio diagnóstico, um fato que justifica o intervalo de quase três décadas de ausência de estudos sobre a reação de Rubino.

Em 1962, ALMEIDA demonstrou a ausência de correlação entre a

positividade da reação de Rubino e atividade anti-complementar de soros de pacientes hansenianos. Durante o mesmo ano, CURBAN publicou uma completa revisão da literatura, onde enfatizava a importância desse teste, não mais como uma ferramenta de diagnóstico, mas como um campo inexplorado que poderia contribuir para a compreensão da resposta imune na hanseníase.

Em 1970, ALMEIDA, em uma revisão sobre sorologia em hanseníase, referiu-se ao fator responsável pela reação de Rubino como uma gama-globulina, não sendo correspondente aos anticorpos fixadores de complemento que reconheciam uma preparação antigênica de *M. tuberculosis*. O mesmo autor demonstrou mais tarde que a reação era inibida quando feita na presença de preparações antigênicas de *M. leprae* ou mesmo outras, mas não todas, micobactérias (ALMEIDA & KWAPINSKI, 1974; ALMEIDA, 1978).

SILVA et al. (1976a; 1976b; 1976c) estudaram 60 pacientes com hanseníase da forma clínica virchowiana e 16 com a forma clínica tuberculóide e observaram que a reação de Rubino era invariavelmente negativa entre os pacientes tuberculóides, enquanto alcançava 50% de positividade entre pacientes virchowianos. Estudando 178 soros de pacientes hansenianos, OPRMOLLA et al. (1982) confirmaram a negatividade dos soros de pacientes com a forma tuberculóide e relataram 9% de positividade entre os pacientes "borderlines". Em relação aos soros de virchowianos e de indivíduos clinicamente curados, obtiveram 55% e 6% de reações positivas, respectivamente. Essas observações foram confirmadas pelo mesmo grupo, através de expansão do estudo, originando a proposta de existência de uma relação inversa entre a positividade da reação de Rubino e a resistência do hospedeiro ao *M. leprae* (ARRUDA et al., 1983); o grupo sugeriu ainda que a reação de Rubino pudesse

ser incluída nos critérios de avaliação de cura da doença. A aplicabilidade da reação de Rubino como critério de cura, anteriormente proposta (OPROMOLLA et al., 1982), foi afastada pela posterior detecção de positividade em 57% de pacientes clinicamente curados (ARRUDA et al., 1988).

Certos estudos foram implicitamente baseados na procura de correspondência entre o fator Rubino e componentes específicos do soro de pacientes com hanseníase virchowiana. Foram observados hipergamaglobulinemia entre pacientes virchowianos e aumento dos níveis de IgM, somente em soros Rubino positivos (SILVA et al., 1976a; 1976b). Detectou-se fator reumatóide em pacientes virchowianos, mas sua presença não se associava à positividade da reação de Rubino. Anticorpos anti-tiroglobulina foram detectados somente em soros de pacientes Rubino positivos (SILVA et al., 1976c). Um estudo subsequente demonstrou que a positividade da reação de Rubino não correlacionava-se com mudanças no níveis séricos de IgG e IgM, uma observação interpretada como indicativa da independência entre a reação de Rubino e esses isotipos de imunoglobulinas (ARRUDA et al., 1987).

O fator específico responsável pela reação de Rubino (fator Rubino) foi identificado como uma imunoglobulina do isotipo M (PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1995). O fator Rubino/IgM foi isolado de um "pool" de soros obtidos de 20 pacientes com hanseníase virchowiana. Nesses soros detectaram-se níveis de IgM maiores do que os de indivíduos normais, porém similares a de 20 outros soros de pacientes virchowianos, Rubino negativos. Anticorpos anti-IgM bloquearam a atividade Rubino de soro positivo ou do fator purificado. A obtenção do fator Rubino/IgM purificado permitiu a inequívoca demonstração da necessidade de um co-fator, presente até mesmo em soro humano normal, para a

reação se processar (PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1996).

O novo investimento de esforços na identificação de fatores responsáveis pelo desencadeamento da reação de Rubino, cujos resultados são ora apresentado, foi motivado pela expectativa de que eles estivessem envolvidos nos fenômenos que tornam não responsivos os indivíduos acometidos de hanseníase virchowiana.

OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização do co-fator sérico e do ligante eritrocitário envolvidos na sedimentação acelerada de hemácias de carneiro formolizadas (reação de Rubino), e estudar como esses componentes interagem com o fator desencadeador da sedimentação, o fator Rubino/IgM.

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 incubado à 56°C por 30 min para inativação de proteínas do sistema complemento e submetido à reação de Rubino; aqueles com reação positiva e que não continham heteroaglutininas foram reunidos num "pool" único, que foi a fonte do fator Rubino/IgM. "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.

2. Hemácias de carneiros

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 e 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/mm³. A essas hemácias foi acrescentado formaldeído (concentração final 10%, v/v). Após um período de 48 horas, à temperatura ambiente, as hemácias foram lavadas e novamente ressuspensas em solução salina 0,85%. Hemácias naturais para a detecção de heteroaglutininas foram obtidas pelo mesmo procedimento, excetuando-se o tratamento com formaldeído. A suspensão de hemácias formolizadas foi mantida à 4°C enquanto a suspensão de hemácias naturais foi imediatamente preparada antes do uso (RUBINO, 1929;

1931b).

3. Reação de Rubino

Reação de Rubino foi realizada com todos os soros ou frações séricas oriundas do processo de purificação e processada através do contato do material a ser testado ou respectivo controle com as hemácias de carneiro formolizadas (1,75 a 2×10^8 células) por 1 h à 37°C, num volume final de 250 µl. Cada soro, ou fração sérica, foi testado na diluição final de 1/5. Considerou-se positiva a reação que resultou em sobrenadante claro e hemácias formolizadas sedimentadas (RUBINO, 1931b; RUBINO, 1931c). Quando testadas as frações séricas, o meio foi suplementado com soro humano normal (SHN) (diluição final de 1/3) para garantir a presença do co-fator sérico envolvido na reação de Rubino (MARCHOUX & CARO, 1928). As amostras a serem testadas quanto à presença do co-fator (atividade co-fator) foram incubadas com fator Rubino/IgM purificado e hemácias formolizadas, por 1 hora à 37°C.

4. Inibição da reação de Rubino

Amostras de soro Rubino positivo foram incubadas (1 h à 37°C) com soro de coelho anti-IgG humana em concentrações que variaram de 10 ng/ml a 4 mg/ml, com componentes de superfície de hemácias, com soros de coelhos anti-co-fator na diluição final de 1/5, com um painel de açúcares (D-glicose, D-galactose, D-manose, α -L-fucose, α -D-fucose, β -D-metil-galactopiranosose, α -metil-galactopiranosose, α -D-metil-manopiranosídeo, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactosamina, ácido N-acetil-neuramínico, ácido glucorônico, maltose, lactose, melibiose, sacarose) em concentrações que variaram de 1 a 100 mM, ou com

cardiolipina nas concentrações que variaram de 2 ng/ml a 2 mg/ml. As amostras foram incubadas com hemácias formolizadas (como descrito no item 3), procurando-se observar inibição da reação de Rubino.

5. Precipitação do fator Rubino/IgM com polietileno glicol

“Pool” de soros Rubino positivos e amostras do processo de purificação do fator Rubino/IgM (item 8) foram submetidos a precipitação com polietileno glicol 4.000 (HAO et al., 1980) na concentração final de 10% (m/v), a partir de uma solução estoque a 20% (m/v) do reagente. As misturas foram mantidas sob agitação constante por toda a noite, à 4°C, sendo posteriormente centrifugadas a 10.000g por 10 minutos. Os precipitados obtidos desses processos foram ressuspensos ao volume inicial com PBS (tampão fosfato 10 mM com NaCl 150 mM pH 7,4) e ultradiafiltrado em membrana YM-30 (Amicon® Division, W.R. Grace & CO., Beverly, MA, USA) contra esse mesmo tampão.

6. Purificação do fator Rubino/IgM

Soro Rubino positivo, soro humano normal, precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo — todos destituídos de heteroaglutininas, utilizados na diluição final 1/2 — e PBS foram incubados com excesso de hemácias de carneiro formolizadas (7 a 8×10^8 células), por 1 hora à 37°C. A incubação do precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo foi realizada na presença e ausência de SHN (1/10). O sobrenadante de cada amostra foi submetido mais duas vezes ao mesmo procedimento, estando destituída, no final de reatividade Rubino. As hemácias proveniente dos três contatos foram lavadas 3 vezes com PBS, sendo, após a última lavagem, ressuspensas em solução de ácido acético 100 mM NaCl

150 mM, e incubadas por 15 min à 0°C (TERNYNCK et al., 1991). Após centrifugação das hemácias, recolheram-se os sobrenadantes, neutralizando-os com Tris-HCl 1 M pH 8,0. Esse processo foi repetido mais uma vez. Os sobrenadantes obtidos foram ultradiafiltrados em membrana YM-30 contra PBS, precipitados com polietileno glicol (conforme descrito no item 4), testados quanto a reação de Rubino e analisados por eletroforese e “immunoblotting”.

7. Purificação do co-fator sérico da reação de Rubino

Precipitação com polietileno glicol

“Pool” de soro humano normal foi incubado três vezes, consecutivamente, com papa hemácias de carneiro naturais por 2 h à 37°C, objetivando-se retirar possíveis heteroaglutininas. Esse “pool” foi submetido à precipitação seriada com polietileno glicol 4.000 (HAO et al., 1980) na concentração de 5%, 12% e 20%, a partir de uma solução estoque a 40% do reagente. As misturas foram mantidas sob agitação constante por toda a noite, à 4°C, sendo posteriormente centrifugadas a 10.000g por 10 minutos. Entre uma etapa e outra de precipitação, uma alíquota do sobrenadante foi guardada para ser testada. Os sobrenadantes (sobrenadante 5%, sobrenadante 12% e sobrenadante 20%) e precipitados (precipitado 5%, precipitado 5 a 12% e precipitado 12 a 20%) obtidos desse processo foram ressuspensos ao volume inicial com PBS e ultradiafiltrados em membrana YM-30 contra esse mesmo tampão. Essas amostras foram testadas quanto a atividade co-fator, sendo a amostra positiva utilizada como fonte de co-fator.

Precipitação com ácido perclórico

“Pool” de soro humano normal (100 ml) foi submetido a precipitação com

ácido perclórico na concentração final de 1,75%, a partir de uma solução estoque a 70% do reagente. A mistura foi mantida sob agitação constante por 15 minutos à 4°C, sendo posteriormente centrifugada a 10.000g por 5 minutos (PRICE et al., 1996). O precipitado obtido desse processo foi neutralizado com Tris-HCl 1 M pH 8,0, ressuspensão para 10 ml com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e ultradiafiltrado em membrana YM-30 contra esse mesmo tampão. A amostra obtida foi utilizada como fonte de co-fator.

Cromatografia de afinidade em coluna de heparina imobilizada

Amostra obtida da precipitação de soro humano normal com ácido perclórico foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de heparina-imobilizada (volume leito de 1 ml) (Pierce Chemical Co., Rockford, USA) (MCNEIL et al., 1990), à 4°C. O material não adsorvido à coluna foi retirado com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, enquanto o material adsorvido foi eluído com o mesmo tampão contendo 0,4 M de NaCl. Todas as frações (2 ml cada) tiveram determinada a absorbância em 280 nm (DU®-70 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA). O material não ligado foi recromatografado 5 vezes. Os materiais adsorvidos e eluídos dos seis procedimentos cromatográficos foram colecionados em um “pool”.

Cromatografia de afinidade em coluna de proteína A e G imobilizadas

A amostra obtida da precipitação de SHN com PEG na faixa de 12 a 20% e a amostra obtida da precipitação de SHN com ácido perclórico, seguida de cromatografia de afinidade em coluna de heparina imobilizada, foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de proteína A (Amersham Pharmacia

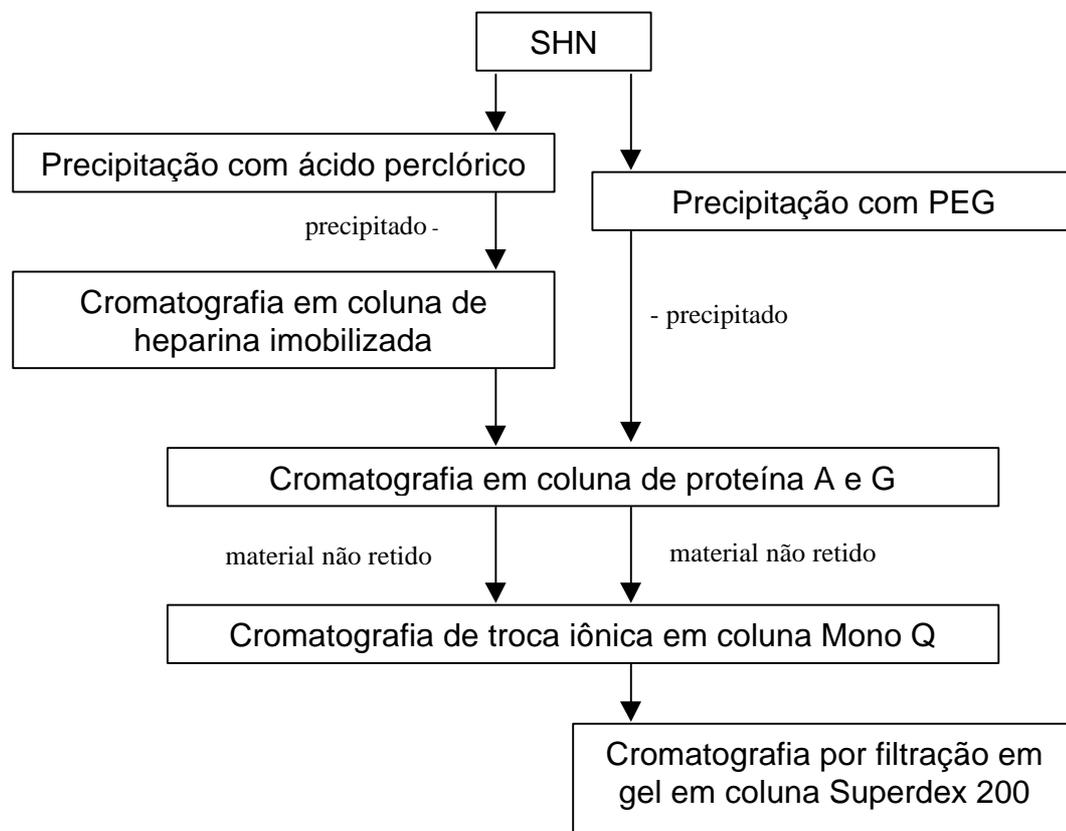
Biotech, Uppsala, Sweden). Utilizou-se Tris-HCl 20 mM NaCl 0,5 M pH 7,2 para equilibrar a coluna e eluir o material não adsorvido. O material adsorvido foi eluído com tampão glicina-HCl 100 mM pH 2,5 e neutralizado com Tris-HCl 1 M pH 8,0. Todas as frações (2 ml cada) das cromatografias tiveram determinada a absorbância em 280 nm. Os materiais não ligados foram colecionados em "pools" e submetidos à cromatografia de afinidade em proteína G-agarose, nas mesmas condições descritas para proteína A-agarose. Os materiais não ligados às colunas foram ultradiafiltrados contra Tris-HCl 20 mM pH 8,0, em membrana YM-30, testados quanto à atividade co-fator, conforme descrito no item 3, e submetidos à cromatografia de troca iônica.

Cromatografia de troca iônica

Materiais não ligados às colunas de proteína A e G em tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), foram submetidos à cromatografia de troca aniônica (HIMMELOCH, 1971) em coluna Mono Q® HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), equilibrada e inicialmente eluída com 15 ml de tampão A, à temperatura ambiente, com fluxo de 1 ml/min. Gradiente (30 ml) de força iônica crescente (até 1 M de NaCl) foi utilizado na eluição dos materiais retidos na coluna. O volume de cada fração coletada foi de 1 ml. As corridas foram monitorizadas pela absorbância 280 nm (Variable Wavelength Monitor, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) e pela reação de Rubino, onde utilizou-se aproximadamente 10% de cada fração. Do material eluído que tornou a reação de Rubino positiva selecionaram-se as frações 19 e 20, que foram reunidas em um "pool" único, ultradiafiltrados em membrana YM-30 contra Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7,4 e concentrados para um volume de 400 µl.

Cromatografia por filtração em gel

Material com atividade co-fator (em Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7,4) obtido por troca aniônica, foi submetido à filtração em gel em coluna Superdex® 200 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), equilibrada e eluída com o mesmo tampão da amostra, fluxo de 0,5 ml/min, coletando-se frações de 1 ml. Determinaram-se a absorbância 280 nm e reatividade Rubino, utilizando-se aproximadamente 10% do volume de cada fração. A coluna havia sido previamente calibrada (ANDREWS, 1965) com azul de dextran 2000 (BD, ~2.000 kDa) e proteínas de massas moleculares (MM) conhecidas (tiroglobulina - Tir, 669 kDa; ferritina - Fer, 440 kDa; catalase - Cat, 232 kDa; aldolase - Ald, 158 kDa; albumina sérica bovina - BSA, 67 kDa; albumina de ovo de galinha - Ova, 43 kDa; quimiotripsinogênio - Cmt, 25 kDa; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).



Esquema 1: Esquema de purificação do co-fator sérico da reação de Rubino.

8. Análise eletroforética e “immunoblot”

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida (10 ou 12,5%) em condições dissociantes (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), em sistema "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA). Amostras foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,5 com SDS a 2% (m/v) e aplicadas no gel. Algumas amostras foram adicionalmente reduzidas por mercaptoetanol a 3,5% (m/v). As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 40 minutos (80-120 mA, 200 V). Os géis foram corados pelo método da prata (BLUM et al., 1987). Em uma das pistas de cada eletroforese foi aplicado uma mistura de marcadores com MM conhecidas: fosforilase B (97 kDa), soro albumina bovina (67 kDa), albumina de ovo de galinha (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), lactoalbumina (14,4 kDa) (Pierce Chemical Co., Rockford, USA).

As eletrotransferências de diferentes amostras, cujos componentes protéicos haviam sido separados por SDS-PAGE, para membrana de nitrocelulose foram feitas em cuba contendo Tris 24 mM, glicina 198 mM, pH 8,3, e 10% de metanol, por 1,5 hora (85-135 mA, 150 V - "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System", GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) (TOWBIN et al., 1987). As membranas de nitrocelulose foram incubadas com bloqueador [gelatina a 3% em PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T)] por 2 h à temperatura ambiente, sendo a seguir lavadas 3 vezes com PBS-T. Quando o material separado e transferido foi o co-fator, incubou-se a membrana com soro Rubino positivo (diluído 1/100 no bloqueador), por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e incubada com IgG de cabra anti-IgM humana conjugada à peroxidase (diluído 1/2500 no bloqueador) por 1 h à temperatura ambiente. Já o

fator Rubino separado e transferido para nitrocelulose foi incubado somente com IgG de cabra anti-IgM humana conjugada à peroxidase (diluído 1/2500 no bloqueador), por 1 h à temperatura ambiente. A reação antígeno-anticorpo foi detectada com diaminobenzidina (DAB) (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA) na presença de peróxido de hidrogênio 0,03% (Sigma® Chemical Company, St. Louis, USA).

As eletrotransferências das bandas protéicas obtidas por SDS-PAGE da amostra purificada de co-fator para membrana de PVDF (polivinil difluoreto) (Imobilon™, Millipore, Bedford, MA, USA) foram feitas em cuba contendo tampão CAPS (CAPS 10 mM, metanol 10%, pH 11), por 2 horas à temperatura ambiente (85-135 mA, 150 V - "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System", GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) (TOWBIN et al., 1987).

9. Produção e purificação de anticorpos anti-co-fator da reação de Rubino

Imunização do coelho

Dois coelhos da raça New Zealand, com peso corporal médio de 2,5 kg, seis meses, receberam 3 doses de 100 µg do co-fator [bandas de 50 kDa obtidas do gel 10% (SDS-PAGE)]. Na primeira preparação o antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund e injetado intramuscularmente. Nas duas doses seguintes (21 e 28 dias após a primeira injeção), o antígeno foi emulsificado em adjuvante incompleto de Freund e injetado subcutaneamente. Oito dias após a última injeção os animais foram sangrados.

Precipitação com sulfato de amônia

Soro de coelho anti-co-fator (30 ml – item 14) foi submetido a precipitação

com solução saturada de sulfato de amônia na concentração final de 45%, por 3 horas à 4°C. Após centrifugação, 10.000g por 10 min, o precipitado foi ressuspenso para o volume inicial (30 ml) em água, sendo o processo repetido mais duas vezes. O precipitado final foi ressuspenso em 30 ml de PBS e ultradiafiltrado em membrana YM-30, contra o mesmo tampão.

Cromatografia de afinidade em coluna de proteína A

A amostra obtida da precipitação do antissoro de coelho com sulfato de amônia foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de proteína A. Utilizou-se Tris-HCl 20 mM NaCl 0,5 M pH 7,2 para equilibrar a coluna e eluir o material não adsorvido. O material adsorvido foi eluído com tampão glicina-HCl 100 mM pH 2,5 e neutralizado com Tris-HCl 1 M pH 8,0. Todas as frações (2 ml cada) da cromatografia tiveram determinada a absorvância em 280 nm. Dialisou-se o material eluído contra PBS, sendo a concentração protéica determinada através da relação entre absorvância em 280 nm e o coeficiente de extinção da IgG (10 mg/ml de IgG = 13,6 de absorvância em 280 nm).

10. Seqüenciamento dos aminoácidos N-terminais e identificação do co-fator da reação de Rubino

Bandas de 50 kDa (identificada como co-fator da reação de Rubino) obtidas de 8 pistas, correspondentes ao material com atividade co-fator, foram recortadas e submetidas ao seqüenciamento de aminoácidos pela degradação automática de Edman (EDMAN, 1950a; 1950b; TARR et al., 1986), em um seqüenciador construído no Centro de Química de Proteínas, FMRP, USP (gentilmente seqüenciada por José César Rosa do Centro de Química de

Proteínas, FMRP, USP).

A proteína sérica identificada a partir do seqüenciamento, como correspondente ao co-fator foi purificada por protocolo convencional (PRICE et al., 1996) e essa nova preparação, após comprovação da atividade de co-fator, foi submetida ao seqüenciamento de aminoácidos pela degradação automática de Edman (EDMAN, 1950a; 1950b; TARR et al., 1986), em um seqüenciador automático de proteína (Applied Biosystems Procise Sequencer - modelo 491, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA) (gentilmente seqüenciada por José César Rosa do Centro de Química de Proteínas, FMRP, USP).

A identificação e comparação das seqüências obtidas foram realizadas através do sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), empregando o programa blastp.

11. Clivagem por brometo de cianogênio (GROSS & WITKOP, 1962)

Aproximadamente 400 µg de co-fator purificado foi dialisado contra água e seco (Heto Vac, Heto Lab Equipment A/S, Birkerød, Denmark). À proteína seca adicionamos 1 ml de uma solução de brometo de cianogênio a 0,2 M em ácido fórmico 70%. Após 18 horas à 37°C, adicionou-se água (9 ml) à solução. O material foi liofilizado e novamente ressuspenso em 1 ml de água, sendo utilizado 10% dessa amostra para análise eletroforética (experimento desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).

12. Biotinilização do fator Rubino/IgM e b₂-glicoproteína I

Fator Rubino/IgM (200 µg/ml) foi obtido como descrito no item 5 (purificação

do fator Rubino/IgM). β_2 -glicoproteína I (100 $\mu\text{g/ml}$) foi obtida pela precipitação com ácido perclórico, depleção de IgG pela passagem em coluna de proteína A e G imobilizadas, cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose e cromatografia de troca iônica em coluna de MonoQ®. Ambas as amostras foram divididas em duas alíquotas de 1 ml, sendo uma alíquota dialisada contra PBS (fatores não marcados) e outra contra tampão carbonato 100 mM pH 8,5. Às alíquotas em tampão carbonato adicionaram-se 10 μl NHS-SS-biotina (10 mg/ml) por 30 min à 4°C, sob agitação constante. Logo após as amostras (fatores marcados) foram ultradiafiltradas em membrana YM-30 contra PBS para remoção do excesso de biotina.

13. Citometria de fluxo

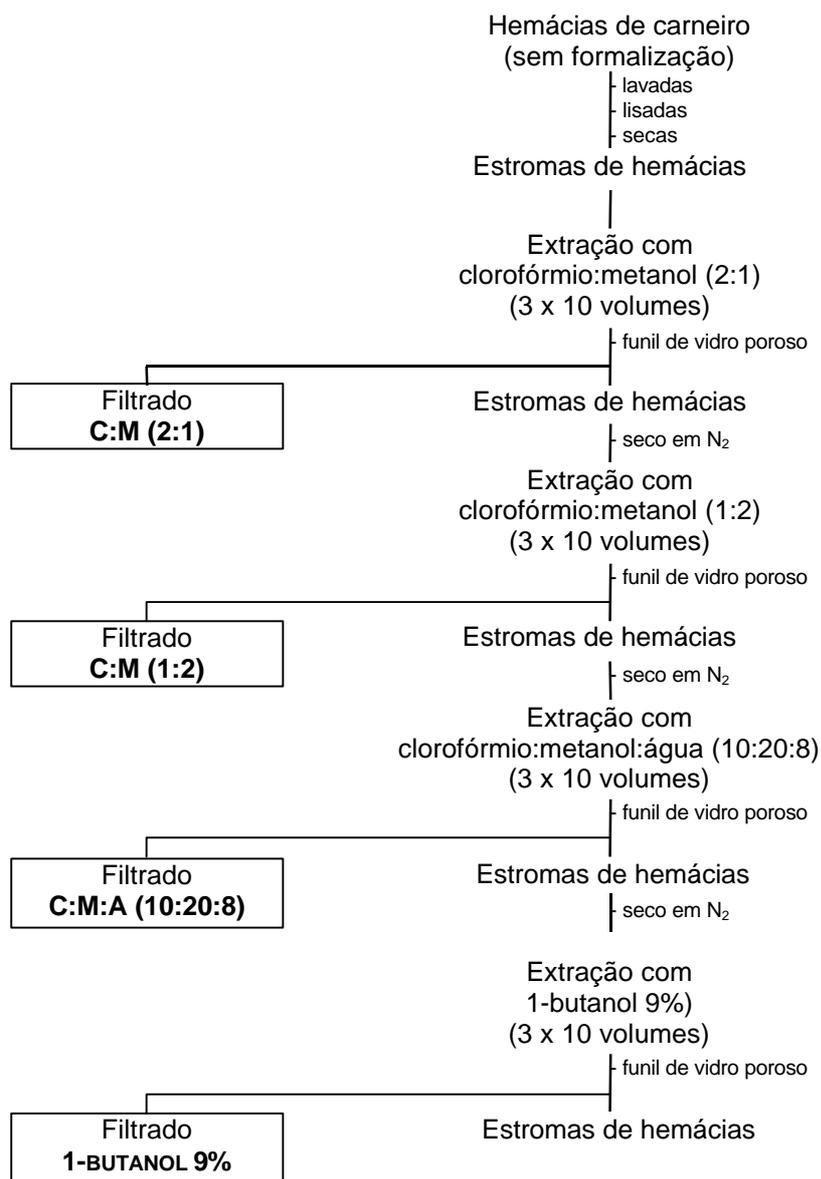
Fator Rubino/IgM biotilado (200 $\mu\text{g/ml}$) foi incubado na presença e ausência de β_2 -glicoproteína I (100 $\mu\text{g/ml}$) com avidina-ficoeritrina (20 $\mu\text{g/ml}$) (Pierce Chemical Co., Rockford, USA) e hemácias formolizadas (4×10^6 células), num volume final de 250 μl . Ao mesmo tempo β_2 -glicoproteína I biotilada (100 $\mu\text{g/ml}$) foi incubada — na presença, ou não, de fator Rubino/IgM (200 $\mu\text{g/ml}$) — com avidina-ficoeritrina (20 $\mu\text{g/ml}$) (Pierce Chemical Co., Rockford, USA) e hemácias formolizadas (4×10^6 células), num volume final de 250 μl . As hemácias foram lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas para concentração de 1×10^6 hemácias/ml. Hemácias formolizadas foram selecionadas por tamanho e granulosidade em citometria de fluxo, sendo a auto-fluorescência dessas células usada como controle. Todas as análises foram realizadas em FACSort (Becton and Dickinson, San Jose, USA).

14. Preparação de estromas de hemácias naturais

Hemácias de carneiro sem tratamento com formaldeído (obtidas a partir de 1 litro de sangue), foram lavadas 3 vezes com PBS, e ressuspensas em 10 litros de solução de ácido acético glacial a 0,04% em água (v/v) (KABAT & MAYERS, 1961), sendo mantidas toda a noite com agitação constante, à 4°C. Os estromas de hemácias, obtidos por decantação, foram lavados em tampão acetato 1 mM pH 4,2. Realizaram-se duas lavagens finais com água.

15. Extração de componentes de estromas de hemácia

Antes da extração, os estromas foram secos (Heto-Vac, Heto Lab Equipment A/S, Birkerød, Denmark). A extração foi feita em quatro passos: (1) clorofórmio: metanol (2:1 - v/v), (2) clorofórmio: metanol (1:2 - v/v), (3) clorofórmio: metanol:água (10:20:8 - v/v) e (4) 1-butanol 9% (Esquema 1). Em cada passo foram realizadas três extrações de 2 horas cada, à temperatura ambiente, com os sobrenadantes das extrações separados em funil de vidro poroso. Os estromas foram secos com fluxo de nitrogênio, entre cada passo. As três amostras obtidas foram agrupadas, secas e posteriormente ressuspensas em 20 ml de clorofórmio: metanol (2:1 - v/v). Uma alíquota (1 ml) dos produtos de extração foi seca e ressuspensa em água, sendo o processo repetido duas vezes. Essas alíquotas foram ressuspensas no final com 1 ml de PBS. Essas preparações (diluição final de 1/2, 1/5, 1/10 e 1/50) foram sonicadas e incubadas com soro Rubino positivo (diluição final 1/10) por 1 h à 37°C; logo após, foram incubadas com hemácias formolizadas, procurando-se observar inibição da reação de Rubino.



Esquema 2: Esquema de extração de componentes de hemácias de carneiro com mistura de solventes orgânicos.

16. Partição de Folch

À fração extraída de estromas de hemácias com clorofórmio: metanol (1:2), volume final de 40 ml [em C:M (2:1)], foram adicionados 8 ml de solução aquosa de KCl 0,1 M (0,2 volumes). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada separar à 4°C. Após a separação, as fases foram colecionadas separadamente (FOLCH et al., 1957). À fase inferior ou orgânica (26 ml) foi adicionado metanol: solução aquosa de KCl 0,1M (1:1; v/v) (20 ml - substituindo a fase aquosa),

agitando-se vigorosamente e deixando-se separar, à 4°C. Após separação das fases, repetiu-se o processo mais uma vez (SCHNAAR, 1994). A fase orgânica foi seca e ressuspensa em 6 ml de clorofórmio: metanol (2:1). Uma alíquota de 2 ml desta mistura foi seca novamente e posteriormente ressuspensa em 0,5 ml de PBS. A fase aquosa foi seca, ressuspensa e dialisada contra PBS em membrana YM-3. O material dialisado foi ressuspensa para um volume de 3 ml. Ambas as amostras em PBS (diluição final de 1/2, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100) foram sonicadas e incubadas com soro Rubino positivo (diluição final 1/5) por 1 h à 37°C, sendo, logo após, incubados com hemácias formolizadas, procurando-se observar inibição da reação de Rubino.

17. Cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC)

Uma fase móvel

Amostras [10 µl em clorofórmio:metanol (2:1)] foram aplicadas em forma de banda de 1 cm em uma placa Sílica-gel 30 (20 x 10 cm) (Merck, Darmstadt, Germany), a 1,5 cm de altura. Esta placa foi colocada em uma câmara de vidro saturada com o solvente do sistema (100 ml, aproximadamente 0,5 cm de altura). Quando o fronte atingiu 1 cm do fim da placa, esta foi retirada, seca e corada (SCHNAAR & NEEDHAM, 1994).

Duas fases móveis consecutivas

Amostras [10 µl em clorofórmio:metanol (2:1)] foram aplicadas em forma de banda de 1 cm em uma placa Sílica-gel 30 (Merck, Darmstadt, Germany), a 1,5 cm de altura. Esta placa foi colocada em uma câmara de vidro, saturada com a 1ª mistura de solventes orgânicos (100 ml, aproximadamente 0,5 cm de altura).

Quando o fronte atingiu 1 cm do fim da placa, esta foi retirada e seca. A placa foi novamente colocada em uma câmara de vidro, saturada, desta vez, com a 2ª mistura de solventes orgânicos (100 ml, aproximadamente 0,5 cm de altura). Quando o fronte atingiu 1 cm do fim da placa, esta foi retirada, seca e corada (FRIED & SHERMA, 1994).

Preparativas

Essas corridas foram processadas de forma similar à HPTLC unidimensional. A única diferença foi a quantidade de amostra aplicada na placa de Sílica-gel (20 x 10 cm), ou seja 100 µl em 18 cm de placa a 1,5 cm da parte de baixo da placa. Essas placas foram divididas em faixas, sendo a sílica, de cada faixa, raspada e ressuspensa em clorofórmio:metanol:água (10:10:1), para extração dos lipídios. O solvente orgânico foi coletado e o processo repetido mais uma vez com 10 ml da mistura de solventes (SCHNAAR, 1994). Os sobrenadantes foram reunidos, subseqüentemente divididos em duas alíquotas e secos. Uma alíquota foi usada para análises adicionais e a outra testada quanto a sua capacidade de inibir a reação de Rubino.

Protocolo de estudo dos lipídios com HPTLC

Amostra obtida da fase orgânica da partição de Folch foi submetida a HPTLC unidimensional com uma fase móvel e HPTLC preparativa nas mesmas condições. O mistura usada foi clorofórmio :metanol: água (60:30:8). Baseado nos Rf de bandas, obtiveram-se lipídios de 7 faixas da placa [(1) 0 a 0,25; (2) 0,25; (3) 0,25 a 0,35; (4) 0,5; (5) 0,5 a 0,75; (6) 0,75; e (7) 0,75 a 1]. Esses Rf foram obtidos pela fórmula: $R_f = \text{distância percorrida pelo lipídio} / \text{distância}$

percorrida pelo solvente (frente).

Os lipídios obtidos das faixas que apresentavam capacidade de inibir a reação de Rubino, foram submetidos a HPTLC com duas fases móveis consecutivas. A primeira corrida foi realizada com acetona:éter etílico (1:3) e a segunda com clorofórmio: metanol: ácido acético: água (60:50:1:4). Baseado nas bandas visualizadas com vapor de iodo, obteveram-se lipídios de 6 faixas da placa [(1) 0 a 0,12; (2) 0,12 a 0,31; (3) 0,31 a 0,52; (4) 0,52 a 0,72; (5) 0,72 a 0,86; (6) 0,86 a 1]. Os lipídios obtidos de cada faixa foram testados quanto à capacidade de inibir a reação de Rubino.

Visualização dos lipídios

Utilizaram-se 3 formas de visualização dos lipídios na placa de HPTLC. (1) Pulverização da placa com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico 2 M, seguindo-se aquecimento a 130°C (em estufa) por aproximadamente 5 minutos; (2) pulverização da placa com ácido sulfúrico 2 M, seguindo-se aquecimento à 130°C (em estufa) por aproximadamente 5 minutos; e (3) manutenção da placa em câmara com vapor de iodo (SCHNAAR & NEEDHAM, 1994; FRIED & SHERMA, 1994). Somente a última coloração é reversível.

18. Ensaio imunoenzimático em microplaca

"Cell-ELISA"

Placas de poliestireno com 96 poços (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, USA) foram ativadas com glutaraldeído 0,1% em PBS 10 mM pH 7,2, por toda a noite, à 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e a cada poço foram adicionadas hemácias de carneiro à 2% (100 µl de formolizadas ou

naturais/poço) em PBS; as placas foram centrifugadas a 1.000 rpm por 1 minuto, e as monocamadas de hemácias de carneiro foram tratadas com glutaraldeído 1% (100 µl/poço), à temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem com PBS e enxágüe com etanol 70%, foi adicionado metanol com peróxido de hidrogênio a 5% (100 µl/poço). As placas foram incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente, e logo após lavadas 3 vezes com PBS. Essas placas foram secas e usadas imediatamente ou estocadas à -20°C (RAVINDRAN et al., 1988). Em algumas placas foram omitidas as etapas de enxágüe com etanol e incubação com metanol/H₂O₂.

Os poços das microplacas, contendo as monocamadas de hemácias de carneiro, foram bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS-tween 20 (0,05%) e incubados por 1 hora à 37°C com: (a) apenas fator Rubino/IgM purificado; (b) apenas precipitado PEG 12 a 20% de SHN, destituído de IgG; (c) fator Rubino/IgM e precipitado PEG 12 a 20% SHN, aplicados concomitantemente; (d) fator Rubino/IgM (1 h, à 37°C), seguindo-se lavagem dos poços e nova incubação com precipitado PEG 12 a 20% SHN (1 h, à 37°C); e (e) precipitado PEG 12 a 20% SHN (1 h, à 37°C), seguindo-se lavagem dos poços e nova incubação com fator Rubino/IgM (1 h, à 37°C). As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween 20 (0,05%) e incubadas (1 h, à 37°C) com anticorpo de cabra anti-IgM humana conjugado a peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Seguiram-se novas lavagens e revelação com peróxido de hidrogênio 1,25% e O-fenilenediamino (1 mg/ml) em tampão citrato, pH 5,5. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 8 N e a densidade óptica medida num leitor com filtro de 490 nm (MULTISKAN MMC/340 P Version 2.20) (RAVINDRAN et al., 1988).

Poços recobertos com as frações lipídicas de eritrócito de carneiro

As frações lipídicas obtidas dos estromas de hemácias (fração I, II, III e IV) foram diluídas de 1/2 a 1/512 em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6, sendo adicionadas alíquotas de 50 µl dessas frações a cada poço de placas de poliestireno para ELISA (FluoroNunc MaxiSorp, Nunc A/S, Roskild, Denmark) e mantidos por 18 h, à 4°C. As placas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), por 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T, e incubadas com fator Rubino/IgM suplementado ou não com precipitado PEG 12 a 20% SHN (fonte de co-fator), por 1 h à 37°C. Ambas as preparações foram diluídas 1/200 em PBS Tween 20 0,05% BSA 0,5% (PBS-TB) e incubadas previamente à adição aos poços por 2 h à 37°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgM humana conjugado a peroxidase (1/2.500 em PBS-TA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T; o excesso de líquido foi removido por inversão das placas em papel de filtro, seguindo-se adição de 50 ml do reagente quimioluminescente LumiPhos 530 (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) (diluído 1/10 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lidas em luminômetro (Cambridge, mod. 7710).

Poços recobertos com cardiolipina (GHARAVI et al., 1987)

Cardiolipina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) foi ajustada para a concentração de 50 µg/ml em etanol. Alíquotas de 50 µl dessas frações foram adicionadas a cada poço de placas de poliestireno para ELISA e mantidos por

18 h à 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com gelatina a 1% em PBS-T, por 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com diversas diluições de soros de pacientes hansenianos Rubino positivos, negativos e soro humano normal (gelatina 1% / PBS-T), por 2 h à 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com IgG de cabra anti-IgM humana (1/2.500 em gelatina 1%/PBS-T) ou IgG de cabra anti-IgG humana marcadas com peroxidase (1/100) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Após 1 h de incubação, à 37°C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. A reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de 50 µl/poço de solução reveladora [água oxigenada (30 volumes, 40 µl) (Merck S.A., Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil), ortofenilendiamino (10 mg) (Sigma Chemical Company, MO, USA), ácido cítrico 0,1 M (6,075 ml), fosfato de sódio bibásico 0,2 M (6,425 ml) (Merck S.A., Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil) e água destilada (12,5 ml)], com incubação por 10 minutos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M. A leitura de absorbância feita em comprimento de onda 490 nm.

RESULTADOS

1. Novo processo de purificação do fator Rubino/IgM

Purificação do fator Rubino/IgM

O fator Rubino/IgM havia sido previamente purificado por processos de precipitação (PEG a 5%) e cromatográficos (cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A-Sepharose, cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q[®] e, cromatografia por filtração em gel em coluna Superose[®] 6) (PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1995). Tentou-se agora utilizar a propriedade do fator Rubino/IgM de ligar-se à superfície de hemácias para purificar o fator de forma alternativa. Para tanto promoveu-se o contato de fração sérica contendo o fator — precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo — com hemácias de carneiro formolizadas. Ainda que o contato não tivesse provocado a esperada sedimentação acelerada das hemácias, tentou-se eluir possível fração adsorvida à superfície eritrocitária com tratamento ácido. O ensaio da atividade Rubino do eluato foi negativo, mesmo quando se forneceu co-fator da reação, através da adição de SHN. A hipótese de que o co-fator fosse necessário não apenas para propiciar a sedimentação acelerada das hemácias, mas também para a interação do fator Rubino/IgM com a superfície da célula, foi então investigada. Hemácias formolizadas foram incubadas com uma das seguintes preparações: (1) soro humano normal, (2) soro Rubino positivo, (3) precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo e (4) precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo suplementado com SHN. Sedimentação acelerada foi desencadeada apenas pelas preparações (2) e (4). Novamente utilizou-se o tratamento ácido para eluir eventual fração adsorvida às hemácias, em cada um dos procedimentos. O ensaio da atividade Rubino de cada eluato, na presença de SHN, proporcionaram resultados positivos no caso dos eluatos provenientes das

preparações (2) e (4) (tabela 1). A contraposição entre a ausência de reatividade Rubino do eluato proveniente de precipitado não suplementado (3) e a positividade com o eluato proveniente de precipitado suplementado (4) é indicativa da participação ativa do co-fator, contido mesmo em soro humano normal, na interação do fator Rubino/IgM com a hemácia. Assim, essa padronização de purificação do fator Rubino/IgM por adsorção às hemácias, evidenciou não apenas a viabilidade dessa estratégia, como também o requerimento do co-fator para a ligação do fator Rubino/IgM a componentes da superfície do eritrócito.

TABELA 1. *Atividade Rubino dos eluatos ácidos de hemácias formolizadas sensibilizadas com diferentes preparações.*

Eluato ácido de hemácias formolizadas sensibilizadas com	Reação de Rubino
Soro Rubino positivo	+
Ppt. PEG 10% de Rubino positivo suplementado com SHN	+
Ppt PEG 10% de Rubino positivo sem suplementação	—
Soro humano normal	—

Hemácias de carneiro formolizadas foram incubadas com diferentes preparações, por 1 h à 37°C. Após centrifugação e lavagem as hemácias foram ressuspensas em tampo ácido (contato 15 min à 0°C), centrifugadas e os sobrenadantes neutralizados e dialisados contra PBS. Os materiais eluídos das hemácias foram suplementados com SHN e submetidos a reação de Rubino.

Análise da homogeneidade do fator Rubino/IgM purificado por afinidade a hemácias formolizadas

Avaliou-se, em seguida, por critérios eletroforéticos, a homogeneidade do fator Rubino/IgM eluído de hemácias formolizadas. Para tanto, uma preparação foi obtida a partir do contato das hemácias com soro Rubino positivo; o eluato ácido foi precipitado com polietileno glicol 10%. Paralelamente, como controle, reproduziu-se o procedimento substituindo o soro Rubino positivo por soro

humano normal (SHN) ou PBS. O procedimento experimental propiciou a recuperação da atividade Rubino no material purificado; esta preparação, bem como as preparações controle Rubino negativas, foram submetidas à análise eletroforética. Em condições redutoras, duas bandas foram proeminentemente reveladas (figura 1A). A de migração mais rápida, correspondente a 28 kDa, foi compartilhada pelas preparações experimental (pista **c**) e controle (pistas **a** e **b**), tratando-se, provavelmente, de hemoglobina. A banda de menor migração era exclusiva da preparação ativa (pista **c**) e sua massa molecular — 70 kDa — compatível com a cadeia pesada de IgM. A confirmação dessa hipótese foi proporcionado por "immunoblot" que mostrou ser a banda de 70 kDa reconhecida por anticorpos anti-IgM humana (figura 1B).

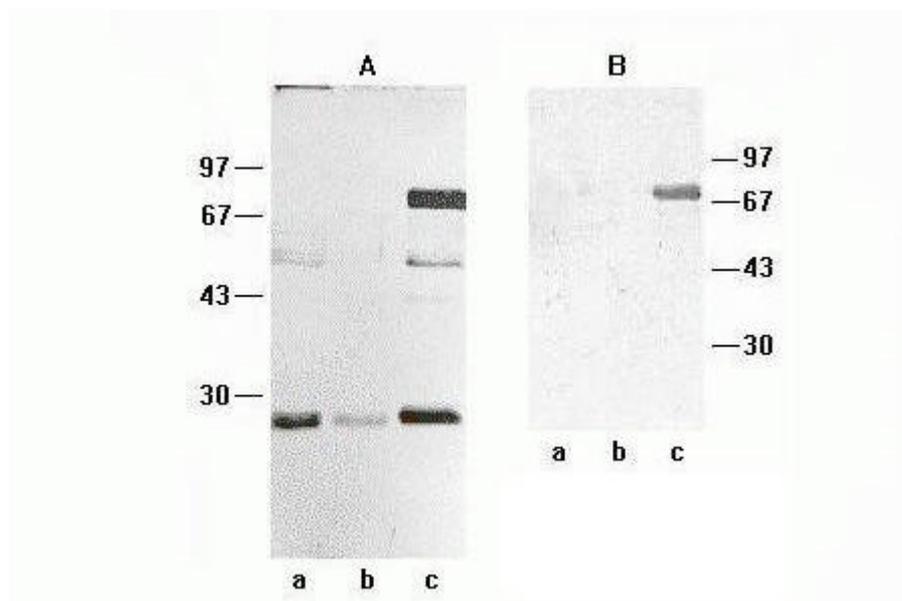


FIGURA 1 SDS-PAGE (10%) e "immunoblotting" das preparações desadsorvidas de hemácias formolizadas incubadas com (a) soro humano normal, (b) PBS e (c) soro Rubino positivo. Todas as amostras foram submetidas a tratamento redutor com mercaptoetanol. O gel foi corado pelo método da prata (A). Os materiais separados por eletroforese foram transferidos para nitrocelulose, incubados com IgG anti-cadeia μ de IgM humana marcado com peroxidase (B). A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

2. Estudo do ligante da hemácia envolvido na reação de Rubino

Sugestão da natureza lipídica do ligante

A busca de identificar e mensurar, através de metodologia de sensibilidade alta, a contribuição de cada uma das interações envolvidas na reação de Rubino levou à utilização do “cell-ELISA”. Nesse procedimento o revestimento celular dos poços da microplaca é submetido a tratamento com metanol. As hemácias formolizadas e tratadas que revestiam os poços não eram reconhecidas pelo fator Rubino/IgM, ainda que em presença de co-fator; foram reconhecidas, entretanto, por anticorpos anti-hemácia. Como as preparações de fator Rubino/IgM e co-fator eram ativas no teste convencional, em tubo, pensou-se que o ligante da superfície celular pudesse ter sido solubilizado da monocamada de hemácias na etapa de tratamento com metanol. Essa hipótese foi reforçada por duas observações adicionais, feitas a partir de ensaio em tubo: (1) hemácias formolizadas, após tratamento com solventes orgânicos — clorofórmio/metanol ou metanol — deixaram de ser aceleradamente sedimentadas por fator Rubino/IgM e co-fator; e (2) a tripsinização de hemácias formolizadas não interferiu na sedimentação acelerada provocada pelo fator Rubino/IgM e co-fator. Esse conjunto de resultados foi considerado sugestivo de que o ligante do fator Rubino/IgM na superfície da hemácia tivesse natureza lipídica.

Inibição da reação de Rubino com uma fração extraída de estromas de hemácias naturais

Para a investigação da natureza lipídica do ligante de hemácias, tentou-se extraí-lo através de tratamento com misturas de solventes orgânicos. Procederam-se extrações seriadas de estromas de hemácias de carneiro,

produzindo 4 frações: fração I - extraída com clorofórmio:metanol (2:1), fração II - extraída com clorofórmio:metanol (1:2), fração III - extraída com clorofórmio:metanol:água (10:20:8) e fração IV - extraída com 1-butanol 9%. A presença do ligante, em cada fração, foi ensaiada por inibição da reação de Rubino. Somente a fração II foi capaz de inibir a reação de Rubino (tabela 2), demonstrando que o ligante eritrocitário é solubilizado por mistura de solventes orgânicos comumente usada para extração de lipídios.

TABELA 2: *Inibição da reação de Rubino por frações extraídas com solventes orgânicos da superfície de hemácias naturais.*

Frações Testadas	Extraída com	Inibição da Reação de Rubino
I	Clorofórmio:metanol (2:1)	-
II	Clorofórmio:metanol (1:2)	+
III	Clorofórmio:metanol:água (10:20:8)	-
IV	1-Butanol 9%	-

O efeito das frações I, II, III e IV sobre a reação de Rubino foi testado incubando cada fração com soro Rubino positivo, por 1 h à 37°C, seguindo-se incubação com hemácias de carneiro formolizadas, por 1 h à 37°C. Observou-se a ocorrência de inibição da reação de Rubino.

Ensaio imunoenzimático com as frações extraídas de estromas de hemácias naturais

Tencionando investigar se uma das frações extraídas das estromas de hemácias ligava-se especificamente aos fatores séricos envolvidos na reação de Rubino, poços de placas de ELISA foram revestidos com as diversas frações e incubados com fator Rubino/IgM suplementado ou não com co-fator. Somente a fração II reagiu com os fatores envolvidos na reação de Rubino (fator Rubino/IgM suplementado com o co-fator), determinando um claro efeito dose-resposta (figura 2). A reatividade foi reduzida em até 41% quando o fator Rubino/IgM não

foi suplementado com o co-fator. Supõe-se que o fator Rubino/IgM sozinho não seja capaz de desencadear a reação de Rubino, e que a reatividade observada seja atribuível à co-purificação de co-fator no isolamento do fator Rubino/IgM.

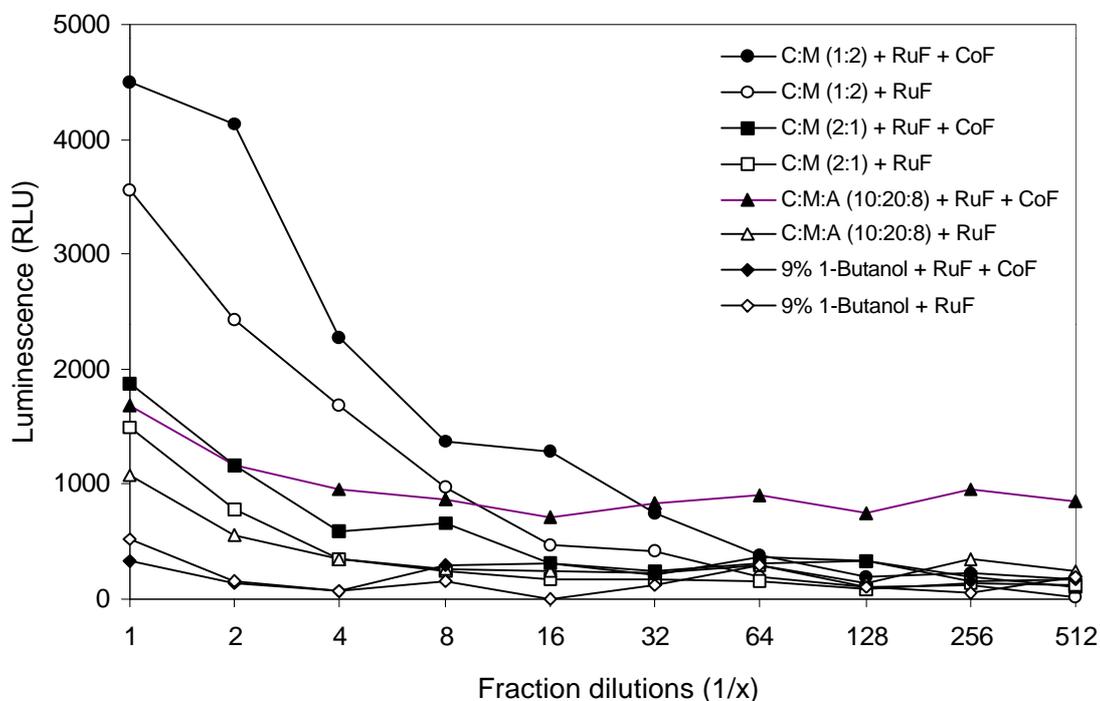


FIGURA 2: ELISA quimioluminescente das frações extraídas de estromas de hemácias de carneiro.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com frações extraídas de estroma de hemácias. Fração I, clorofórmio:metanol (2:1) [C:M (2:1)]; fração II clorofórmio:metanol (1:2) [C:M (1:2)]; fração III, clorofórmio:metanol:água (10:20:8) [C:M:A (10:20:8)]; e fração IV, 1-butanol 9%. As placas foram incubadas com fator Rubino/IgM suplementado (FR + CF - símbolos fechados) ou não (FR - símbolos abertos) com co-fator, sendo as reações reveladas com anticorpos anti-IgM humana marcados com peroxidase. As diluições das frações estão representada pela fórmula x^{-1} , onde x é o valor representado no eixo das abscissas.

Componentes de superfície de hemácias de carneiro extraídos com mistura de solventes orgânicos: perfil da separação por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC)

Os componentes do estroma de hemácias extraídos com clorofórmio:metanol (1:2) foram separados em cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC) (figura 3) com a fase móvel composta de clorofórmio:metanol:solução aquosa de CaCl_2 0,2% (60:30:8). A partir da

coloração com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico 2 M, observaram-se componentes corados em marrom, uma propriedade geral dos lipídios, desenvolvida em presença de ácido sulfúrico. Não se observou qualquer componente corado pelo orcinol (tonalidade rósea), que seria indicativa da presença de glicolípido.

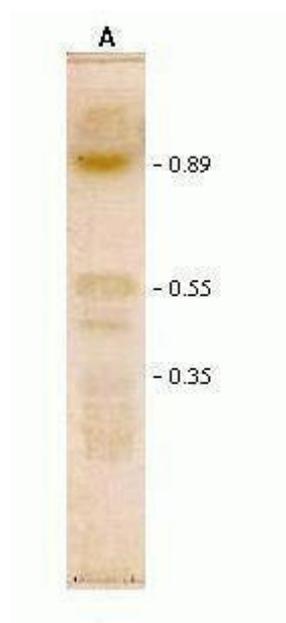


FIGURA 3 Cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) dos componentes de superfície de hemácias de carneiro extraídos com mistura de solventes orgânicos [(clorofórmio:metanol (1:2)]. A condição de corrida foi clorofórmio:metanol:solução aquosa de CaCl₂ 0,2% (60:30:8). O lipídios foram corados com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico 2 M.

Teste de inibição da reação de Rubino com açúcares

O fato de não serem detectados glicolípídios na fração contendo o ligante eritrocitário não era suficiente para eliminar a possibilidade de envolvimento de um glicoconjugado na reação de Rubino. Assim, tentou-se inibir a reatividade através de um painel de 11 monossacarídeos e de 4 dissacarídeos. Inibição da reação somente ocorreu com ácido N-acetil-neuramínico (NANA). Tal inibição foi

atribuída a um mero efeito de carga desse açúcar, uma vez que a reação de Rubino processada na presença de outro açúcar carregado negativamente, o ácido glucorônico, também foi inibida (dados não mostrados).

Isolamento do ligante da hemácia envolvido na reação de Rubino

O efeito inibitório exercido pelas cargas dos açúcares sobre a reação de Rubino motivou a pesquisa do envolvimento de gangliosídios — glicolipídios que apresentam pelo menos um resíduo de ácido siálico — nessa reação. Os componentes dos estromas de hemácias extraídos com clorofórmio:metanol (1:2) foram submetidos a partição de Folch (FOLCH, 1950; SCHNAAR, 1994) que proporciona uma fase aquosa rica em gangliosídios e uma fase orgânica, contendo os demais lipídios (SCHNAAR, 1994). A reação de Rubino, na presença desses materiais, mostrou que somente os lipídios da fase orgânica são capazes de inibir a reação de Rubino. A fase orgânica foi então separada por cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC) analítica e preparativa, nas mesmas condições de fase móvel descritas anteriormente [clorofórmio:metanol:solução aquosa de CaCl_2 a 0,2% (60:30:8)]. O material migrou todo para o frente da placa (dado não mostrado) e quando extraído da corrida preparativa mostrou-se capaz de inibir a reação de Rubino.

Uma vez que os açúcares carregados negativamente inibem a reação de Rubino e que os gangliosídeos não parecem corresponder ao ligante eritrocítico, procedeu-se uma HPTLC em condição adequada para separar fosfolipídios — um grupo de lipídios que apresentam carga negativa. Os lipídios extraídos da HPTLC preparativa descrita anteriormente, destituído de gangliosídeos, foram submetidos a HPTLC em 2 fases móveis consecutivas. Na primeira fase foi feito

um arraste de lipídios altamente apolares com acetona:éter etílico (1:3). Na Segunda, houve a separação propriamente dita, com clorofórmio: metanol: ácido acético glacial:água (60:50:1:4). Como visto na figura 4, houve boa resolução na separação dos lipídios. Essa placa preparativa foi dividida em seis faixas. Os lipídios extraídos de cada faixa da placa, foram testados em sua capacidade de inibir a reação de Rubino. Somente o material extraído da faixa 3, que correspondia ao Rf de 0,31 e 0,52, inibiu a reação de Rubino, indicando que o ligante eritrocítico envolvido na reação de Rubino correspondia a um fosfolípido.

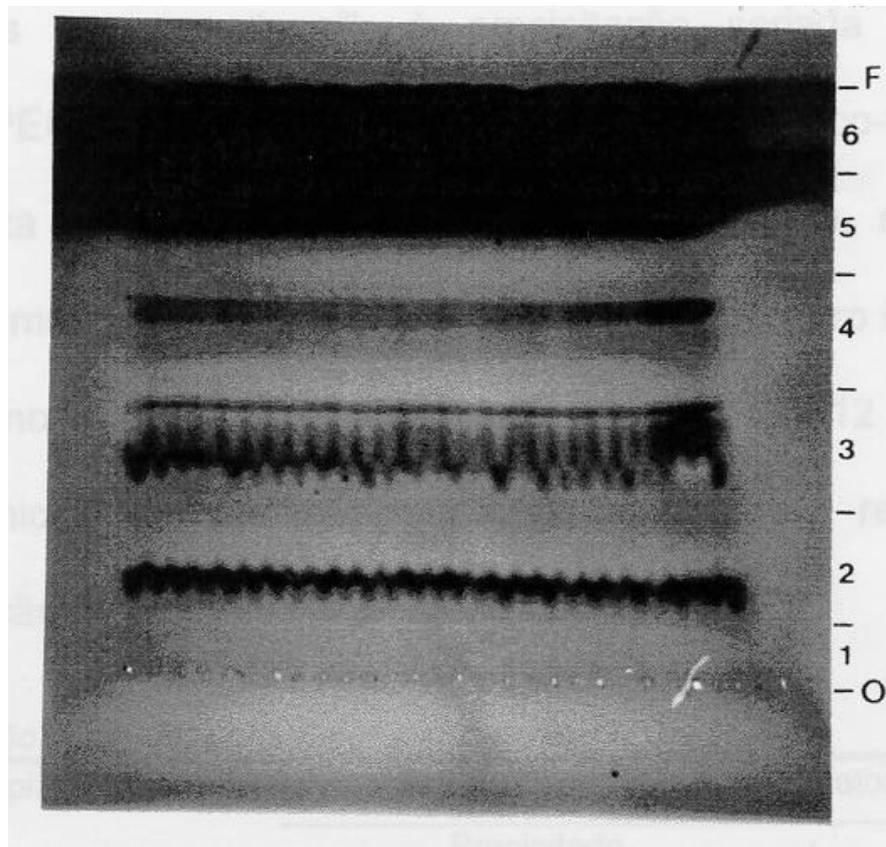


FIGURA 4: Cromatografia preparativa em camada delgada de alta resolução (HPTLC), dos lipídios inibidores da reação de Rubino extraídos da placa de HPTLC preparativa anterior. As condições da corrida foram: primeira corrida (arraste de lipídios fortemente apolares) - acetona:éter etílico (1:3), e segunda corrida (separação) - clorofórmio:metanol:ácido acético glacial:água (60:50:1:4). Os lipídios foram corados com vapor de iodo.

A identificação paralela do co-fator da reação de Rubino descrita a seguir, proporcionou uma segunda evidência — indireta — da natureza fosfolipídica do ligante eritrocítico envolvido na reação de Rubino.

3. Isolamento e caracterização do co-fator da reação de Rubino

Precipitação do co-fator com polietileno glicol (PEG)

Para que ocorra a reação de Rubino dois fatores séricos são requeridos: **fator Rubino/IgM**, que corresponde a IgM específica de pacientes hansenianos e um **co-fator**, de natureza desconhecida, presente em todos os soros, incluindo o de indivíduos normais. Os estudos desse co-fator foram iniciados submetendo-se SHN, colecionados em um "pool", à precipitação seriada com diferentes concentrações de PEG. Estabeleceu-se assim que a atividade co-fator do soro era recuperada na faixa de precipitação de 12 a 20% de PEG, sendo capaz de desencadear a sedimentação acelerada de hemácias de carneiro formolizadas sob efeito do fator Rubino/IgM (tabela 3). A precipitação com PEG 12 a 20% passou a constituir etapa inicial da purificação do co-fator sérico responsável pela positividade da reação de Rubino.

TABELA 3. *Precipitação com PEG do co-fator sérico da reação de Rubino*

Faixa de Precipitação (%)	Atividade co-fator	
	Precipitado	Sobrenadante
0 a 5	–	+
5 a 12	–	+
12 a 20	+	–

"Pool" de soros humanos normais foi precipitado seriadamente com PEG, sendo as preparações obtidas, dialisadas e incubadas com fator Rubino/IgM e hemácia formolizada, por 1 h à 37°C. Atividade co-fator foi observada nas amostras que tinham a capacidade de tornar positiva a reação de Rubino, ou seja, sedimentar aceleradamente hemácias formolizadas.

Purificação do co-fator

Na tentativa de purificar e caracterizar o co-fator, a precipitação com PEG foi seguida de procedimentos cromatográficos: destituição de IgG da amostra através de cromatografia de afinidade em proteínas A e G, cromatografia de troca aniônica e cromatografia por filtração em gel.

O precipitado PEG 12 a 20%, após adsorção em colunas de proteínas A e G, foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q[®]. Os materiais retardados foram eluídos com gradiente de NaCl variando de 0 a 1 M; a atividade co-fator foi eluída com 0,2 M de NaCl (figura 5).

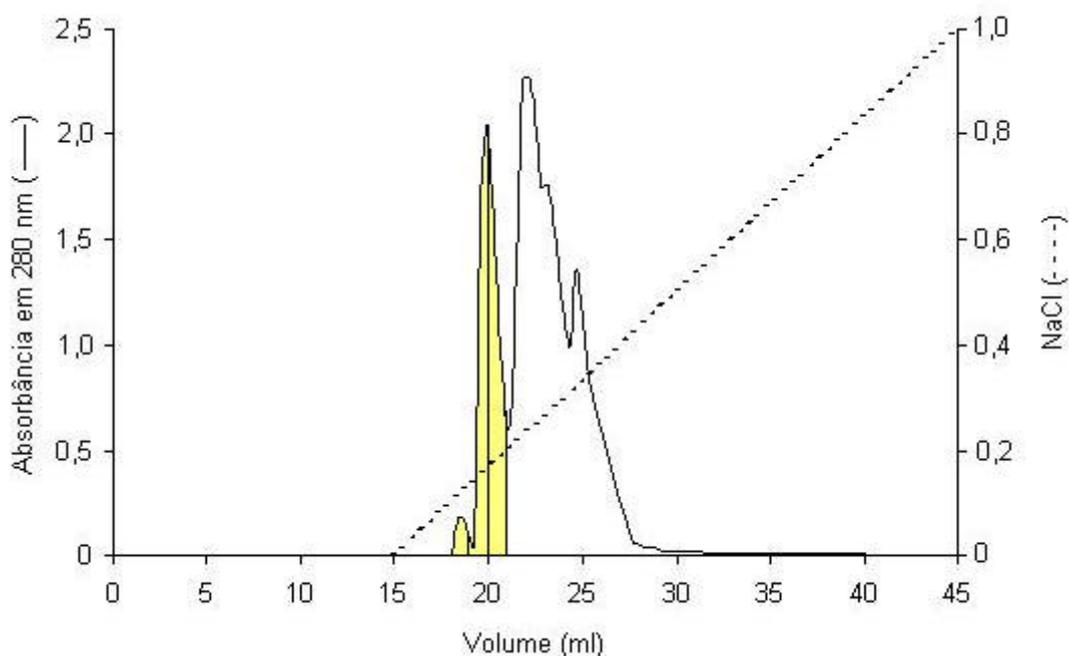


FIGURA 5: Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q[®] HR 5/5 (sistema FPLC), do precipitado PEG 12 a 20% de SHN, precipitado este destituído de IgG. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com 15 ml de tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0); fluxo de 1 ml/min, à temperatura ambiente. O material retido foi eluído através de gradiente (30 ml - linha tracejada) 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 μ l para determinação da presença do co-fator. O sombreado indica a fração com atividade co-fator, detectada conforme descrito no item 3 do capítulo Material e Métodos.

Das frações ativas da cromatografia de troca iônica selecionaram-se as de número 19 e 20. Reunidas, foram submetidas a cromatografia por filtração em gel em coluna Superdex® 200 (figura 6). Detectou-se um pico único de absorbância a 280 nm, no qual recuperava-se a atividade co-fator. O volume de eluição do material ativo era muito próximo ao da BSA (67 kDa).

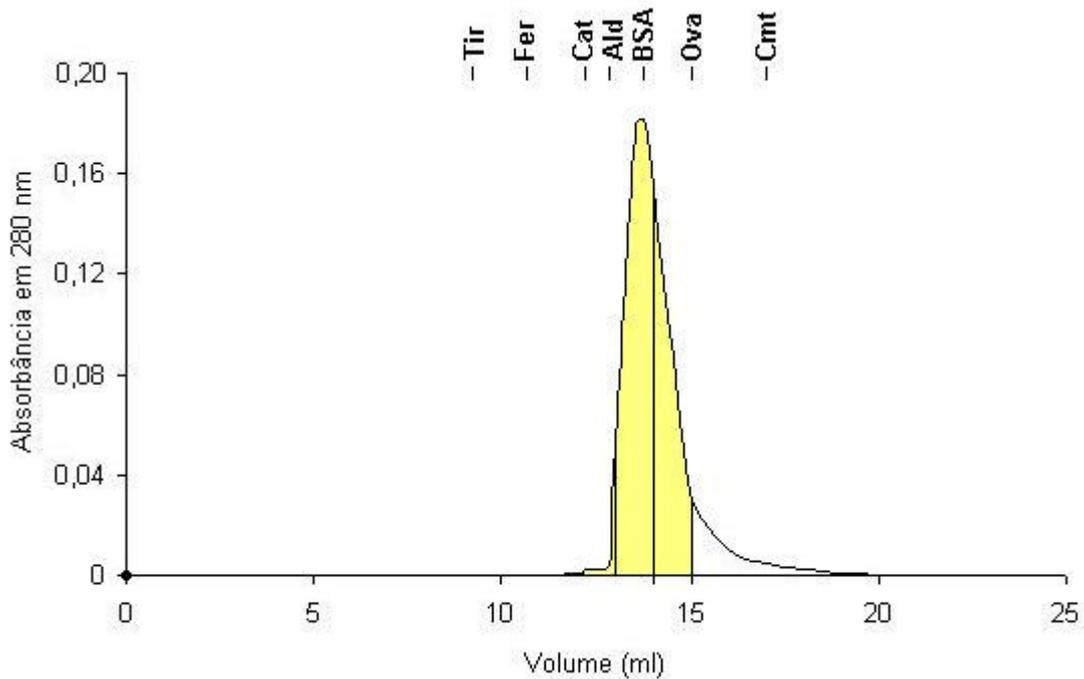


FIGURA 6: Filtração em gel em coluna Superdex® 200 HR 10/30 (sistema FPLC) das frações com atividade co-fator obtida da cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q®. Coluna equilibrada e eluída com Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7,4; num fluxo de 0,5 ml/min, à temperatura ambiente. A cromatografia foi monitorizada pela absorbância em 280 nm. De cada fração coletada (1 ml) foram retirados 100 µl para detecção da atividade co-fator (Material e Métodos, item 3). O sombreado indica a fração ativa. A coluna foi previamente calibrada com proteínas de PM conhecidos (tiroglobulina - Tir, 669 kDa; ferritina - Fer, 440 kDa; Catalase - Cat, 232 kDa; aldolase - Ald, 158 kDa; albumina sérica bovina - BSA, 67 kDa; albumina de ovo de galinha - Ova, 43 kDa; quimiotripsinogênio - Cmt, 25 kDa; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), cujos volumes de eluição estão assinalados na figura.

Análise eletroforética e “immunoblotting” do co-fator

Dentre as frações coletadas na última etapa do processo de purificação do co-fator (cromatografia por filtração em gel em Superdex® 200), selecionou-se o material eluído no volume de 14 ml para ser submetido à análise eletroforética.

Detectaram-se duas bandas principais cujas migrações correspondem a tamanhos moleculares de 70 kDa e 50 kDa (figura 7A, pistas **a**).

Tencionando-se identificar qual das duas bandas correspondia ao co-fator da reação de Rubino, e ao mesmo tempo definir se o fator Rubino/IgM liga-se ao co-fator, eletrotransferiram-se os componentes da fração 14, separados por SDS-PAGE, seguindo-se incubação com fator Rubino/IgM e revelação com anticorpo anti-IgM humana conjugado com peroxidase. O fator Rubino/IgM ligou-se apenas ao componente de 50 kDa (figura 7B, pista **b**).

A imunização de coelhos com fatia recortada do gel de poliacrilamida contendo a banda de 50 kDa, proporcionou anticorpos capazes de inibir a reação de Rubino, fenômeno não observado com soros controles ou soro pré-imune (dados não mostrados). Esse resultado vem contribuir com a indicação de correspondência entre o co-fator e proteína sérica de 50 kDa.

Análise da seqüência N-terminal do co-fator da reação de Rubino

Amostra com atividade co-fator (fração 14) obtida da última etapa do processo de purificação (cromatografia por filtração em gel em Superdex® 200), foi submetida a nova eletroforese e transferência para membrana de PVDF. A seqüência N-terminal (doze resíduos) da proteína de 50 kDa foi determinada (tabela 4). Excluindo-se as duas lacunas de resíduos não identificados (posições 4 e 11), houve 100% de identidade da proteína de 50 kDa com β_2 -glicoproteína I (também denominada apolipoproteína H) (figura 8). Tal resultado foi considerado relevante em função da descrição prévia de β_2 -glicoproteína I como dotada de propriedade ligante de fosfolípidios aniônicos — cardiolipina e fosfatidilserina — e como co-fator para ligação de anticorpos anti-fosfolípido (GALLI et al., 1990;

MATSUURA et al., 1990; MCNEIL et al., 1990).

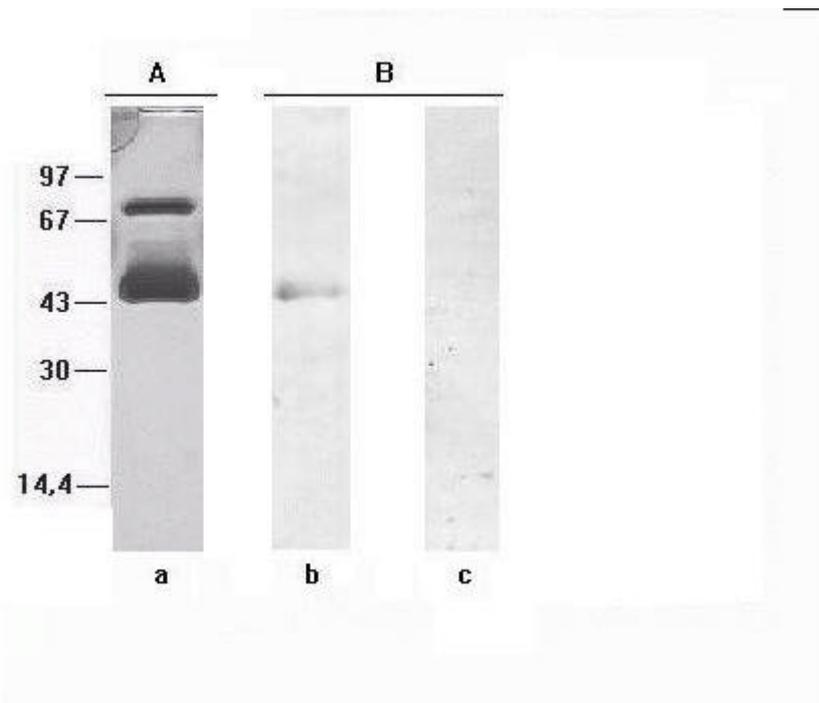


FIGURA 7 (A) SDS-PAGE 10% da fração 14 obtida da última etapa do processo de purificação do co-fator (cromatografia por filtração em gel em Superdex® 200) **(a)**. Gel corado pelo método da prata. **(B) “Immunoblotting” da fração 14.** Essa fração foi separada por eletroforese e transferida para nitrocelulose, incubada com fator Rubino/IgM purificado e anticorpo anti-IgM humana conjugado com peroxidase **(b)** ou incubada somente com anticorpo anti-IgM humana conjugado com peroxidase **(c)**. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

TABELA 4: Seqüência N-terminal do co-fator da reação de Rubino.

Ciclos	Seqüência	Quantidade (pmol)
1	Gly	28.47
2	Arg	23.20
3	Thr	4.82
4	X	—
5	Pro	16.83
6	Lys	11.10
7	Pro	20.07
8	Asp	13.00
9	Asp	16.00
10	Leu	11.48
11	X	—
12	Phe	3.27

Amostra: banda de 50 kDa (co-fator) em membrana de PVDF
Método: Edman

1 GRTXPKPDDLXF 12 — co-fator da reação de Rubino
GRT PKPDDL F
1 GRTCPKPDDL_LPF 12 — β_2 -glicoproteína I

gi | 250135 anticardiolipin cofactor, beta 2-glycoprotein I [human, Peptide Partial, 25 aa]
length = 25

Figure 8: Identificação e comparação de seqüências obtida pelo sistema BLAST¹ (Basic Local Alignment Search Tools). Homologia entre a seqüência de aminoácidos N-terminais do co-fator da reação de Rubino e a seqüência de aminoácidos da β_2 -glicoproteína I.

Análise da seqüência N-terminal de nova preparação do co-fator

A partir da identificação do co-fator da reação de Rubino como de β_2 -glicoproteína I, resolveu-se purificá-lo conforme procedimento convencional, descrito na literatura (precipitação de soro com ácido perclórico, cromatografia em coluna de heparina-Sepharose, destituição de IgG em coluna de proteínas A e G imobilizadas, e cromatografia em coluna de troca iônica) (PRICE et al., 1996). A preparação obtida apresentou atividade co-fator e sua análise eletroforética revelou banda única com massa molecular de 50 kDa (dados não mostrados). Ao contrário do seqüenciamento anterior, usou-se a proteína na forma solúvel. Dessa vez, o seqüenciamento N-terminal determinou os aminoácidos que ocupam as onze posições iniciais, revelando corresponder à prolina o resíduo da posição 11 (tabela 5). Confirmou-se assim a identidade do co-fator da reação de Rubino com β_2 -glicoproteína I (figura 9).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

TABELA 5: Seqüência N-terminal do co-fator da reação de Rubino.

Ciclos	Seqüência	Quantidade (pmol)
1	Gly	326,10
2	Arg	270,70
3	Thr	322,39
4	X	—
5	Pro	231,73
6	Lys	370,52
7	Pro	240,54
8	Asp	218,85
9	Asp	282,45
10	Leu	210,99
11	Pro	211,15

Amostra: β_2 -glicoproteína I (260 mg/ml)
Método: Edman

1 GRTXPKPDDL 11 — co-fator da reação de Rubino
GRT PKPDDL

1 GRTCPKPDDL 11 — β_2 -glicoproteína I

gi | 250135 anticardiolipin cofactor, beta 2-glycoprotein I [human, Peptide Partial, 25 aa]
length = 25

Figure 9: Identificação e comparação de seqüências obtida pelo sistema BLAST¹ (Basic Local Alignment Search Tools). Homologia entre a seqüência de aminoácidos N-terminais do co-fator da reação de Rubino e seqüência de aminoácidos da β_2 -glicoproteína I.

4. Interação entre fator Rubino/IgM, co-fator e ligante eritrocítico

Inibição da reação de Rubino por cardiolipina

Uma vez que o ligante eritrocítico envolvido na reação de Rubino corresponde a um fosfolípido e o co-fator da reação de Rubino a β_2 -glicoproteína I, uma proteína ligante de fosfolípido, considerou-se haver uma clara indicação de que a reação de Rubino é uma reação de anticorpos anti-fosfolípido dependente de β_2 -glicoproteína I. Baseados nesses resultados, resolveu-se testar a inibição da reação de Rubino com cardiolipina (difosfoglicerolípido). A inibição foi determinada pela concentração mínima de 2 μ g/ml (tabela 6), reforçando a

indicação de correspondência entre o ligante da hemácia envolvido na reação de Rubino e fosfolípido. Além disso, os resultados sugerem que a hemossedimentação acelerada seja desencadeada pela ligação de fator Rubino/IgM à β_2 -glicoproteína I, complexo esse fixado nas hemácias formolizadas através da ligação a fosfolípidios da superfície celular.

TABELA 6: *Inibição da reação de Rubino por cardiolipina.*

Tubo	Cardiolipina ($\mu\text{g/ml}$)	Inibição da reação de Rubino
1	2.000	+
2	200	+
3	20	+
4	2	+
5	0,2	-
6	0,02	-
7	0,002	-

Soro Rubino positivo (diluição final de 1/5) foi incubado com hemácias formolizadas ($1,5$ a 2×10^8 células) e cardiolipina em diversas concentrações, num volume final de $250 \mu\text{l}$, por 1 h à 37°C . Considerou-se positiva a reação que resultou em sobrenadante claro e hemácias formolizadas sedimentadas.

Ligação do co-fator e do fator Rubino/IgM às hemácias formolizadas

A mútua dependência do fator Rubino/IgM e co-fator/ β_2 -glicoproteína I na ligação à hemácia foi avaliada utilizando fator e co-fator purificados e biotinilados. Hemácias foram incubadas com fator e co-fator — onde apenas um desses componentes era biotinilado — e com conjugado avidina-ficoeritrina. A marcação celular reflete a ligação dos componentes a hemácia. A análise por citometria de fluxo (figura 10), evidenciou que a marcação era dependente da presença concomitante do fator e do co-fator, independentemente de qual deles era biotinilado (painéis C e D, linha azul). Observou-se fluorescência similar a do

controle (painel B) quando um dos componentes estava ausente (painéis C e D, linha preta).

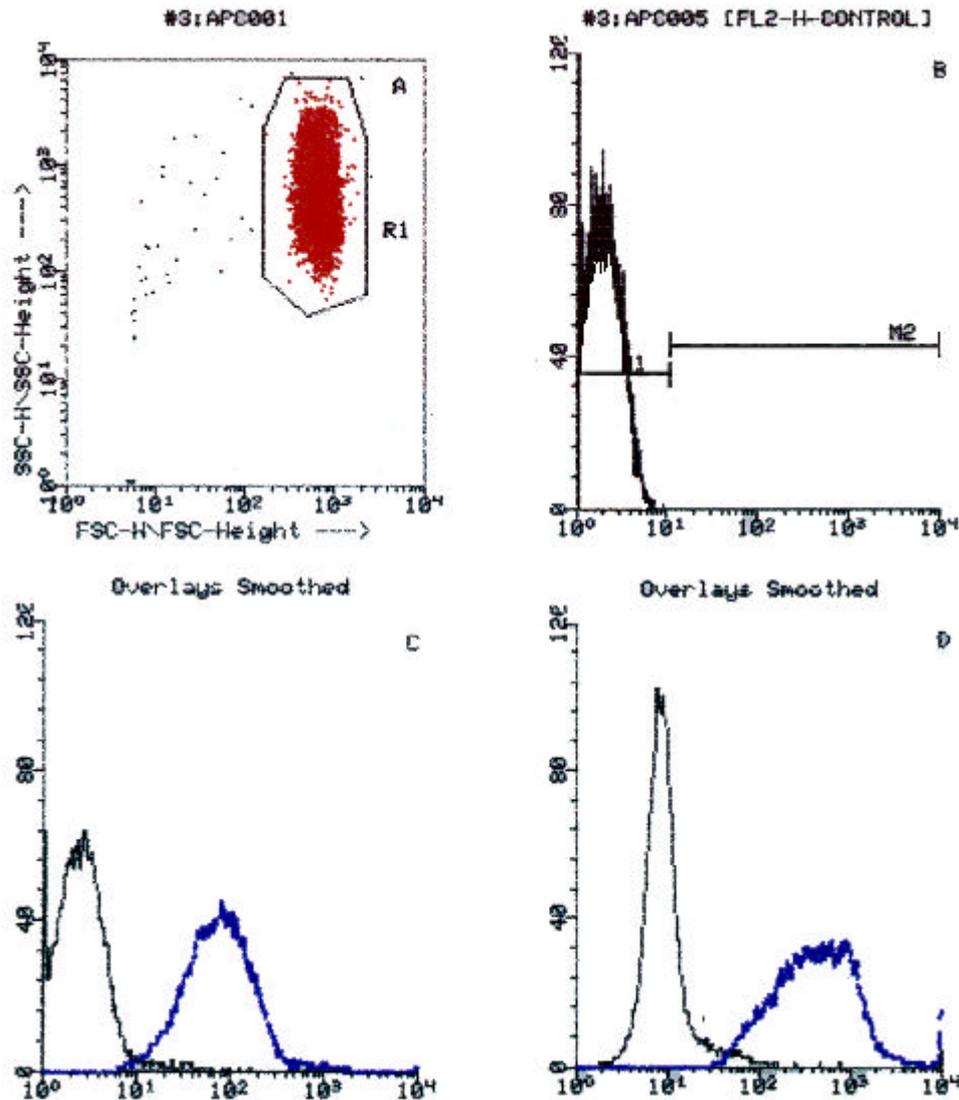


Figure 10: Ligação do co-fator e do fator Rubino/IgM a hemácias formolizadas analisada por citometria de fluxo. Suspensão de hemácias formolizadas foram analisadas por tamanho (abscissa) e granulosidade (ordenada) (A), o que permitiu selecionar as condições de análise das preparações experimentais. Em todas as situações, após a reação, as hemácias foram lavadas e ressuspensas para 1×10^6 células/ml e analisadas quanto à fluorescência em FACSsort. A auto-fluorescência dessas hemácias foi usada como controle (B). O painel C mostra o perfil obtido quando hemácias foram incubadas com β_2 -glicoproteína I biotinizada e avidina-ficoeritrina, na presença (linha azul) ou na ausência (linha preta) de fator Rubino/IgM não marcado, por 1 h à 37°C . O perfil mostrado em D foi proporcionado pela mesma reação quando o componente biotinizado era o fator Rubino/IgM, na presença (linha azul) ou na ausência (linha preta) de co-fator não marcado.

Detecção imunoenzimática de anticorpos anti-fosfolípido em soros de pacientes hansenianos

Anticorpos anti-fosfolípidos podem ser classificados em dois tipos: (1) os que se ligam diretamente ao fosfolípido e (2) os que se ligam ao fosfolípido através de um co-fator (β_2 -glicoproteína I) (MCNEIL et al., 1990; AMIRAL et al., 1996). A identificação do fator Rubino/IgM como anticorpo anti-fosfolípido é fundamentada no seguinte conjunto de observações: (1) a necessidade do co-fator para a reação ser processada, (2) correspondência entre o co-fator e β_2 -glicoproteína I, (3) natureza lipídica do ligante na hemácia e (4) inibição da reação de Rubino pela cardiolipina. O fator Rubino/IgM foi então submetido a um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-fosfolípidos. Estudo piloto de titulação de alguns soros em placas revestida com cardiolipina dirigiu a escolha da diluição 1/400 para os ensaios seguintes. Um padrão arbitrário de positividade da reação foi estabelecido: absorbâncias, a 490 nm, inferiores ou iguais a 0,25 foram consideradas negativas; leituras superiores foram consideradas positivas. A figura 11, mostra que os soros de pacientes hansenianos Rubino positivos em sua maioria (4/6) proporcionaram reações positivas quando reveladas por conjugado anti-IgM e negativas quando conjugado anti-IgG foi usado na revelação. A grande maioria dos soros de pacientes hansenianos Rubino negativos e todos os soros humanos normais proporcionaram reações negativas com ambos os conjugados. A reação negativa, com ambos os conjugados, proporcionada por 2 soros Rubino positivos pode refletir a dificuldade própria de um sistema que depende da ligação concomitante de diversos ligantes: fosfolípido, IgM ou IgG e β_2 -glicoproteína I. Concentrações séricas eventualmente baixas de β_2 -glicoproteína I podem comprometer a

detecção dos anticorpos anti-fosfolípido, variável esta passível de correção pela adição de β_2 -glicoproteína I exógena.

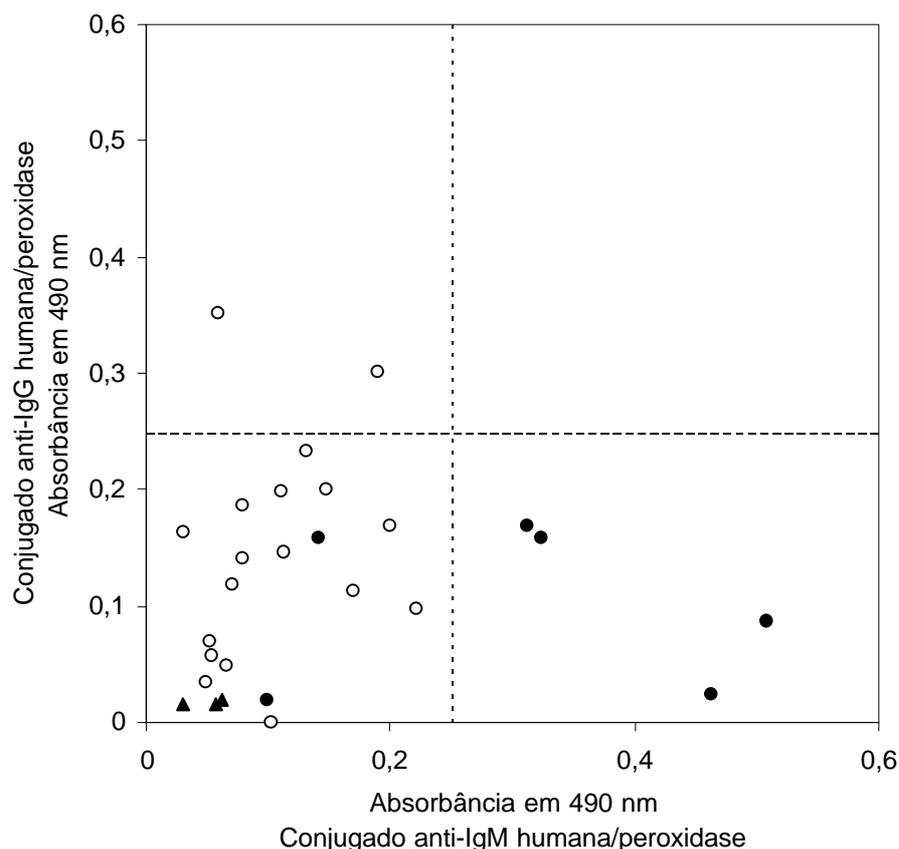


Figura 11: Detecção de anticorpos séricos anti-fosfolípido: relação entre níveis de classes IgG e IgM.

Placas de ELISA foram recobertas com cardioplipina e incubadas com soros (diluição 1/400) humanos normais (triângulos fechados), soros de pacientes hansenianos com reação de Rubino positiva (círculos cheios) e negativa (círculos vazios). A reação foi revelada com conjugado anti-IgM humana ou anti-IgG humana marcados com peroxidase.

Fator Rubino/IgM reconhece epitopo topográfico dependente de pontes dissulfeto de β_2 -glicoproteína I

Com intuito de se isolar um peptídeo de β_2 -glicoproteína I capaz de se associar ao fator Rubino/IgM, clivou-se a molécula com brometo de cianogênio.

Como a β_2 -glicoproteína I (figura 12) apresenta 4 metioninas bem distribuídas, 5

peptídeos poderiam ser gerados pela clivagem. A análise eletroforética da proteína tratada com brometo de cianogênio (condições dissociantes não redutoras) revelou banda única com MM aparente de 50 kDa (figura 13A, pista **b**). A manutenção da massa molecular aparente poderia ser atribuível a presença de cisteína em todos os peptídeos produzidos (figura 12), assegurando a união dos peptídeos por pontes dissulfeto. A redução, por mercaptoetanol, das pontes dissulfetos eventualmente presentes na proteína clivada proporcionou no SDS-PAGE, 5 bandas com massa molecular aparente de: (1) 50 kDa, (2) 26kDa, (3) 23 kDa (4) 20kDa e (5) 10 kDa (figura 13A, pista **a**). A banda de 50 kDa deve corresponder a proteína íntegra, resistente a clivagem química; as demais seriam correspondentes aos peptídeos gerados pela clivagem. Provavelmente o peptídeo menor não pôde ser visualizado no gel. Nenhuma das bandas foi reconhecida por fator Rubino/IgM no “immunoblot” e a proteína clivada não inibiu a reação de Rubino (dados não mostrados).

```

1      GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFICPLT
51     GLWPINTLKC TPRVCPPFAGI LENGAVRYTT FEYPNTISFS CNTGFYLNGA
101    DSAKCTEEGK WSPELPVCAP IICPPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT
151    AVFECLPQHA MFGNDTITTCT THGNWTKLPE CREVKCPFPS RPDNGFVNYP
201    AKPTLYYKDK ATFGCHDGYS LDGPEEIECT KLGNWSAMPS CKASCKLPVK
251    KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSFF CKNKEKKCSY TEDAQCIDGT
301    IEVPKCFKEH SSLAFWKTDA SDVKPC

```

Figura 12: Estrutura primária da β_2 -glicoproteína I.

As metioninas estão assinaladas em negrito (**M**) enquanto as cisteínas estão sublinhadas (C).

Com intuito de verificar se o reconhecimento de β_2 -glicoproteína I pelo fator Rubino/IgM era dependente da conformação proporcionada pelas pontes dissulfeto, foi feito um “immunoblot” com a proteína reduzida ou não pelo mercaptoetanol, revelado por soro Rubino positivo. Como mostra a figura 13B, a

preservação das pontes dissulfeto é requerida para que ocorra o reconhecimento.

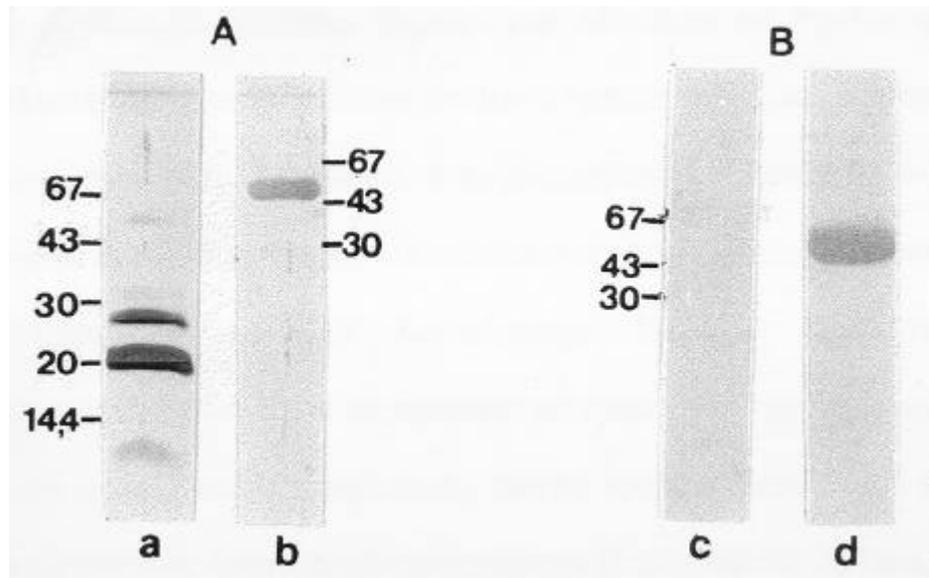


Figura 13: (A) SDS-PAGE 12,5% de β_2 -glicoproteína I clivada com brometo de cianogênio. As amostras foram reduzidas (pista a) ou não (pista b) com mercaptoetanol. Gel corado pelo método da prata.
(B) “Immunoblotting” de β_2 -glicoproteína I. β_2 -glicoproteína I foi reduzida (pista c) ou não (pista d) com mercaptoetanol, separada por eletroforese (**SDS-PAGE 10%**), transferida para nitrocelulose e incubada com soro Rubino positivo. A reação foi revelada com IgG de cabra anti-IgM humana marcado com peroxidase. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

5. Quebra de um paradigma. Reatividade Rubino do soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Anticorpos anti-fosfolipídios são freqüentemente detectados em soros de pacientes com síndrome de anti-fosfolipídio primária ou com lúpus eritematoso sistêmico. Por essa razão, soros desses pacientes foram ensaiados quanto à reatividade Rubino, proporcionando aproximadamente 45% de positividade (13/29). Essa observação permite inferir que a especificidade da reação de Rubino não é absoluta para a hanseníase, mas se amplia para virtualmente todo o grupo de pacientes com títulos altos de anticorpos anti-fosfolipídios.

DISCUSSÃO

Neste trabalho a reação de Rubino foi estudada detalhadamente, através da caracterização dos componentes moleculares nela envolvidos. Uma forma direta de purificação do fator Rubino por afinidade ao ligante eritrocítico é descrita. Apresentam-se evidências de que o ligante eritrocítico corresponde a um fosfolípido e o co-fator da reação, à β_2 -glicoproteína I. Dentre as evidências de correspondência entre o ligante eritrocítico e um fosfolípido merecem destaque: (a) hemácias de carneiro formolizadas tratadas com metanol ou clorofórmio:metanol perdem a capacidade de sedimentar-se aceleradamente em presença de soro Rubino positivo; (b) fração lipídica extraída de estromas de hemácias de carneiro com clorofórmio:metanol (1:2) e fração da fase orgânica da partição de Folch inibem a reatividade Rubino; (c) os lipídios da fração orgânica, inibidora da reação de Rubino, são separados com boa resolução em cromatografia de camada delgada de alta resolução para fosfolípidios; os componentes da faixa com Rf de 0,31 a 0,52 inibem a reatividade Rubino; e (d) cardiolipina, um fosfolípido aniônico, também inibe a reação de Rubino. Em relação às evidências de correspondência entre o co-fator e β_2 -glicoproteína I merecem destaque: (a) o material purificado com atividade co-fator tem migração eletroforética coincidente com o da β_2 -glicoproteína I (banda de 50 kDa); (b) o seqüenciamento dos aminoácidos N-terminais dessa banda de 50 kDa revela homologia com β_2 -glicoproteína I; (c) β_2 -glicoproteína I purificada através de um conjunto de procedimentos convencionais descritos na literatura, tem atividade co-fator da reação de Rubino; e (d) a atividade Rubino é abolida pela adição de anticorpos de coelho anti-banda de 50 kDa.

O fato do fator Rubino/IgM ligar-se à superfície de hemácias formolizadas (PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1996) fundamentou o investimento

na purificação do fator Rubino/IgM de uma forma mais direta do que aquela anteriormente descrita, que consistia de etapas de precipitação (PEG 5%) e cromatográficas (cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A-Sepharose, cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q[®] e, cromatografia por filtração em gel em coluna Superose[®] 6) (PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1995). Para ligar o fator Rubino/IgM às hemácias formolizadas, evitando adsorções inespecíficas de outros componentes, utilizou-se, ao invés de soro, precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo. Após incubação com precipitado, o eluato ácido das hemácias não apresentou atividade Rubino. Contrastando com tal resultado, recuperou-se reatividade Rubino nos eluatos ácidos obtidos de hemácias incubadas com o mesmo precipitado na presença de SHN ou com soro Rubino positivo. Demonstrou-se assim a necessidade de um segundo componente sérico para que a ligação ocorresse. O requerimento de um co-fator sérico para que a reatividade Rubino se manifeste já havia sido previamente destacado por MARCHOUX & CARO (1928) e PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA (1995). Agora fica claro que a participação do co-fator não se faz apenas no sentido de proporcionar condições físico-químicas para que haja a sedimentação acelerada das hemácias formolizadas — a exemplo do que ocorre com algumas reações sorológicas que requerem proteínas catiônicas para tornar-se positivas — mas sim como um componente ativo da ligação do fator Rubino/IgM à superfície eritrocítica. A análise eletroforética, em condições redutoras, demonstrou que a fração eluída de hemácias sensibilizadas com soro Rubino positivo, apresentava duas bandas principais cujas migrações correspondem a massa molecular (MM) aparente de 70 e 28 kDa (figura 1A, pista c). A banda de maior migração foi compartilhada pelas preparações controles

(material eluído de hemácias incubadas com PBS ou SHN), tratando-se provavelmente de hemoglobina. A banda de menor migração era exclusiva da preparação ativa (figura 1A, pista c) e sua MM compatível com a cadeia pesada de IgM. A confirmação dessa hipótese é derivada de "immunoblot" que mostrou ser a banda de 70 kDa reconhecida por anticorpos anti-IgM humana (figura 1B). Quando comparou-se essa forma de purificação com o processo anteriormente descrito, notou-se que o novo processo proporcionou bom grau de pureza do fator, maior rapidez na purificação e conseqüente diminuição das perdas decorrentes de longas manipulações.

Visando aumentar a sensibilidade da reação de Rubino, optou-se por revestir os poços de microplacas com hemácias formolizadas, seguindo-se contato com preparações contendo fator Rubino/IgM. As reações foram negativas, o que se constatou ser atribuível a ausência do ligante eritrocítico, eluído por tratamento das monocamadas com metanol, mesmo quando realizadas na presença de SHN. Buscando identificar a causa da ausência da reatividade, submetem-se hemácias formolizadas em suspensão aos mesmos tratamentos alcoólicos aos quais foram submetidas as hemácias que recobriam a placa. As hemácias formolizadas tratadas com metanol perderam completamente a capacidade de serem aceleradamente sedimentadas por soro Rubino positivo. Procederam-se então a extração e a análise dos lipídios que apresentavam capacidade de inibir a reação de Rubino. Preparação extraída do estroma de hemácias com clorofórmio:metanol (1:2) [C:M (1:2)] foi capaz de inibir a reação de Rubino; não foram evidenciados glicolipídios nessa preparação quando analisada por cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC). A tentativa de se investigar a participação de interações proteína-carboidrato na

reação de Rubino, através de um painel de açúcares, mostrou que carboidratos carregados negativamente (ácido N-acetil-neuramínico e ácido glucorônico) inibiam a reatividade Rubino. Por isso, o extrato de estroma de hemácia C:M (1:2) foi submetido a partição de Folch, procurando separar gangliosídeos — glicolipídios com pelo menos um resíduo de ácido siálico — na fase aquosa, desembaraçando-se dos demais lipídios, contidos na fração orgânica. No entanto, somente os lipídios da fase orgânica foram capazes de inibir a reação de Rubino. O panorama criado por esses resultados motivou a investigação de correspondência do ligante eritrocítico com fosfolipídios, um outro grupo de lipídios que podem ser negativamente carregados. O material da fração orgânica da partição de Folch foi submetido então a HPTLC preparativa em condições adequadas para a separação de fosfolipídios; a resolução foi boa e a recuperação da atividade inibitória foi proporcionada pelo material contido numa faixa da placa correspondente a gama de Rf de 0,2 a 0,4 (figura 4). Esses resultados mostram que fosfolipídios correspondem ao ligante eritrocítico envolvido na reação de Rubino.

A escassez de estudos sobre a reação de Rubino deixou numerosas possibilidades abertas em relação a natureza do co-fator dessa reação. No isolamento do co-fator verificou-se que a atividade era seqüencialmente recuperada no (a) precipitado PEG 12 a 20% de soro humano normal; (b) material não retido a coluna de proteína A e G; (c) material retardado na coluna de Mono Q, e eluído na concentração de 0,2 M de NaCl do gradiente salino; (d) volume de eluição da filtração em gel próximo ao da BSA (67 kDa). Essa seqüência de procedimentos proporcionou preparação cuja análise eletroforética revelou duas bandas com MM aparente de 50 e 70 kDa (figura 7A). Apenas a

banda de maior migração foi reconhecida pelo fator Rubino/IgM purificado (figura 7B), transformando-a em candidata natural a co-fator da reação de Rubino. A determinação da seqüência N-terminal (doze resíduos) da proteína de 50 kDa permitiu estabelecer correspondência entre essa proteína e β_2 -glicoproteína I, uma proteína ligante de fosfolípidos aniônicos (figura 8). Excluindo-se as duas lacunas de resíduos não identificados (cisteína, posição 4 e prolina, posição 11), houve 100% de identidade da proteína de 50 kDa com β_2 -glicoproteína I. Foi dotada de atividade co-fator uma preparação de β_2 -glicoproteína I, purificada conforme procedimento descrito na literatura (PRICE et al., 1996) — precipitação de soro com ácido perclórico, cromatografia em coluna de heparina-Sepharose, destituição de IgG em coluna de proteínas A e G imobilizadas, e cromatografia em coluna de troca iônica — confirmando a correspondência entre co-fator da reação de Rubino e β_2 -glicoproteína I. A identificação de β_2 -glicoproteína I na preparação, descrita acima, foi estabelecida através de seqüenciamento do N-terminal dessa proteína. Apenas a cisteína (posição 4) não foi identificada, resíduo detectável quando a proteína submetida ao seqüenciamento é previamente reduzida e a alquilada.

Esse conjunto de observações deixava claro que o fator Rubino/IgM é um anticorpo anti-fosfolípido. Anticorpos anti-fosfolípidos são imunoglobulinas auto-reativas estreitamente relacionadas entre si que reagem com fosfolípidos aniônicos. Esses anticorpos são chamados de lúpus anti-coagulante (LA) quando prolongam o tempo de coagulação dependente de fosfolípido ou denominados anticorpos anti-cardiolipina (ACA) quando reagem com esse fosfolípido. No presente trabalho observou-se que cardiolipina inibe a reação de Rubino. A presença de ACA e LA associa-se a maior ocorrência eventos tromboembólicos,

aborto recorrente, trombocitopenia, o que constitui a síndrome anti-fosfolípido, freqüente em pacientes com LES. Tal síndrome acomete também indivíduos sem doença auto-imune detectável, correspondendo a síndrome anti-fosfolípido primária (MCNEIL et al., 1991). Esses fenômenos foram apenas raramente observados em associação com doenças infecciosas; apenas um caso de síndrome anti-fosfolípido foi descrita na hanseníase (BAKOS et al., 1996). A ocorrência da síndrome anti-fosfolípido em doenças auto-imunes — e não em sífilis, por exemplo — passou a ser explicada a partir da descrição de um co-fator — β_2 -glicoproteína I — necessário para ligação do ACA auto-imune a cardiolipina (GALLI et al., 1990; MATSUURA et al., 1990; MCNEIL et al., 1990). β_2 -glicoproteína I complexada com fosfolípido é o ligante do ACA auto-imune, fenômeno associado a trombose em LES e síndrome de anti-fosfolípido primária (VALESINI & SHOENFELD, 1992; KARMOCHKINE et al., 1995; LARAKI et al., 1996; CABRAL & ALARCON-SEGOVIA, 1997; NAGAI et al., 1998). Já os anticorpos anti-cardiolipina de doenças infecciosas, até hoje descritos, ligam-se à cardiolipina em fase sólida e líquida, na ausência de β_2 -glicoproteína I. O requerimento, ou não, de β_2 -glicoproteína I tem sido considerado elemento de clara distinção entre os dois grupos de anticorpos anti-fosfolípidos (ORDI et al., 1993; FORASTIERO et al., 1996). Por alguma razão, essa associação de anticorpos anti-fosfolípido independentes de β_2 -glicoproteína I a doenças infecciosas não se mostrou válida para a hanseníase, uma vez que os resultados aqui apresentados indicam que o fator Rubino/IgM é um anticorpo anti-fosfolípido dependente de β_2 -glicoproteína I. O aparecimento de tais anticorpos pode ser decorrente de fenômenos auto-imunes e respostas imunitárias aberrantes,

próprias da hanseníase (COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1995).

Uma das razões a que se pode atribuir a não detecção de síndrome anti-fosfolípido na hanseníase é o fato de ser IgM a classe de anticorpo anti-fosfolípido predominante no soro dos pacientes. Soros de pacientes hansenianos Rubino positivos, em sua maioria (4/6), proporcionaram reações anti-cardiolipina positivas quando reveladas por conjugado anti-IgM e negativas, por conjugado anti-IgG. A grande maioria dos soros de pacientes hansenianos Rubino negativos e todos os soros humanos normais proporcionaram reações negativas com ambos os conjugados (figura 11). Num dos poucos trabalhos de detecção de anticorpos anti-fosfolípidos na hanseníase, realizado após a descrição de β_2 -glicoproteína I como co-fator, os autores detectam IgG anti-cardiolipina em 60 dos 61 soros testados (HOJNIK et al., 1994); os autores verificaram haver heterogeneidade desses anticorpos quanto ao requerimento de β_2 -glicoproteína I para ligação ao fosfolípido. Proporção próxima foi observada presente trabalho, onde IgG anti-cardiolipina foi detectada em 21 dos 24 soros testados (figura 13). A reação negativa, com ambos os conjugados, proporcionada por 2 soros Rubino positivos pode refletir a dificuldade própria de um sistema que depende da ligação concomitante de diversos ligantes: fosfolípido, IgM ou IgG e β_2 -glicoproteína I. Concentrações séricas eventualmente baixas de β_2 -glicoproteína I podem comprometer a detecção dos anticorpos anti-fosfolípido, variável esta passível de correção pela adição de β_2 -glicoproteína I exógena. É necessário progredir no desenvolvimento e padronização de ensaios que identifiquem seletivamente anticorpos anti-fosfolípidos associados com aumento do risco de trombose, visando estabelecer estratégias terapêuticas apropriadas para a prevenção das complicações tromboembólicas decorrentes de eventual síndrome

anti-fosfolípido (GALLI et al., 1997). O fato de apenas raramente ocorrer a síndrome anti-fosfolípido em pacientes hansenianos pode ainda estar associada à ausência anticorpos específicos para outros fatores envolvidos no processo de coagulação como anti-trombina, anti-cinínogênios, anti-Proteína C e S e anti-Anexina V (GALLI, 1996).

A β_2 -glicoproteína I é uma proteína que contém 5 domínios repetidos, com “motif” denominado proteína de controle do complemento (CCP) ou superfamília do domínio-Sushi. O último domínio dessa proteína (domínio V) apresenta uma ponte dissulfeto adicional às duas pontes encontradas em cada um dos quatro domínios (ICHINOSE et al., 1990; KATO & ENJYOJI, 1991; STEINKASSERER et al., 1991). Estudos recentes têm demonstrado que o domínio V é importante para a ligação de β_2 -glicoproteína I ao fosfolípido e, conseqüentemente, para a expressão da atividade co-fator (LAUER et al., 1993; HUNT & KRILIS, 1994; MATSUURA et al., 1995). A ligação de β_2 -glicoproteína I aos fosfolípidos poderia gerar um neoepitopo entre a proteína e o fosfolípido, ou ainda epitopos crípticos na estrutura de β_2 -glicoproteína I ou do fosfolípido, aos quais os anticorpos anti-fosfolípidos ligar-se-iam (AMENGUAL et al., 1996). A hipótese do epitopo críptico no co-fator ligado ao fosfolípido passou a ser a mais aceita, após a partir da demonstração de ligação de β_2 -glicoproteína I em placas irradiadas (plástico oxidado), na ausência de cardiolipina (MATSUURA et al., 1994; INANC et al., 1997). Entretanto, descreveu-se recentemente que fosfolípidos oxidados formam neoepitopos com β_2 -glicoproteína I, os quais são reconhecidos por anticorpos anti-fosfolípidos (HÖRKKÖ et al., 1997). Apesar da controvérsia, procurou-se obter, no presente trabalho, fragmentos de β_2 -glicoproteína I — clivagem com brometo

de cianogênio — que pudessem conter o epítipo críptico. O fator Rubino/IgM não reconheceu nenhum desses fragmentos, em “immunoblot”. Além disso, observamos que pontes dissulfetos são importantes para que o fator Rubino/IgM reconheça β_2 -glicoproteína I, evidenciando-se, assim, que o epítipo depende da conformação proporcionada pelas pontes dissulfetos.

Para uma demonstração mais direta da interação entre fator Rubino/IgM e co-fator/ β_2 -glicoproteína I com a superfície da hemácia, foram realizadas análises por citometria de fluxo, utilizando fator ou co-fator biotilado. A ligação às hemácias só foi constatada quando β_2 -glicoproteína I ou fator Rubino/IgM também estavam concomitantemente presentes na reação; na ausência de um dos componentes, o outro, biotilado, não gerou marcação celular (figura 10). A ausência de marcação das hemácias incubadas apenas com β_2 -glicoproteína I contrasta com a idéia corrente de que essa proteína, por si só, ligue-se a fosfolípidios. O fator Rubino/IgM parece estabilizar a ligação à superfície da hemácia.

A interação trimolecular necessária para a ocorrência da reação de Rubino, envolvendo o fator Rubino/IgM, o co-fator/ β_2 -glicoproteína I e o ligante eritrocítico/fosfolípido levou à analogia com as conhecidas reações anti-fosfolípidios que ocorrem em processos auto-imunes, motivando a que se submetessem a reação de Rubino amostras de soros de 29 pacientes com altos níveis de anticorpos anti-cardiolipina. Reação de Rubino positiva foi proporcionada por 45% dos soros testados. Essa observação permite inferir que a especificidade da reação de Rubino não é absoluta para a hanseníase, como até hoje referida (CURBAN, 1962; PANUNTO-CASTELO & ROQUE-BARREIRA, 1996), mas se amplia para virtualmente todo o grupo de pacientes com títulos

altos de anticorpos IgM anti-fosfolípidios, constituindo-se na primeira descrição de soros verdadeiramente Rubino positivos não provenientes de pacientes hansenianos.

Conclui-se que o fator Rubino/IgM é um anticorpo anti-fosfolípido dependente de β_2 -glicoproteína I, e que o ligante eritrocítico ao qual esses fatores se ligam é um fosfolípido. A descrição de reações de Rubino positivas em soros de pacientes com altos títulos de anticorpos anti-cardiolipina proporcionou a quebra do paradigma da especificidade absoluta da reação para hanseníase. Estudos dos anticorpos anti-fosfolípidios dependentes de β_2 -glicoproteína I em pacientes hansenianos com surtos reacionais, sob tratamento quimioterápico, bem como associados a outros eventos auto-ímmunes na hanseníase, poderão abrir novas perspectiva na compreensão de alterações de resposta imunitária, características da hanseníase virchowiana.

RESUMO

Soro de 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*. Recentemente, identificou-se e isolou-se, através de métodos de precipitação e cromatográficos, o componente sérico responsável pelo fenômeno — fator Rubino — como sendo uma IgM. No presente trabalho a reação foi dissecada, através da caracterização dos componentes moleculares nela envolvidos. A propriedade do fator Rubino/IgM de adsorver-se à superfície da hemácia possibilitou sua purificação em etapa única, sendo sua eluição feita com tampão ácido. Essa adsorção, quando feita com precipitado PEG 10% de soro Rubino positivo, somente ocorreu quando houve suplementação com soro humano normal (SHN). Dessa forma, tornou-se inquestionável a necessidade, previamente sugerida, de um co-fator, contido até mesmo em SHN, para a adsorção do fator Rubino/IgM às hemácias. Visando aumentar a sensibilidade da reação de Rubino, optou-se por revestir os poços de microplacas com hemácias formolizadas, seguindo-se contato com preparações contendo fator Rubino/IgM. As reações foram negativas, o que se constatou ser atribuível a ausência do ligante eritrocítico, eluído por tratamento das monocamadas com metanol. Procedimentos de identificação desse ligante, mostraram ser ele (1) extraído dos estromas com clorofórmio:metanol (1:2); (2) separado na fase orgânica da partição de Folch, (3) separado em cromatografia de camada delgada de alta resolução para fosfolípidios num R_f de 0,2 a 0,4. Esses resultados sugeriam correspondência do ligante eritrocítico com fosfolípido, o que foi reforçado pela observação de que cardiolipina era capaz de inibir a reação de Rubino. Procedimentos de purificação do co-fator, mostraram ser essa proteína (1)

precipitada do soro com polietileno glicol (PEG) na concentração 12 a 20%; (2) recuperada na fração não ligante de proteína A e G; (3) eluída em coluna de troca aniônica Mono Q (pH 8,0) com 20% do gradiente salino (0 a 1 M de NaCl);(4) eluída na gel filtração em Superdex 200, em um volume coincidente com o da BSA. Esse conjunto de procedimentos proporcionou preparação cuja análise eletroforética mostrou duas bandas de 50 e 70 kDa, sendo a primeira reconhecida pelo fator Rubino/IgM em “immunoblot”. Seqüenciamento N-terminal da proteína de 50 kDa evidenciou homologia com β_2 -glicoproteína I, uma proteína ligante de fosfolipídios aniônicos. A interação trimolecular necessária para a ocorrência da reação de Rubino, envolvendo o fator Rubino/IgM, o co-fator/ β_2 -glicoproteína I e o ligante eritrocítico/fosfolipídio levou à analogia com as conhecidas reações anti-fosfolipídios que ocorrem em processos auto-ímmunes, motivando a que se submetessem a reação de Rubino amostras de soros de 29 pacientes com altos níveis de anticorpos anti-cardiolipina. Reação de Rubino positiva foi proporcionada por 45% dos soros testados. Assim, o paradigma da especificidade absoluta da reação de Rubino para a hanseníase foi quebrado.

SUMMARY

Serum from leprosy patients rapidly sediments formalized sheep erythrocytes, a process corresponding to the Rubino reaction, whose positivity occurs in the forms of the disease with impairment of *M. leprae*-specific cell immunity. The serum component responsible for the phenomenon - Rubino factor - was recently isolated by precipitation and chromatography methods and identified as an IgM. In the present study the Rubino reaction was studied in detail by characterizing the molecular components involved in it. The property of the Rubino factor/IgM to adsorb to the surface of formalized erythrocytes has permitted its purification in a single step, with elution in acid buffer. This adsorption, when performed with a 10% PEG precipitate of Rubino-positive serum, only occurred in the presence of supplementation with normal human serum (NHS). Thus, the previously suggested participation of an obligatory cofactor, present even in NHS, for the adsorption of Rubino factor/IgM to erythrocytes has become unquestionable. In order to increase the sensitivity of the Rubino reaction, microplate wells were coated with formalized erythrocytes and placed in contact with preparations containing Rubino factor/IgM. The reactions were negative, a fact attributable to the absence of an erythrocytic ligand eluted by treatment of the cell monolayer with methanol. Procedures for the identification of this ligand showed that (1) it is extracted from stroma with chloroform:methanol (1:2), (2) separated in the organic phase of Folch partition, and (3) separated by high performance thin-layer chromatography for phospholipids at an R_f of 0.2 to 0.4. These results suggest that the erythrocytic ligand may correspond to a phospholipid, a possibility supported by the observation that cardiolipin can inhibit the Rubino reaction. Procedures for the purification of the cofactor showed that it is a protein (1) precipitated from serum

with polyethylene glycol (PEG) at the concentration of 12 to 20%, (2) recovered in the unbound fraction to protein A and G columns, (3) eluted through a Mono Q anion exchange column (pH 8.0) with 20% of the salt gradient (0 to 1 M NaCl), and (4) eluted by gel filtration on Superdex 200 in a volume coinciding with that of BSA. This set of procedures led to a preparation whose electrophoretic analysis showed two bands of 50 and 70 kDa, the first being recognized by the Rubino factor/IgM by immunoblot. N-terminal sequencing of the 50 kDa protein revealed homology with β_2 -glycoprotein I, an anionic phospholipid-binding protein. The trimolecular interaction necessary for the occurrence of the Rubino reaction, involving the Rubino factor/IgM, the β_2 -glycoprotein I/cofactor, and the erythrocytic ligand/phospholipid, showed analogy with the known antiphospholipid reactions that occur in autoimmune processes. This fact motivated us to submit serum samples from 29 patients with high levels of anticardiolipin antibodies to the Rubino reaction, which was positive in 45% of cases. Thus, the paradigm of absolute specificity of the Rubino reaction for leprosy has been broken.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; MINAGAWA, F.; YOSHINO, Y.; OZAWA, T.; SAIKAWA, K.; SAITO, T. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr., v.48, p.109-19, 1980.
- ACANFORA, G. Sulla reazioni di Rubino. Ann. Igiene, v.49, p.152-9, 1930.
- ADANT, M. Au sujet de la réaction de Rubino. C. R. O. Soc. Biol., v.110, p.119-20, 1932.
- ALMEIDA, J.O. Serological studies on leprosy; a comparison of complement-fixation test using antigens prepared from tubercle bacilli and beef-heart lipids with others serological reactions. Bull. World Health Organ., v.26, p.233-40, 1962.
- ALMEIDA, J.O. Serology in leprosy. Bull. World Health Organ., v.42, p.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. Publ. Cent. Estud. Lepr., v.14, p.73-89, 1974.
- ALMEIDA, J.O. Inhibition of Rubino factor as a test for detecting antigens common to leprosy bacilli. /Letter/ Int. J. Lepr., v.46, p.436, 1978.
- AMBROGIO, A. La reazione di Rubino nella lepra. Pathologica, v.24, p.258-68, 1932.
- AMENGUAL, O.; ATSUMI, T.; KHAMASHTA, M.; HUGHES, G. Clinical significance of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies. Ann. Med. Interne (Paris), v.147, suppl.1, p.15-7, 1996.
- AMIES, C.R. The Rubino's reaction in leprosy. Bull. Inst. Pasteur, v.28, p.828-9, 1930.
- AMIRAL, J.; ADAM, M.; CLUZEAU, D.; VISSAC, A.; MAILLET, T. Different target

- specificities of phospholipid-dependent antibodies. Ann. Med. Interne (Paris), v.147, suppl.1, p.18-21, 1996.
- ANDREWS, J. The gel filtration over a wide range. J. Biochem., v.96: p.595-606, 1965.
- ARRUDA, M.; DE ARRUDA, O.; ASTOLFI, C.; NOGUEIRA, M.; BASTAZINI, I.; OPROMOLLA, D.; URA, S. The Rubino reaction. Criterion for inactivation in lepromatous patients. Med. Cutan. Ibero Lat. Am., v.11, p.423-30, 1983.
- ARRUDA, M.S.P.; COSTA, H.C.; SOUZA, L.C.D.; NOBRE, L.A.S. Avaliação das imunoglobulinas séricas em pacientes com hanseníase virchoviana. Salusvita, v.6, p.96-101, 1987.
- ARRUDA, M.; ARRUDA, M.; SOUZA, L.; OPROMOLLA, D.; URA, S. Aspectos da imunidade humoral de pacientes leprosois clinicamente curados. Salusvita, v.7, p.22-30, 1988.
- ASHWORTH, M.; SINHA, S.; PATIL, S.; RAMU, G.; SENGUPTA, U. The detection of subclinical leprosy using a monoclonal antibody based radioimmunoassay. Lepr. Rev., v.57, p.237-42, 1986.
- BAKOS, L.; CORREA, C.; BERGMANN, L.; BONAMIGO, R.; MULLER, L. Antiphospholipid antibodies thrombotic syndrome misdiagnosed as Lucio's phenomenon. Int. J. Lepr., v.64, p.320-3, 1996.
- BENETAZZO, G. Rapporti tra reazioni di Rubino, velocità di sedimentazione e reazione sierologiche nella lebbra. Dermosif., v.8, p.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., v.9, p.11-4, 1936.
- 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., v.7, p.1-7, 1935.
- BIER, O. Sorologia da lepra. Rev. bras. leprol., v.4, p.221-2, 1936

- BLOOM, B.; GODAL, T. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. V. Leprosy. Rev. Infect. Dis., v.5, p.765-80, 1983.
- BLOOM, B.; MODLIN, R.; SALGAME, P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. Annu. Rev. Immunol., v.10, p.453-88, 1992.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, v.8, p.93-9, 1987.
- CABRAL, A.; ALARCON-SEGOVIA, D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Curr. Opin. Rheumatol., v.9, p.387-92, 1997.
- CHATURVEDI, V.; SINHA, S.; GIRDHAR, B.; SENGUPTA, U. On the value of sequential serology with a *Mycobacterium leprae*-specific antibody competition ELISA in monitoring leprosy chemotherapy. Int. J. Lepr., v.59, p.32-40, 1991.
- CHO, S.; YANAGIHARA, D.; HUNTER, S.; GELBER, R.; BRENNAN, P. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. Infect. Immun., v.41, p.1077-83, 1983.
- CHO, S.; CELLONA, R.; FAJARDO TT, J.; ABALOS, R.; DELA CRUZ, E.; WALSH, G.; KIM, J.; BRENNAN, P. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. Int. J. Lepr., v.59, p.25-31, 1991.
- CHOUDHURI, K. The immunology of leprosy; unravelling an enigma. /Editorial/ Int. J. Lepr., v.63, p.430-47, 1995.
- CHRISTIAN, C.; ELKON, K. Autoantibodies to intracellular proteins. Clinical and biologic significance. Am. J. Med., v.80, p.53-61, 1986.
- COSSERMELLI-MESSINA, W.; COSSERMELLI, W. Humoral immunity in Hansen's disease. Rev. Paul. Med., v.113, p.929-34, 1995.
- COSSERMELLI-MESSINA, W.; COSSERMELLI, W. Possible mechanisms of

- chronic leprosy-related arthritis. Rev. Paul. Med., v.115, p.1406-9, 1997.
- CURBAN, G.V. Contribuição para o estudo da reação de Rubino. Rev. Bras. Leprol., v.30, p.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., v.59, p.332-4, 1991.
- DROWART, A.; LAUNOIS, P.; DE COCK, M.; HUYGEN, K.; DE BRUYN, J.; YERNAULT, J.; VAN VOOREN, J. An isoelectric focusing method for the study of the humoral response against the antigen 85 complex of *Mycobacterium bovis* BCG in the different forms of leprosy. J. Immunol. Methods, v.145, p.223-8, 1991.
- DROWART, A.; DE BRUYN, J.; HUYGEN, K.; DAMIANI, G.; GODFREY, H.; STELANDRE, M.; YERNAULT, J.; VAN VOOREN, J. 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., v.36, p.697-702, 1992.
- DROWART, A.; CHANTEAU, S.; HUYGEN, K.; DE COCK, M.; CARTEL, J.; DE BRUYN, J.; LAUNOIS, P.; YERNAULT, J.; VAN VOOREN, J. Effects of chemotherapy on antibody levels directed against PGL-I and 85A and 85B protein antigens in lepromatous patients. Int. J. Lepr., v.61, p.29-34, 1993.
- DROWART, A.; HUYGEN, K.; LAUNOIS, P.; JANN, E.; NYABENDA, J.; VAN VOOREN, J. IgG humoral response against the antigen 85 complex homologues in leprosy. Scand. J. Immunol., v.40, p.643-7, 1994.
- EDMAN, P. Preparation of phenylthiohydantoins from some natural amino acids. Acta Chem. Scand., v.4, p.277-82, 1950a.
- EDMAN, P. Method of determination of the amino acid sequences in peptides. Acta Chem. Scand., v.4, p.283-93, 1950b.

- FIGUEIREDO, A.P. O diagnóstico sêrológico da lepra pela reação de Rubino. Rio de Janeiro, 1931. 41p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade do Rio de Janeiro.
- FLEURI-DA-SILVEIRA, G.; MESQUITA, M.P. Contribuição ao estudo da reação de Rubino. Rev. Ass. paul. Med., v.3, p.21-31, 1933.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., V.226, p.497-509, 1957.
- FORASTIERO, R.; MARTINUZZO, M.; KORDICH, L.; CARRERAS, L. Reactivity to beta 2 glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid syndrome and syphilis. Thromb Haemost., v.75, p.717-20, 1996.
- FRIED, B.; SHERMA, J. Thin-layer chromatography. Techniques and applications. New York; Marcel Dekker, Inc., 1994. cap.15, p.245-85: Lipids.
- FURTADO, D.; LEITE, S. A reação de Rubino e o diagnóstico precoce da lepra. Lisboa Medica, v.9, p.1019-27, 1932.
- GALLI, M.; COMFURIUS, P.; MAASSEN, C.; HEMKER, H.; DE BAETS, M.; VAN BREDA-VRIESMAN, P.; BARBUI, T.; ZWAAL, R.; BEVERS, E. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet, v.335, p.1544-7, 1990.
- GALLI, M. Non beta 2-glycoprotein I cofactors for antiphospholipid antibodies. Lupus, v.5, p.388-92, 1996.
- GALLI, M.; FINAZZI, G.; BARBUI, T. Antiphospholipid antibodies: predictive value of laboratory tests. Thromb. Haemost., v.78, p.75-8, 1997.
- GARCIA-DE LA TORRE, I. Autoimmune phenomena in leprosy, particularly antinuclear antibodies and rheumatoid factor. J. Rheumatol., v.20, p.900-3, 1993.

- GHARAVI, A.E.; HARRIS, E.N.; ASHERSON, R.A., HUGHES, G.R.V.
Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity.
Ann. Rheum. Dis., v.46, p.1-6, 1987.
- GIBSON, T.; AHSAN, Q.; HUSSEIN, K. Arthritis of leprosy. Br. J. Rheumatol.,
v.33, p.963-6, 1994.
- GILLIS, T.; WILLIAMS, D. Polymerase chain reaction and leprosy. /Editorial/ Int.
J. Lepr., v.59, p.311-6, 1991.
- GROSS, E.; WITKOP, B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the
methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J. Biol. Chem., v.237,
p.1856-60, 1962.
- GUEDES-BARBOSA, L.; GILBRUT, B.; SHOENFELD, Y.; SCHEINBERG, M.
Autoantibodies in leprosy sera. Clin. Rheumatol., v.15, p.26-8, 1996.
- GUPTA, M. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Research needs related to
epidemiology and control: subclinical infection. Int. J. Lepr. v.64, suppl.1,
p.29-36, 1996.
- HAO, Y.L.; INGHAM, K.C.; WICKERHAUSER, M. Fractionation precipitation of
proteins with polyethylene glycol. In: CURLING, I.M. Methods of plasma
protein fractionation. London; Academic Press, Inc., 1980. Cap.1, p.57-74.
- HIMMELHOCH, S.R. Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents.
Methods Enzymol., v.22, p.273-86, 1971.
- HOJNIK, M.; GILBURD, B.; ZIPOREN, L.; BLANK, M.; TOMER, Y.;
SCHEINBERG, M.; TINCANI, A.; ROZMAN, B.; SHOENFELD, Y.
Anticardiolipin antibodies in infections are heterogenous in their dependency
on beta 2-glycoprotein I: analysis of anticardiolipin antibodies in leprosy.
Lupus, v.3, p.515-21, 1994.
- HOMBRIA, M. Contribución al estudio sorológica de la lepra. Acta dermo-
sifiliogr., v.25, p.193-200, 1932.

- HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; BRANCH, D.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and beta2 glycoprotein 1 (and other proteins). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.94, p.10356-61, 1997.
- HUNT, J.; KRILIS, S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J. Immunol., v.152, p.653-9, 1994.
- ICHINOSE, A.; BOTTENUS, R.; DAVIE, E. Structure of transglutaminases. J. Biol. Chem., v.265, p.13411-4, 1990.
- IMBERT, M.F.P. La reacción de Rubino en la lepra. Puerto Rico J. publ. Hlth., v.12, p.246-56, 1936.
- INANC, M.; RADWAY-BRIGHT, E.; ISENBERG, D. Beta 2-Glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I antibodies: where are we now? Br J Rheumatol., v.36, p.1247-57, 1997.
- 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, v.28, p.525-9, 1990.
- JOB, C.; JAYAKUMAR, J.; WILLIAMS, D.; GILLIS, T. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. Int. J. Lepr., v.65, p.461-4, 1997.
- KABAT, E.V.; Mayer, M.M. Complement and complement fixation. 2.ed. Springfield; Charles C. Thomas Publisher, 1961. Cap.4, p.133-240: Experimental immunochemistry.
- KAPLAN, G. Recent advances in cytokine therapy in leprosy. J. Infect. Dis., v.167 suppl.1, p.18-22, 1993.
- KAPLAN, G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. Immunobiology, v.191, p.564-8, 1994.
- KARMOCHKINE, M.; PIETTE, J.; MAZOYER, E.; WECHSLER, B.; CHERIN, P.;

- HERSON, S.; GODEAU, P.; BOFFA, M. Antiphospholipid antibodies: cause of thrombosis or an epiphenomenon? Presse Med., v.24, p.267-70, 1995.
- KATO, H.; ENJYOJI, K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine beta 2 glycoprotein I: the presence of five Sushi domains. Biochemistry, v.30, p.11687-94, 1991.
- KLATSER, P.; DE WIT, M.; KOLK, A. An ELISA-inhibition test using monoclonal antibody for the serology of leprosy. Clin. Exp. Immunol., v.62, p.468-73, 1985.
- KLATSER, P.; DE WIT, M.; FAJARDO, T.; CELLONA, R.; ABALOS, R.; DE LA CRUZ, E.; MADARANG, M.; HIRSCH, D.; DOUGLAS, J. Evaluation of *Mycobacterium leprae* antigens in the monitoring of a dapsone-based chemotherapy of previously untreated lepromatous patients in Cebu, Philippines. Lepr. Rev., v.60, p.178-86, 1989.
- KLATSER, P.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. J. Clin. Microbiol., v.31, p.2947-51, 1993.
- KLATSER, P.; CHO, S.; BRENNAN, P. The contribution of serological tests to leprosy control. Int. J. Lepr., v.64, p.S63-6, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, p.660-85, 1970.
- LARAKI, R.; BLETRY, O.; WECHSLER, B.; PIETTE, J.; DE ZUTTERE, D.; GODEAU, P. The heart and antiphospholipid antibodies. Personal experience and review of the literature. Rev. Med. Interne, v.17, p.46-57, 1996.
- LAUER, S.; HEMPEL, U.; GRIES, A.; FRANK, K. Amino acid sequence of the region of beta 2-glycoprotein 1 (gp1) which mediates binding of autoantibodies to the cardiolipin-gp1 complex in humans. Immunology, v.80, p.22-8, 1993.

- LEPINE, P.; MARKIANOS, J.; PAPAYOANNOU, A. Valeur pratique de la réaction de Rubino pour le sérodiagnostic de la lèpre. Bull. Soc. Path. exot., v.25, p.543-6, 1932.
- LUZ, A.C. Contribuição ao estudo sorológico da lepra. Brasil Médico, v.43, p.1526-29, 1929.
- MARCHOUX, E.; CARO, J. Méthode de diagnostic sérologique de la lèpre. Ann. Inst. Pasteur, v.42, p.542-52, 1928.
- MATSUURA, E.; IGARASHI, Y.; FUJIMOTO, M.; ICHIKAWA, K.; KOIKE, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. /Letter/ Lancet. v.336, p.177-8, 1990.
- MATSUURA, E.; IGARASHI, Y.; YASUDA, T.; TRIPLETT, D.; KOIKE, T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J. Exp. Med., v.179, p.457-62, 1994.
- MATSUURA, E.; IGARASHI, M.; IGARASHI, Y.; KATAHIRA, T.; NAGAE, H.; ICHIKAWA, K.; TRIPLETT, D.; KOIKE, T. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on beta 2-glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. Lupus, v.4, suppl.1, p.S13-7, 1995.
- MCNEIL, H.; SIMPSON, R.; CHESTERMAN, C.; KRILIS, S. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.87, p.4120-4, 1990.
- MCNEIL, H.; CHESTERMAN, C.; KRILIS, S. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv. Immunol., v.49, p.193-280, 1991.
- MONACELLI, M. Sulla reazione di Rubino nella lepra. G. ital. Derm. Sif., v.69, p.1472-6, 1928.
- MOSMANN, T.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.; GIEDLIN, M.; COFFMAN, R. Two

- types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol., v.136, p.2348-57, 1986.
- MOSMANN, T.; COFFMAN, R. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immunol., v.46, p.111-47, 1989a.
- MOSMANN, T.; COFFMAN, R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol., v.7, p.145-73, 1989b.
- MWATHA, J.; MORENO, C.; SENGUPTA, U.; SINHA, S.; IVANYI, J. A comparative evaluation of serological assays for lepromatous leprosy. Lepr. Rev., v.59, p.195-9, 1988.
- MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D.; FROLAND, S.; SONG, Y. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. Clin. Exp. Immunol., v.14, p.541-53, 1973.
- NAGAI, S.; HORIE, Y.; AKAI, T.; TAKEDA, S.; TAKAKU, A. Superior sagittal sinus thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome—case report. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), v.38, p.34-9, 1998.
- NOORDEEN, S. Elimination of leprosy as a public health problem: progress and prospects. Bull. World Health Organ., v.73, p.1-6, 1995.
- OPROMOLLA, D.; ARRUDA, M.; URA, S.; PERNAMBUCO, J.; BASTAZINI, I.; FLEURY, R.; TOLENTINO, M.; TONELLO, C.; ARRUDA, O. Developmental aspects of the Rubino reaction. Med. Cutan. Ibero Lat. Am., v.10, p.9-14, 1982.
- ORDI, J.; SELVA, A.; MONEGAL, F.; PORCEL, J.; MARTINEZ-COSTA, X.; VILARDELL, M. Anticardiolipin antibodies and dependence of a serum cofactor. A mechanism of thrombosis. J. Rheumatol., v.20, p.1321-4, 1993.

- PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.-C. Identification of IgM as the leprosy patient serum factor responsible for rapid sedimentation of formalized sheep erythrocytes. Int. J. Lepr., v.63, p.231-40, 1995.
- PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.-C. 70th anniversary of the Rubino reaction /Editorial/. Int. J. Lepr., v.64, p.316-9, 1996.
- PAULLIER, V.C.; ERRECART, L. Reacción de los globulos formolados y naturales de oveja frente a algunos sueros humanos. Rev. méd. lat.-amer., v.11, p.2197-201, 1926.
- 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., v.21, p.836-8, 1928.
- PETCHCLAI, B.; KHUPULSUP, K.; HIRANRAS, S.; SAMPATAVANICH, S.; SAMPOONACHOT, P.; LEELARUSAMEE, A. A passive hemagglutination test for leprosy using a synthetic disaccharide antigen. Int. J. Lepr., v.56, p.255-8, 1988.
- PRICE, B.; RAUCH, J.; SHIA, M.; WALSH, M.; LIEBERTHAL, W.; GILLIGAN, H.; OQLAUGHLIN, T.; KOH, J.; LEVINE, J. Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. J. Immunol., v.157, p.2201-8, 1996.
- RAMOS, T.; ZALCBURG-QUINTANA, I.; APPELBERG, R.; SARNO, E.; SILVA, M. T-helper cell subpopulations and the immune spectrum of leprosy. Int. J. Lepr., v.57, p.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, v.19, p.137-42, 1988.
- RIDLEY, D.; JOPLING, W. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int. J. Lepr., v.34, p.255-73, 1966.

- ROCA-DE-VIÑALS, R. Contribución al estudio del serodiagnóstico de la lepra. La reacción de Rubino. Cron. méd.-quir. Habana, v.60, p.27-30, 1934.
- ROCHE, P.; BRITTON, W.; NEUPANE, K.; FAILBUS, S.; CHO, S.; THEUVENET, W. The response to chemotherapy of serum *Mycobacterium leprae*-specific antigen in multibacillary leprosy patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.44, p.702-8, 1991.
- RUBINO, M.C. Nueva reacción sorológica en la lepra. Rev. méd. Uruguay, v.29, p.143-55, 1926a.
- RUBINO, M.C. Nueva reacciones sorológicas en la lepra. Rev. Soc. arg. Biol., v.2, p.407-16, 1926b.
- RUBINO, M.C. Nouvelle réaction sorologic dans la lèpre. Rev. méd. Uruguay, v.32, p.85-116, 1929.
- RUBINO, M.C. Séro-diagnostic de la lèpre par la agglutino-sédimentation des globules rouges de mouton formolés. Bull. Acad. Med., v.105, p.890-3, 1931a.
- RUBINO, M.C. Séro-diagnostic de la lèpre par l'agglutino-sédimentation des globules de mouton formolés. Ann. Inst. Pasteur, v.47, p.147-72, 1931b.
- RUBINO, M.C. Untersuchungen zur Verwendung formolfixierter Hammelblutkoerperchen in der Serodiagnostik. Zbl. Bakt. I. abt. orig., v.1120, p.378-84, 1931c.
- SAMPAIO, E.; MALTA, A.; SARNO, E.; KAPLAN, G. Effect of rhuIFN-gamma treatment in multibacillary leprosy patients. Int. J. Lepr., v.64, p.268-73, 1996.
- SANTOS, A.; DE MIRANDA, A.; SARNO, E.; SUFFYS, P.; DEGRAVE, W. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. J. Med. Microbiol., v.39, p.298-304, 1993.
- SANTOS, A.; NERY, J.; DUPPRE, N.; GALLO, M.; FILHO, J.; SUFFYS, P.; DEGRAVE, W. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of

- leprosy. J. Med. Microbiol., v.46, p.170-2, 1997.
- SCHNAAR, R. Isolation of glycosphingolipids. Methods Enzymol., v.230, p.348-70, 1994.
- SCHNAAR, R.L.; NEEDHAM, L.K. Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. Methods Enzymol., v.230, p.371-89, 1994.
- SCHWARTZ, R.S. Autoimmunity and autoimmune diseases. In: PAUL, W.E. Fundamental immunology. New York; Raven Press, Ltd.,1993. Cap.30, p.1033-97.
- SILVA, O.P.; FERRI, R.G.; MORAES, N.; MARQUES, A.L.V. Estudos imunoquímicos na hanseníase. I - Eletro e imunoeletroforese das proteínas séricas. Tentativa de associação com a reação de Rubino. Hansen. Int., v.1, p.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., v.1, p.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., v.1, p.120-4, 1976c.
- SINHA, S.; SENGUPTA, U.; RAMU, G.; IVANYI, J. Serological survey of leprosy and control subjects by a monoclonal antibody-based immunoassay. Int. J. Lepr., v.53, p.33-8, 1985.
- SPANNEDA, A. Sulla reazione di Rubino nella lepra. Rev. sud.-amer. Endocr., v.15, p.508-16, 1932.
- STEINKASSERER, A.; ESTALLER, C.; WEISS, E.; SIM, R.; DAY, A. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I.

Biochem J., v.277 (Pt 2), p.387-91, 1991.

TALHARI, S. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Diagnosis, classification and prognosis. Int. J. Lepr., v.64, p.S13-4; discussion S4-5, 1996.

TARR, G.E. Rapid separation of amino acid phenylthiohydantoins by isocratic high performance liquid chromatography. Anal. Biochem., v.111, p.27-32, 1981.

TERNYNCK, T.; FALANGA, P.B.; UNTERKIRSCHER, C.; GREGOIRE, J.; DA-SILVA, L.P.; AVRAMEAS, S. Induction of high levels IgG autoantibodies in mice infected with *Plasmodium chabaudi*. Int. Immunol., v.3, p.29, 1991.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.76, p.4350-4, 1987.

TRAVASSOS, J. Reação de Rubino. Arch. Riogrand. Med., v.7, p.7-11, 1932.

VALESINI, G.; SHOENFELD, Y. A new player in the antiphospholipid syndrome: the beta 2 glycoprotein I cofactor. Autoimmunity, v.14, p.105-10, 1992.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORDS. Progress towards leprosy elimination. Wkly. Epidemiol. Rec., v.72, p.165-72, 1997.

WU, Q.; YE, G.; YIN, Y.; LI, X.; LIU, Q.; WEI, W. Rapid serodiagnosis for leprosy — a preliminary study on latex agglutination test. Int. J. Lepr., v.58, p.328-33, 1990.

YAMAMURA, M.; WANG, X.; OHMEN, J.; UYEMURA, K.; REA, T.; BLOOM, B.; MODLIN, R. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. J. Immunol., v.149, p.1470-5, 1992.

ZEVALLOS, C.A. La lepra en el Ecuador. La reacción de Rubino en el diagnóstico de la lepra. Arch. Lepra, v.4, p.22-64, 1932.