

The background is a watercolor illustration. It features several trees with brown trunks and green foliage on the left side. On the right side, there are tall, thin trees with light-colored bark. In the lower right corner, there are several purple flowers with green leaves. The overall color palette is soft and painterly, with various shades of blue, green, yellow, and purple.

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

***Curso de Pós-Graduação da Área de
Imunologia Básica e Aplicada***

***Identificação da Espécie de RNA de
Saccharomyces cerevisiae Reconhecida
por Anticorpos Presentes no
Soro de Pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico***

Orientador : Prof. Dr. Ivan Fiore de Carvalho

Orientada : Andréia C.K. Kuramoto-Takara

Ribeirão Preto

- 2004 -

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

"Identificação da Espécie de RNA de Saccharomyces cerevisiae
Reconhecida por Anticorpos Presentes no Soro de Pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico"

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

Orientada: Andréia Cristina Kazuo Kuramoto-Takara

Orientador: Prof. Dr. Ivan Fiore de Carvalho

Ribeirão Preto

- 2004 -

Ficha Catalográfica

Kuramoto-Takara, Andréia Cristina Kazue

Identificação da Espécie de RNA de *Saccharomyces cerevisiae* Reconhecida por Anticorpos Presentes no Soro de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Ribeirão Preto, 2004.

56p.; il.; 29,7cm

Bibliografia: p. 50-56

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Fiore de Carvalho

1.Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2.ELISA. 3.Anticorpos Anti-RNA de levedura.

Trabalho executado no Laboratório de Imunogenética Molecular do Depto. de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/FMRPUSP, sob a orientação dos Profs. Drs. Ivan Fiore de Carvalho e Geraldo Aleixo Passos Jr. & no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, sob a direção do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas.

Auxílio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq

"Deus costuma usar a solidão para nos ensinar sobre a convivência.

Às vezes, usa a raiva, para que possamos compreender o infinito valor da paz.

Outras vezes usa o tédio, quando quer nos mostrar a importância da aventura e do abandono.

Deus costuma usar o silêncio para nos ensinar sobre a responsabilidade do que dizemos.

Às vezes usa o cansaço, para que possamos compreender o valor do despertar.

Outras vezes usa doença, quando quer nos mostrar a importância da saúde.

Deus costuma usar o fogo para nos ensinar sobre água.

Às vezes, usa a terra, para que possamos compreender o valor do ar.

Outras vezes usa a morte, quando quer nos mostrar a importância da vida".

-Fernando Pessoa-

Dedicatória

Aos meus pais, Kazunori e Tereza. Obrigada pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e aconchego nas horas difíceis.

Aos meus irmãos, Charles, Rodrigo e Helen. Obrigada pelo carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu querido companheiro e amigo, Hillbert. Obrigada por este momento tão especial, pela confiança e apoio incondicional.

Agradecimentos

A Deus, que, com Seu Amor incondicional, ampara e ilumina meus caminhos. Obrigada !

"Conceda-me, Senhor, a serenidade de necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir uma das outras".

Ao querido orientador Prof. Dr. Ivan Fiore de Carvalho, pela abençoada acolhida e confiança que muito contribuíram para o meu enriquecimento profissional e pessoal. Obrigada pelas oportunidades e inúmeros conselhos.

Ao Prof. Dr. Geraldo Passos Jr., meu co-orientador. Obrigada pela orientação e contribuição durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dimas T. Covas, pela acolhida no Laboratório de Biologia Celular e a oportunidade de me integrar, por um breve período, ao seu grupo de pesquisa.

Às Profas. Dras. Yara M.L. Valim e Lucienir Maria da Silva, pelas valiosas sugestões e conselhos durante a discussão da pró-forma desta dissertação.

Às Dras. Nilce Rossi, Cláudia Maffei e Arlete P. Castelo, pela atenção e sugestões didáticas e metodológicas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP/USP, pela atenção e valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Izor C. Almeida do ICB/USP, pelas discussões e sugestões.

À Luciana M. Kabeya, minha querida amiga e "irmã". Agradeço cada momento que passamos juntas. O seu incentivo constante e sua confiança sempre me fortalecem e dão forças para trilhar o meu caminho. Obrigada por tudo !

OS MILAGRES DA AMIZADE

A Amizade torna os fardos mais leves, porque os divide pelo meio. A Amizade diminui as distâncias - Embora longe, o amigo é alguém perto de nós. A Amizade coloca música e poesia na banalidade do cotidiano. A Amizade é doce canção da vida e a poesia da eternidade. O Amigo é a outra metade da gente. O lado claro e melhor. Sempre que encontramos um amigo, encontramos um pouco mais de nós mesmos. O Amigo revela, desvenda, conforta. É uma porta sempre aberta, em qualquer situação. O Amigo na hora certa é sol ao meio dia, estrela na escuridão. O Amigo é bússola e rota no oceano, porto seguro da tripulação. O Amigo é o milagre do calor humano que Deus opera num coração. Você amigo é tudo isto e muito mais...

A minha nova família: "Mãe" Hiroko, Rie e Raquel, pelo carinho e apoio incondicionais.

As minhas avós, Kameyo e Hatsue, pelo carinho e ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos do Hemocentro de Ribeirão Preto: Léa, Ane Rose, Gustavo, Marília, Maristela, Jorge, Glauce, Andrielle, Elaine, Fabíola, Paulo Henrique, Kiyoko, Vitor, Sandra, Cris Costa, Giziane, Rita, Patrícia Palma, Fabiana, Simone, Beth, Flora, Virginia, Roberta, Luciene, Elisa, Kelen, Rochelle, Adriana, Camila, Cris Aires, Beatriz, Dalila, Paulinho, Vinicius, Aparecida, Sr. Luis, Carminha, Evandra, pelo agradável convívio e apoio.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunogenética Molecular: Ana Maria, Priscilla, Marina, Eduardo, Cris, Ana Lúcia, Daniela, Paula, Glauce, Stephano, Renato, Márcia Maria, Márcia Tamia, Diane, Cláudia, pelo companheirismo, apoio técnico e amizade.

Aos amigos do Curso de Pós Graduação da Área de Imunologia Básica e Aplicada: Bia, Anderson, Elaine, Márcia Maria, Márcia Tamia, Lucinda, Sandro, Rodrigo, Leandro, Sandra, Eduardo Dantas, Rubens, Sérgio, Kátia, Marta, Ana Paula, Kelen, Eduardo Lani, Patrícia Estela, Patrícia Fátima, Elayne, Maristela, Gustavo, Diane, pela ajuda e agradável convívio.

À Ana Cristine, Rosângela e Ronaldo, pelo carinho, atenção e amizade.

À Cris, secretária do Depto. de Apoio Médico, pela dedicação e carinho.

À Dalvinha, amiga querida, pela paciência, confiança e pelos valiosos conselhos.

Aos docentes, amigos e funcionários da Área de Imunologia Básica e Aplicada, pela compreensão, agradável convivência e muitas lições de vida.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia do InCor: Edecio, Leo, Priscila, Eliane, Viviane, Samar, Leticia, Washinton, Clóvis, Renata, Angelina, Simone, Adriana, Sandra Emiko, pela compreensão, ajuda e agradável convivência. Obrigada !

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."

-Theodore Roosevelt-

ABREVIATURAS

A: Absorbância

ANA: Anticorpos Anti-nucleares

APS: Perulfato de Amônio

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato

C1q, C1r, C1s, C4: Componentes da Via Clássica do Sistema Complemento

D.O.: Densidade Óptica

DEPC: Dietilpirocarbonato

EDTA: Ácido Etileno Diaminotetracético

ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

g: gramas

HCFMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

IFI: Imunofluorescência Indireta

L: litro

LES: Lupus Eritematoso Sistêmico

mg: miligrama

ml: mililitro

µg: micrograma

µl: microlitro

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino)-Propanosulfônico

NBT: Azul de Tetrazólio (do inglês Nitro Blue Tetrazolium)

p/v: peso por volume

PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (do inglês Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

RNA: Ácido Ribonucléico

RNA_m: RNA mensageira

RNA_r: RNA ribossômico

RNA_t: RNA transportador

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

TRIS: Tris[Hidroximetil]aminometano

URL: Unidade Relativa de Luminescência

v/v: volume por volume

V: Volts

** g: gravidade*

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1. | Preparação a fresco de leveduras, corada com Nanguim da China e observada em microscópio óptico..... | 29 |
| FIGURA 2. | Eletroforese da preparação de RNA de levedura em gel de agarose com formaldeído, corado com brometo de etídeo..... | 31 |
| FIGURA 3. | Perfil cromatográfico das frações obtido por leituras no comprimento de onda de 260 nm..... | 33 |
| FIGURA 4. | Efeito da hidrólise alcalina sobre o reconhecimento de anticorpos presentes no soro de pacientes com LES..... | 36 |
| FIGURA 5. | Avaliação do efeito do fracionamento do RNA de levedura em coluna de oligo dT-Celulose sobre o reconhecimento dos anticorpos presentes no soro de portadores com LES..... | 38 |
| FIGURA 6. | Reação de imunodeteção com soro de pacientes portadores de LES..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|-----------|
| TABELA 1. | <i>Manifestações Clínicas do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....</i> | <i>3</i> |
| TABELA 2. | <i>Crterios para classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....</i> | <i>4</i> |
| TABELA 3. | <i>Auto-anticorpos associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico...</i> | <i>8</i> |
| TABELA 4. | <i>Avaliação do efeito da hidrólise alcalina com KOH 1N sobre o reconhecimento dos anticorpos presentes no soro de indivíduos com LES.</i> | <i>35</i> |

RESUMO

O estudo teve como objetivo investigar a presença de anticorpos anti-RNA de levedura em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (LES). A literatura recente descreve numerosos auto-anticorpos dirigidos a ácidos nucleicos complexados com proteínas, mas praticamente nada está estabelecido em termos de anti-RNA nu de levedura. Considerando a relevância das funções do RNA na biologia celular e, em adição, a necessidade de esclarecimento dos mecanismos atuantes na imunopatogênese das doenças auto-imunes, a presença de anticorpos anti-RNA nestas doenças deve ter um significado. Neste trabalho, o método de detecção de anticorpos anti-RNA utilizado foi a técnica de ELISA, amplificada por luminescência. Foi constatado que ambas frações de RNA de levedura isoladas em nosso laboratório [Poli (A) e Poli (A⁺)], foram reconhecidas por anticorpos presentes no soro de pacientes com LES; no entanto, os títulos obtidos das frações de RNA Poli (A) foram significativamente mais elevados quando comparado aos títulos de RNA Poli (A⁺) ($p=0,01$). Uma explicação seria a instabilidade e labilidade da molécula, reduzindo, de forma significativa, os títulos. Foi elaborado uma técnica de "blotting" para determinar a fração de RNA imunogênica, o método foi sensível e específico, no entanto, é necessário aperfeiçoar a técnica. Espera-se que os achados desse estudo possam contribuir, de alguma maneira, para elucidação dos mecanismos de auto-imunidade, haja visto a importância da atividade biológica desempenhada pelo RNA na biologia celular.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the presence of anti-yeast RNA antibodies on systemic lupus erythematosus patients (LES). Recently, it has been described a wide variety of autoantibodies against protein-nucleic acid complexes but little is known about antibodies anti-yeast single RNA. Taking into account the importance of RNA roles on cellular biology, and the need of elucidation of the underlying mechanisms involved in autoimmune diseases pathogenesis, the presence of anti-RNA antibodies on LES should be relevant. At this work, anti-RNA antibodies were detected by using luminescence-enhanced ELISA. We found that serum antibodies from LES patients recognized the fractions Poli (A⁻) and Poli (A⁺) of yeast RNA isolated in our laboratory; however, Poli (A⁻) RNA titres were significantly higher than Poli (A⁺) RNA ($p=0,01$). The observed small titres could be related to the instability and lability of RNA molecules. A sensitive and specific blotting technique was created to detect the immunogenic RNA fraction; however, it needs to be improved. We hope the findings of this work could contribute to elucidate some autoimmunity underlying mechanisms, by focusing on the relevant biological role of RNA for cellular biology.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| ABREVIATURAS..... | i |
| LISTA DE FIGURAS..... | iii |
| LISTA DE TABELAS..... | iv |
| RESUMO..... | v |
| SUMMARY..... | vi |
| I. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)..... | 1 |
| 1.1.1. Características Gerais e Epidemiologia da Doença..... | 1 |
| 1.1.2. Suscetibilidade Genética ao LES..... | 5 |
| 1.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico & Auto-Anticorpos..... | 6 |
| 1.2.1. Métodos de Detecção..... | 9 |
| 1.3. Anticorpos Anti-RNA & Lúpus Eritematoso Sistêmico..... | 10 |
| 1.3.1. RNA: Estrutura & Função..... | 10 |
| 1.3.2. Anticorpos anti-RNA & LES..... | 11 |
| II. OBJETIVOS..... | 14 |
| III. MATERIAIS & MÉTODOS..... | 15 |
| III.1. Leveduras..... | 15 |
| III.2. Visualização de Leveduras com Nanquim da China..... | 15 |
| III.3. Cultivo e Extração de RNA..... | 16 |
| III.4. Determinação Espectrofotométrica de RNA..... | 17 |

| | |
|---|----|
| III.5. Eletroforese em Gel de Agarose com Formaldeído para Avaliação da Integridade da Amostra..... | 18 |
| III.5.1. Confeção do Gel de Agarose..... | 18 |
| III.5.2. Preparo das Amostras..... | 18 |
| III.5.3. Condições de Eletroforese..... | 18 |
| III.6. Hidrólise Alcalina com KOH 1N..... | 19 |
| III.7. Isolamento de RNA Poli (A ⁺) por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Oligo dT-Celulose..... | 19 |
| III.7.1. Preparo da Coluna de Afinidade..... | 19 |
| III.7.2. Fracionamento..... | 20 |
| III.7.3. Obtenção do Perfil Cromatográfico..... | 21 |
| III.8. Soros..... | 21 |
| III.9. Detecção de Anticorpos Anti-RNA de Levedura pelo Método de ELISA Quimiluminiscente..... | 22 |
| III.9.1. Avaliação do Efeito da Hidrólise Alcalina com KOH 1N sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores de LES..... | 22 |
| III.9.2. Avaliação do Efeito do Fracionamento do RNA de Levedura em Coluna de Oligo dT-Celulose sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores de LES..... | 23 |
| III.10. Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida..... | 24 |
| III.11. Coloração dos Géis de Poliacrilamida..... | 24 |
| III.12. Eletrotransferência do RNA para Membrana de Nylon..... | 25 |
| III.13. Reação de Imunodeteção com Soro de Pacientes Portadores de LES..... | 26 |
| III.14. Análise Estatística..... | 26 |
| IV. RESULTADOS..... | 28 |
| IV.1. Visualização de Leveduras com Nanquim da China..... | 28 |
| IV.2. Determinação Espectrofotométrica de RNA..... | 30 |

| | |
|--|----|
| IV.3. Eletroforese em Gel de Agarose com Formaldeído para Avaliação da Integridade da Amostra..... | 30 |
| IV.4. Isolamento de RNA Poli (A+) por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Oligo dT-Celulose..... | 32 |
| IV.5. Detecção de Anticorpos Anti-RNA de Levedura pelo Método de ELISA Quimiluminescente | 34 |
| IV.5.1. Avaliação do Efeito da Hidrólise Alcalina com KOH 1N sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES..... | 34 |
| IV.5.2. Avaliação do Efeito do Fracionamento do RNA de Levedura em Coluna de Oligo dT-Celulose sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES..... | 37 |
| IV.6. Reação de Imunodeteção com Soro de Pacientes Portadores de LES..... | 39 |
| V. DISCUSSÃO..... | 42 |
| V. CONCLUSÕES..... | 44 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |
| V. APÊNDICE..... | 50 |

I. INTRODUÇÃO

1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

1.1.1. Características Gerais e Epidemiologia da Doença

O primeiro relato na literatura descrevendo as manifestações sistêmicas do lúpus foi realizado em 1895 por William Osler. Até então, o lúpus era considerado apenas uma doença cutânea desfigurante, mas não fatal (SACH & FYE, 2000).

Seu início pode se dar de forma aguda ou insidiosa; é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e de natureza auto-imune, caracterizada pela presença de diversos auto-anticorpos. As alterações patológicas do LES são extremamente variáveis, o que reflete o caráter proteiforme das manifestações clínicas e da evolução da doença. Sua etiologia não está esclarecida, mas o desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética e aos fatores ambientais, como luz ultravioleta e alguns medicamentos (SATO *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2000; COTRAN *et al.*, 2000; SACH & FYE, 2000). A Tabela 1 resume a frequência das manifestações clínicas do LES.

O LES é considerado uma doença relativamente comum, em certas populações pode atingir uma prevalência de 1 em 2.500. É uma doença predominantemente feminina, com uma frequência de 1 em 700 entre mulheres em idade reprodutiva (fator hormonal, provocado pelo efeito do estrógeno) e uma proporção de nove a dez mulheres para 1 homem (ABBAS *et al.*, 2000; COTRAN *et al.*, 2000; SACH & FYE, 2000). O estrógeno tem papel conhecido no estímulo de linfócitos e da resposta imunológica, alguns estudos têm observado que a exposição exógena ao estrógeno (tanto através de contraceptivos orais como em terapias de reposição hormonal) pode ocasionar aumento na incidência de LES (PETRI, 2002).

A incidência da doença em mulheres de origens afro-americanas e afro-caribenhas é bem maior do que em caucasianas. Também é mais frequente em aborígenes do que em caucasianas na Austrália. O fato da doença ser rara na África oriental tem dificultado o entendimento da sua incidência já que, como mencionado anteriormente, a ocorrência em afro-americanas e afro-caribenhas é elevada. No entanto, o LES tem sido identificado em africanas orientais que residem no Reino Unido. Num estudo foi observada a prevalência em mulheres/100.000 foi de 177 em afro-caribenhas, 110 em africanas orientais e 35 em caucasianas. Outros autores confirmaram LES em africanas orientais residindo na França. Pouco se conhece sobre a incidência e prevalência da doença em outras etnias, mas parece ser mais comum em asiáticas do que em caucasianas no Reino Unido (D'Cruz, 2002; Petri, 2002).

Há muitas evidências de que vários fatores ambientais devem estar envolvidos na patogênese do LES. Drogas como hidralazina, procainamida e D-penicilamida podem induzir uma resposta similar ao LES em seres humanos.

Agentes infecciosos podem induzir respostas específicas por mimetismo molecular e perturbar a imunomodulação; a dieta afeta a produção de mediadores inflamatórios; toxinas ou drogas que modificam a responsividade; agentes físico/químicos, como a luz ultravioleta, podem causar inflamação, induzir apoptose na célula e causar dano tecidual (MOK & LAU, 2003; COTRAN et al., 2000).

O aumento no número de corpos apoptóticos poderia sobrecarregar o mecanismo de remoção do sistema retículo-endotelial, tornando-o ineficiente e levando a liberação de uma grande quantidade de antígeno. Por sua vez, este fato poderia levar a resposta imune a produzir mais anticorpos e levar a formação de complexos imunes, produzindo reações inflamatórias em tecidos altamente vascularizados, especialmente a pele e rins. Os complexos imunes poderiam também causar consumo maciço da via clássica do complemento (C1q), intensificando o problema (GORDON & SALMON, 2001).

Devido à manifestação clínica variável da doença a "American College of Rheumatology" (ACR) elaborou critérios para auxiliar o diagnóstico desta moléstia. A definição do diagnóstico baseia-se na presença de pelo menos 4 critérios dos 11 citados na *Tabela 2*.

Tabela 1. Manifestações Clínicas do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

| MANIFESTAÇÃO CLÍNICA | PREVALÊNCIA NOS PACIENTES (%) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Hematológica | 100 |
| Artrite | 90 |
| Cutâneo | 85 |
| Febre | 83 |
| Fadiga | 81 |
| Perda Ponderal | 63 |
| Renal | 50 |
| SNC | 50 |
| Pleurisia | 46 |
| Mialgia | 33 |
| Pericardite | 25 |
| Gastrintestinal | 21 |
| Fenômeno de Raynaud | 20 |
| Ocular | 15 |
| Neuropatia Periférica | 14 |

Tabela 2. Critérios para classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.⁵

| Critério | Definição |
|------------------------------|---|
| 1. Exantema Malares | Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as proeminências malares, poupando as freças nasolabiais |
| 2. Exantema Discóide | Manchas eritematosas elevadas com descamação ceratótica aderente e obstrução folicular; cicatrizes atroficas podem ocorrer nas lesões mais antigas |
| 3. Fotosensibilidade | Exantema devido a uma reação incomum à luz solar por história do paciente ou observação do médico |
| 4. Úlceras Oraís | Úlceração oral ou nasofaríngea, em geral indolor, observada por um médico |
| 5. Artrite | Artrite não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, tumefação ou derrame |
| 6. Serosite | (a) Pleurite – história de dor pleurítica ou ruído de atrito audível ou evidências de derrame pleural, ou (b) Pericardite – documentada por eletrocardiograma, ruído de atrito ou evidências de derrame pericárdico |
| 7. Nefropatia | (a) Proteinúria persistente (>0,5 g/dL ou >3+ se quantificação não for realizada, ou (b) Cilindros celulares – podem ser hemáticos, de hemoglobina, granulares, tubulares ou mistos |
| 8. Distúrbio Neurológico | (a) Convulsões – na ausência de drogas ofensivas ou perturbações metabólicas conhecidas (p.ex., uremia, cetoacidose ou desequilíbrio eletrolítico), ou (b) Psicose – na ausência de drogas ofensivas ou perturbações metabólicas |
| 9. Distúrbio Hematológico | (a) Anemia hemolítica – com reticulose, ou (b) Leucopenia – (< 4.000/mm ³) na contagem de duas ou mais ocasiões, ou (c) Linfopenia (< 1.500/mm ³) em duas ou mais ocasiões, ou (d) Trombocitopenia (< 100 x 10 ³ /mm ³) na ausência de drogas ofensivas |
| 10. Distúrbio Imunológico | (a) Anticorpos contra DNA nativo em título anormal, ou (b) Anti-Sm – presença de anticorpos contra antígeno nuclear Sm, ou (c) Achado positivo de anticorpos antifosfolípido com base em: (1) nível sérico anormal de anticorpos Anti-IgG ou IgM anticardiolipina, (2) um teste positivo para anticoagulante lipídico usando teste padrão, ou (3) um teste sorológico falso-positivo para sífilis que é solidamente positivo há, no mínimo 6 meses e confirmado por um teste negativo de imobilização do <i>Treponema pallidum</i> ou de absorção de anticorpos fluorescentes |
| 11. Anticorpos Antinucleares | Um título anormal de anticorpos antinucleares por imunofluorescência ou ensaio equivalente em qualquer momento da evolução e na ausência de drogas que estão associadas à síndrome do lúpus medicamentoso |

⁵TAN *et al*, 1982; HOCHBERG, 1997 (revisão).

1.1.2. Suscetibilidade Genética ao LES

Através de vários estudos desenvolvidos, uma forte predisposição genética tem sido mostrada no LES. Estudos com gêmeos demonstraram razões concordantes entre gêmeos monozigóticos (24-65%), comparados com 2-9% observados em gêmeos dizigóticos (AHMAD & BRUCE, 2001). Além disso, o aumento na frequência de LES entre parentes de primeiro grau e o elevado risco de desenvolvimento da doença em irmãos de pacientes com LES refletem uma herança poligênica da doença (MOK & LAU, 2003).

Mais de 100 genes podem estar envolvidos com suscetibilidade à doença. A maior contribuição vem da região onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), estudos populacionais revelam que a suscetibilidade ao LES envolve polimorfismos dos genes que codificam as moléculas de classe II dos antígenos leucocitários humanos (HLA). Uma associação de HLA DR2 e DR3 com LES é um achado

comum em pacientes de diferentes etnias, com risco relativo de desenvolver a doença de 2 a 5%. Os genes de classe II do HLA têm sido associados com a presença de certos auto-anticorpos tais como anticorpos anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-nRNP, e anti-DNA (MOK & LAU, 2003; AHMAD & BRUCE, 2001).

Deficiências dos componentes do sistema complemento também influenciam na suscetibilidade ao LES. Os genes de classe III do HLA, particularmente aqueles que codificam os componentes C2 e C4 do sistema complemento, conferem risco para a doença em certos grupos étnicos. Deficiências herdadas nos componentes de C1q, C1r/s e C2 estão associadas ao LES. Uma redução na atividade do complemento poderia promover suscetibilidade à doença pela diminuição da neutralização e "clearance" dos antígenos próprios e estranhos do organismo. Quando o antígeno sobrecarrega a capacidade de "clearance" do sistema imune, pode resultar em autoimunidade (MOK & LAU, 2003).

Diversos genes polimórficos não-MHC têm sido relatados estarem associados ao LES. Como exemplo, genes que codificam a proteína ligante de manose (MBP), fator de necrose tumoral α , receptor de célula T, interleucina 6 (IL-6), Fc γ R1IA e Fc γ R1IIA (ambos receptores Fc da IgG). Alguns destes genes polimórficos podem conferir riscos a certos subconjuntos de pacientes com LES. O polimorfismo no Fc γ R1IA tem sido associado com nefrite em afro-americanos e coreanos, já o polimorfismo no Fc γ R1IIA com LES em populações de origem hispânica e caucasiana (MOK & LAU, 2003). Tem se atribuído que um polimorfismo no Fc γ R1IA afeta o metabolismo dos complexos imunes e influencia as manifestações clínicas e curso do LES, no entanto, isso não representa um fator de risco para o desenvolvimento da doença (HERRMANN et al., 2000).

1.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico & Auto-Anticorpos

Por longo tempo, acreditava-se que a auto-reatividade era associada apenas com patologia, provavelmente porque os auto-anticorpos eram considerados uma marca registrada nas doenças auto-imunes. A ocorrência de auto-anticorpos aparentemente não depende de um estímulo de um antígeno exógeno, pois podem ser detectados no soro de camundongos criados em ambientes livres de microorganismos ("germ-free"). Estes anticorpos possuem papel de importância fisiológica na terapia de uma variedade de doenças inflamatórias e auto-imunes, sob a forma de imunoglobulina intravenosa e obtida de "pools" de plasma de indivíduos saudáveis (KÖHLER et al., 2003).

Desconhece-se a causa do LES, mas a existência de uma gama ilimitada de anticorpos nesses pacientes contra seus próprios constituintes indicaria que o defeito fundamental no LES seja uma falha dos mecanismos reguladores que mantêm a autotolerância. Foram identificados auto-anticorpos contra uma série de moléculas da superfície celular, componentes nucleares e citoplasmáticos, assim como contra moléculas solúveis como IgG e fatores de coagulação (MOK & LAU, 2003; COTRAN et al., 2000).

Anticorpos antinucleares, ANA, são os mais característicos e presentes em mais de 95% dos pacientes (D'CRUZ, 2002). Estes, são bastante heterogêneos, geralmente de isotipos policlonais mistos, com afinidade e avidéz variadas e são direcionados contra múltiplos órgãos (EGNER, 2000).

Os auto-anticorpos no LES são predominantemente da classe IgG; estes, podem estar presentes na forma de imunoglobulina de superfície, nas células B onde atuam como receptores de antígeno estranho, ou são secretados pelos plasmócitos. Embora possam ser produzidos sem o auxílio das células T, os anticorpos no LES demonstram uma dependência típica da célula T: mudança de classe (de IgM para IgG), alta afinidade e formação de hipermutação somática (GORDON & SALMON, 2001).

A caracterização desses auto-anticorpos (ANA) possui valor tanto no diagnóstico como no manejo dos pacientes com LES. Os ANA são direcionados contra diversos antígenos nucleares e podem ser agrupados em 4 categorias: (1) anticorpos contra DNA; (2) Anticorpos contra histonas; (3) anticorpos contra proteínas que não-histônicas e (4) anticorpos contra antígenos nucleolares. A Tabela 3 cita vários auto-anticorpos e sua associação ao LES (COTRAN *et al.*, 2000).

Tabela 3. Auto-anticorpos associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico.²

| NATUREZA DO ANTÍGENO | SISTEMA DE ANTICORPOS | % POSITIVO |
|---|-----------------------|------------|
| | | LES |
| Muitos antígenos nucleares (DNA, RNA, proteínas) | ANA | > 95 |
| DNA nativo | Anti-DNA dupla fita | 40-60 |
| Histonas | Anti-histona | 50-70 |
| Proteínas centrais de pequenas partículas de ribonucleoproteína nuclear (antígeno de Smith) | Anti-Sm | 20-30 |
| Ribonucleoproteína (U1RNP) | Anti-RNP nuclear | 30-40 |
| RNP | SSA (Ro) | 30-50 |
| RNP | SS-B (La) | 10-15 |
| Topoisomerase I do DNA | Scl-70 | < 5 |
| Proteínas centroméricas | Anticentrômero | < 5 |
| Histidil-t-RNA-sintetase | Jo-1 | < 5 |

²Modificado de COTRAN *et al.*, 2000.

Anticorpos anti-DNA de duplo filamento e anti-Sm são únicos em pacientes com LES e sua presença está incluída no critério de classificação do LES. O antígeno Sm é designado como uma ribonucleoproteína nuclear de pequena (snRNP) e é composta de um conjunto de moléculas de RNA rico em uridina ligado a um grupo de proteínas centrais e outras proteínas associadas com moléculas de RNA. Anticorpos anti-Sm reagem com o centro de proteínas do snRNP, já anticorpos anti-DNA se ligam a ácidos nucleicos conservados na molécula de DNA. Os

títulos de anticorpos anti-DNA frequentemente varia durante o tempo a atividade da doença, mas os títulos de anticorpos anti-Sm geralmente permanecem constante (MOK & LAU, 2003).

ARBuckle et al. (2003) descreveram o desenvolvimento sequencial de auto-anticorpos que ocorreram em pacientes anos antes da doença tornar a ser clinicamente evidente. Eles observaram que o intervalo entre o primeiro teste positivo para os anticorpos anti-DNA de duplo filamento, anti-Sm e anti-ribonucleoproteína nuclear e o início das manifestações clínicas da doença era menor do que para anticorpos anti-Ro, anti-La, anti-fosfolípido e antinuclear.

1.2.1. Métodos de Detecção de Auto-anticorpos

Os métodos utilizados na detecção de auto-anticorpos variam muito em relação à especificidade e sensibilidade. As técnicas de precipitação que compreende a imunodifusão dupla (ID), utilizadas para determinação da especificidade de auto-anticorpos; a contra-immunoeletoforese (CIE), similar a ID, porém mais sensível e o método de "immunoblotting" (IB), que apresenta sensibilidade e útil na caracterização da natureza específica dos antígenos e dos isotipos dos auto-anticorpos, contudo, o grau de detecção é menor do que na CIE.

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) possui alta sensibilidade e possibilita a detecção de auto-anticorpos com diferentes condições clínicas e em aproximadamente 5% de pessoas não idosas normais. O método é útil para o diagnóstico de LES, mas inadequado para o monitoramento do curso clínico da doença e da terapia.

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) detectam anticorpos com alta e baixa afinidade, são altamente sensíveis e rápidos de serem executados (WUNDER,2001; EGNER, 2000; COTRAN et al., 2000).

1.3. Anticorpos Anti-RNA & Lúpus Eritematoso Sistêmico

1.3.1. RNA: Estrutura & Função

O RNA é um polímero longo-não ramificado, consistindo em nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster 3' → 5'. um nucleotídeo consiste em uma base nitrogenada, uma ou mais radicais de fosfato. As moléculas de RNA podem ser uni ou bifilamentares, no entanto, não podem formar uma dupla hélice do tipo β como encontrado no DNA. A estrutura covalente do RNA difere da molécula de DNA em dois aspectos: (1) o açúcar que constitui o RNA é ribose em vez de desoxirribose (a ribose contém um grupamento 2'-hidroxila, ausente na desoxirribose) e, (2) a outra diferença é que uma das quatro bases principais do RNA é uracila (U), em vez de timina (T). A uracila, como a timina, pode formar um par de bases com adenina (A), mas não tem o radical metila presente na timina (STRYER, 1996).

Dentre todas as biomoléculas orgânicas conhecidas presentes no interior de uma célula viva, as moléculas de ácido ribonucleico (RNA) são as únicas que armazenam a informação genética e atuam como catalisadores. Este fato levou alguns autores a assumirem que as moléculas de RNA exercem um papel essencial nas primeiras vias metabólicas (MELI *et al.*, 2001).

As moléculas de RNA possuem um papel importante na biologia contemporânea, especialmente no que diz respeito aos processos celulares altamente conservados. Estão envolvidas na replicação do DNA, como "primers"; um mensageiro que carrega a informação genética para a maquinaria de tradução e um catalisador que se localiza no centro do ribossomo. O RNA instrui o processamento dos pré-RNAs durante o "splicing" e edição, e medeia outras numerosas transações de RNA e proteínas na célula (JOYCE, 2002).

1.3.2. Anticorpos anti-RNA & LES

Ainda permanece uma incógnita o fato de auto-anticorpos terem capacidade de se ligarem à molécula de RNA, pois tanto as moléculas de RNA como de DNA são consideradas pouco imunogênicas. A reatividade do RNA com anticorpos tem sido visto como o resultado de uma reatividade cruzada acidental do RNA com outros imunógenos presentes na célula, ou da apresentação de fragmentos de RNA ao sistema imune seguido por uma quebra da discriminação do próprio com o não-próprio (HIROKAWA et al., 2002).

A presença de auto-anticorpos no LES direcionados contra RNA nativo de fita dupla ou simples foi relatada há mais de 3 décadas. Apesar de terem despertado pouco interesse, devido ao fato que anticorpos anti-DNA possuem melhor correlação com a patogênese do LES, EILAT & ANDERSON (1994) relatam que têm estudado os auto-anticorpos anti-RNA₁ e anti-RNA₂ no soro de pacientes com LES em camundongos NZB/NZW F1. Eles demonstraram que as populações de anticorpos que se ligavam aos polirribonucleotídeos eram distintas daquelas populações que se ligavam aos polideoxirribonucleotídeos. Demonstraram, através de ensaios de competição, que anticorpos anti-RNA se ligavam preferencialmente a RNA nativo de fita simples quando comparado com homopolirribonucleotídeos sintéticos, de fita dupla ou simples, sugerindo uma especificidade de sequência e/ou conformacional destes anticorpos.

O primeiro relato na literatura que demonstrou a presença de anticorpos reativos ao RNA de levedura em circulação no sangue de pacientes afetados pelo LES, por intermédio de imunofluorescência, foi feito por WATANABE et al., em 1969, a contrário dos resultados negativos obtidos com imunodifusão radial (SCHUR & MOORE, 1969).

Desde então, numerosos estudos foram publicados sobre a existência de anticorpo anti-RNA com enorme diversidade de resultados, possivelmente em razão do uso de antígenos de variadas origens e diferentes metodologias.

NAGPAL et al., 1990 demonstraram a presença de auto-anticorpos, da classe IgE, específicos para RNA₁ de levedura, utilizando uma combinação das técnicas de radioensaio de fase sólida e ELISA.

Quanto à natureza do antígeno, COSTA et al., (1985) compararam os níveis de anticorpos contra RNAs naturais de diferentes origens (fígado bovino e *E. coli*) e RNAs sintéticos de fita dupla e simples em 3 doenças auto-imunes (LES, esclerose sistêmica e artrite reumatóide), utilizando como método de detecção o ELISA. Eles observaram que, independente da origem do ácido nucléico, os anticorpos presentes nos soros de pacientes com LES podiam se ligar a uma variedade maior de ribonucleotídeos do que nas outras 2 doenças. Este maior reconhecimento foi interpretado por eles que: ou os anticorpos eram dirigidos contra determinantes comuns para diferentes nucleotídeos ou o soro continham vários tipos de anticorpos que reconheciam determinantes próprios para cada nucleotídeo.

Na realidade, apenas uma minoria de investigadores preocupou-se com a questão dos anticorpos anti-RNA de levedura, ao passo que a série de trabalhos voltados aos auto-anticorpos reativos às RNA polimerases e proteínas

complexadas com RNAs nucleares pequenos é extensa e continua crescendo. Em adição, como já registrado até em livro-texto de doenças reumáticas, os poucos estudos sobre anticorpos com a propriedade de se ligarem a ácido ribonucléico desproteínizado (como é o caso desta proposta) não estabeleceram de maneira convincente o real significado deles no contexto clínico (PENG & CRAFT, 2001). Por outro lado, também se observam outros aspectos problemáticos na metodologia utilizada em alguns destes trabalhos: falta de informação sobre o estado da integridade do RNA de levedura empregado como antígeno e obtido comercialmente (BLANCO *et al.*, 1991), além de outras questões metodológicas: tratamento estatístico inadequado para distribuições não-gaussianas (TEODORESCU & FROELICH, 1994).

Esta proposta de investigação tem com finalidade contribuir no entendimento da imunopatogenia das doenças auto-imunes. Neste trabalho, o antígeno (auto-antígeno?) é uma molécula de atividade biológica fundamental, o RNA, e a presença de anticorpos (auto-anticorpo?) circulante deve ter um significado clínico e biológico que merece atenção sob vários aspectos. Sabendo-se que anticorpos podem ser internalizados intracelularmente, há a possibilidade de afetarem o funcionamento celular; outra questão interessante seria discriminar o mecanismo de formação de auto-anticorpo (indução por mimetismo molecular?). Seja como for, a presença deste anticorpo reativo a um RNA altamente conservado evolutivamente não pode ser ignorado e ser considerado, apenas, como um epifenômeno.

II. OBJETIVOS

Com o intuito de elaborar uma ferramenta capaz de auxiliar no diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1. Preparar RNA total de Saccharomyces cerevisiae no próprio laboratório (sem contaminação de DNA e proteínas), tendo em vista definir a especificidade do auto-anticorpo circulante nos pacientes portadores de LES;*
- 2. Utilizar como método de detecção a técnica de ensaio imunoenzimático com quimiluminescência (ELISA-CL);*
- 3. Definir a fração de RNA imunogênica;*
- 4. Elaborar método de detecção específico e sensível neste laboratório que permitisse identificar a fração de RNA com propriedade antigênica;*

III. MATERIAIS e MÉTODOS

III.1. Leveduras

- *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem INVSc-1 (Invitrogen Co.)
- *Saccharomyces cerevisiae*, adquirida comercialmente (Fermento Biológico Fleischmann).

III.2. Visualização de Leveduras com Nanquim da China

Aproximadamente 100 mg de células frescas foram ressuspensas e homogeneizadas em 1 ml de NaCl 0,85%. Realizou-se uma diluição de 10 vezes e cerca de 10 µl foi depositado sobre a superfície de uma lâmina de microscópico, juntamente com o mesmo volume de nanquim da China. A imagem foi capturada por uma câmera digital acoplada ao microscópio e, em seguida, processada por um "software" de imagens.

Este método é utilizado rotineiramente para o diagnóstico confirmatório de meningites ocasionadas por *Cryptococcus neoformans* (formas encapsuladas e em gemulação), isolados de fluidos corporais como liquor, urina ou pus.

É uma técnica rápida e de fácil execução, onde células frescas são ressuspensas em solução salina e Nanquim da China. Em seguida, a preparação foi observada em microscópio óptico, no máximo aumento e, ao aplicar um filtro azul, refinou a visualização, aumentando o contraste e a nitidez.

III.3. Cultivo e Extração de RNA

Para propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem INVSc-1, foi utilizado o meio de cultura YED, mantido sob agitação, em banho-maria a 30 °C, por aproximadamente 18 horas (ITO et al., 1983).

A extração de RNA seguiu o método proposto por CHOMCZINSKY & SACCHI (1987) para a extração de RNA. As leveduras foram recolhidas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos a 4 °C. As células foram lavadas por 3 vezes com NaCl 0,85% estéril para remoção do meio de cultura e secas com papel de filtro estéril. O peso seco das leveduras foi determinado com uma balança de precisão para, em seguida, estimar os volumes das demais soluções necessárias no procedimento de extração. As células foram transferidas para um gral de porcelana estéril, onde, cuidadosamente, despejou-se sobre elas nitrogênio líquido. A maceração foi realizada com um pistilo de porcelana até a obtenção de um pó esbranquiçado e fino. Ainda no gral, foi adicionada a Solução Denaturante que,

lentamente, foi homogeneizada até a obtenção de uma mistura viscosa. Com uma pipeta volumétrica estéril, a mistura foi transferida para um tubo cônico estéril de 50 mL e adicionado o restante das soluções de acordo com a seguinte proporção: para cada 100 mg de material foi adicionado 1 mL de Solução Denaturante; 0,1 mL de NaAc 2 mol/L, pH 4,0; 1 mL de Fenol saturado em água e 0,2 mL de Clorofórmio : Álcool Isoamílico (49:1). A cada adição é necessária uma homogeneização leve em vórtex e, por fim, manter a mistura no gelo por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se a 8.000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida num outro tubo, misturada com 3 volumes de Álcool Isopropílico a -20°C e mantida a -20°C por 18 horas para precipitação. O RNA foi recolhido por centrifugação a 8.000 x g a 4°C por 15 minutos e o precipitado foi lavado, cuidadosamente, com Álcool Etilico 75%, seco e dissolvido com Água Milli-Q tratada com DEPC 0,1%.

Foi realizado o mesmo procedimento descrito acima para a extração de RNA utilizando leveduras adquiridas comercialmente, com ligeiras modificações.

III.4. Determinação Espectrofotométrica de RNA

As amostras extraídas foram quantificadas no leitor espectrométrico ULTROSPEC 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech). A preparação foi diluída 100 vezes em água tratada com DEPC 0,1% e submetida à leitura nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm.

A leitura no comprimento de 260 nm nos permite calcular a concentração de ácido nucleico, onde, 1 unidade de densidade óptica equivale a aproximadamente 40 µg/mL de RNA.

Uma maneira, consagrada e aceita desde os meados da década de 60, de verificar se a preparação estava isenta de contaminantes foi avaliar as razões entre as leituras entre A_{230}/A_{260} e A_{260}/A_{280} . Para que a preparação fosse considerada livre de fenol é ideal que a relação entre A_{230}/A_{260} estivesse entre 0,65 e 0,80 e livre de proteínas com relações A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,0. Foram consideradas adequadas para os experimentos propostos neste estudo todas as amostras que apresentaram os valores citados acima.

III.5. Eletroforese em Gel de Agarose com Formaldeído para Avaliação da Integridade da Amostra

III.5.1. Confeção do Gel de Agarose

A integridade da preparação foi verificada eletroforese em gel de Agarose 1,5% (SAMBROOK *et al.*, 1989) preparado com Água Milli-Q e fundida em forno de microondas, num volume de 70 mL. A agarose fundida foi resfriada para 50-60 °C, e, em seguida, foi adicionado a ela: 20 mL de Formaldeído 37% e 22 mL de Tampão de Migração (MOPS) 5 vezes concentrado, totalizando um volume de 110 mL. O gel fundido é despejado num suporte acrílico, previamente tratado com NaOH 0,5 mol/L e lavado com Água Milli-Q com DEPC 0,1%, para polimerização.

III.5.2. Preparo das Amostras

Em 2,0 µL de amostra foram adicionados: 2,0 µL de Tampão de Migração MOPS [5X]; 3,5 µL de Formaldeído 37%; 10 µL de Formamida Destilada e 1,0 µL de Brometo de Etídeo 10 mg/mL, em seguida, a mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria a 65 °C. Imediatamente após a incubação, esta foi resfriado em banho de gelo e adicionou-se 2,5 µL de Solução de "Loading Dye".

III.5.3. Condições de Eletroforese

As amostras foram aplicadas no gel de agarose em temperatura ambiente e submetida a um campo elétrico de 80-100 V durante aproximadamente 1 hora e meia. Em seguida, as bandas foram observadas através de transluminador de luz ultravioleta (UV) e documentadas em filme Polaroid.

III.6. Hidrólise Alcalina com KOH 1N

Cerca de 100 µg de RNA total foi adicionado a 2 mL de KOH 1 mol/L e incubado por 24 horas a 37 °C. A mistura foi submetida à fervura por 20 minutos e, com HCl 0,5 mol/L, neutralizada para pH 7,0.

III.7. Isolamento de RNA Poli (A⁺) por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Oligo dT-Celulose

III.7.1. Preparo da Coluna de Afinidade

De acordo com AVIV & LEDER (1977), foi empregada uma coluna de material plástico com 0,5 g de Oligo (dT)- Celulose (SIGMA). Após a pesagem, a resina foi ressuspensa em NaOH 0,1 N e aplicada, cuidadosamente, na coluna sobre uma placa sinterizada que ocluiu a abertura. A coluna permaneceu equilibrando por 18 horas a temperatura ambiente. Após este tratamento, passou-se o Tampão de TRIS-HCl 10 mM, pH 7,5 + NaCl 0,4 M (tampão de alta força iônica) até que o pH do eluato alcançasse 7,5 e absorvância em 260 nm estivesse próximo a zero.

III.7.2. Fracionamento

Cerca de 100 unidades de absorvância a 260 nm de RNA (4 mg) foram dissolvidos em 10 mL de Tampão de Alta força iônica. O fato deste tampão conter íons Na^+ e Cl^- favorece o anelamento da cauda de adenina do RNAm na sequência de timinas da matriz da coluna. O RNAm permanece imobilizado na coluna, permitindo apenas a passagem da população de RNA Poli (A). Quando, novamente, a absorvância do eluato se aproximou de zero (por volta da 25.ª fração) substituiu-se o tampão com um de baixa força iônica, removendo o RNAm da coluna.

A coluna foi colocada dentro de um tubo cônico de 50 mL estéril, de maneira que todo o volume que passasse por ela fosse recuperado no fundo deste. Foi aplicado sobre a superfície da coluna 1 mL de cada vez, em seguida, realizou-se ciclos curtos e rápidos de centrifugação em centrífuga de mesa, com rotor móvel. O eluato era retirado com uma pipeta e colocado em tubos de 1,5 mL, devidamente identificado com o número da respectiva fração. As frações eram mantidas em gelo até o término do procedimento para posterior leitura no espectrofotômetro. Eluiu-se a coluna com este tampão até a 24.ª fração. Na altura da 25.ª fração foi fornecido o Tampão TRIS-HCl 10 mM, pH 7,5 (tampão de baixa força iônica) coletando até a 35.ª fração.

Comumente esta técnica é utilizada para confecção de bibliotecas de DNAs complementares ou cDNAs, sintetizadas *in vitro* a partir de RNAs mensageiros isolados. Simplificadamente, o polímero que compõe a fase estacionária da coluna de cromatografia de afinidade é constituído de várias timina (oligo dT) que é complementar à cauda poliadenilada presente no RNAm. Em condições normais, cerca de 4% do RNA total de uma célula é constituído por RNAm, o restante é composto pelos RNAs ribossômicos e transportadores e denominados RNAs Poli (A).

III.7.3. Obtenção do Perfil Cromatográfico

As leituras para a obtenção dos perfis cromatográficos foram realizadas o leitor espectrométrico ULTROSPEC 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando uma cubeta de quartzo previamente tratada com Hipoclorito de Sódio 10% e lavada, por várias vezes, com Água Milli-Q com DEPC 0,1%.

III.8. Soros

Soros de indivíduos portadores de LES foram obtidos de pacientes clinicamente avaliados apresentando pelo menos 4 ou mais manifestações clínico-laboratoriais de acordo com os critérios preconizados pela "American College of Rheumatology". Estes, foram colhidos no período de 1994 a 2001 de pacientes atendidos no ambulatório e na enfermaria de Imunologia Clínica e registrados no HCFMRP/USP.

Os soros controles foram obtidos de doadores voluntários, saudáveis e normais, do banco de sangue da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, atualmente Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP/USP.

III.9. Detecção de Anticorpos Anti-RNA de Levedura pelo Método de ELISA Quimiluminescente

Esta técnica foi padronizada no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto em 1997 por CHEDIACK et al., sob a supervisão do Prof. Dr. Igor C. Almeida e da bióloga pesquisadora Léa Mara T. Soussumi.

O cálculo do título, expresso como unidade relativa de luminescência (URL), das reações foi realizada da seguinte forma: o valor das leituras do soro teste foi subtraído do valor obtido da leitura dos poços que continham todos os reagentes, com exceção do soro (branco).

III.9.1. Avaliação do Efeito da Hidrólise Alcalina com KOH 1N sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES

Primeiramente, cada poço da placa opaca de microtitulação (Nunc) foi revestido com 1 µg de RNA de levedura total ou RNA submetido à hidrólise alcalina (100 µL) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas por 2 vezes com Solução Tamponada

com Fosfatos contendo Tween 20 0,05% (PBS/Tween) e bloqueadas por 2 horas a 37 °C com 200 µL de PBS/Tween e Leite Desnatado 5%.

Novamente, as placas foram lavadas por 4 vezes com PBS/Tween. Adicionou-se a solução de soro humano (teste) diluído 1:1600 em PBS/Tween e Leite Desnatado 5%, usando 100 µL por poço e incubando por 30 minutos a 37 °C.

Em seguida, novas lavagens foram realizadas como as citadas anteriormente e incubou-se por 30 minutos a 37 °C com 100 µL de solução de Anti-IgG humano produzido em cabra e conjugado com biotina (AMERSHAM LIFE SCIENCE), diluído 1:2000 em PBS/Tween e Leite Desnatado 5%.

Repetiu-se o ciclo de lavagem e em seguida, foi aplicada a solução de Streptavidina-Peroxidase (AMERSHAM LIFE SCIENCE) diluída 1:1000 em PBS/Tween e Leite Desnatado 5%, utilizando 100 µL em cada poço e incubando por 30 minutos a 37 °C.

Após o último ciclo de lavagem, feito com PBS/Tween, adicionou-se 100 µL da Solução "enhancer" quimiluminescente, ECL (AMERSHAM LIFE SCIENCE), diluída 1:20 em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6, por poço. A leitura foi realizada após 15 minutos no leitor de microplacas Microplate Luminometer 7700 (Cambridge-England) a 485/530 nm.

A absorbância obtida é diretamente proporcional ao nível de anticorpos, anti-RNA de levedura, presente nos soros dos pacientes analisados e é expresso como Unidade Relativa de Luminescência (URL).

III.9.2. Avaliação do Efeito do Fracionamento do RNA de Levedura em Coluna de Oligo dT-Celulose sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES

Cada poço da placa opaca de microtitulação (Nunc) foi revestido com 1 µg de RNA poli (A⁺) ou RNA poli (A) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. A placa foram incubadas por 18 horas a 4 °C. Excetuando a diluição de 1:1000 dos soros dos pacientes, as demais etapas seguiram àquelas descritas no item anterior.

III.10. Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

Baseado no método de LAEMMLI (1970), os procedimentos utilizados para a análise do RNA de levedura são os mesmos aplicados na análise de proteínas, com algumas modificações. Aplicou-se cerca de 60 µg da amostra de RNA diluída em 5 µL de Solução "Loading Dye", por poço, em géis de poliacrilamida a 4% e 16%. Após a eletroforese, os géis foram corados com Nitrato de Prata, como descrito a seguir. Nos géis que seriam, posteriormente, submetidos à eletrotransferência foram aplicados uma quantidade de 100 µg de RNA em cada poço.

III.11. Coloração dos Géis de Poliacrilamida

Logo após a eletroforese, os géis foram identificados (através de um corte numa das extremidades) e depositados dentro de recipientes de porcelana contendo 150 mL de Solução Fixadora, mantidas sob agitação suave por 5 minutos. Durante a agitação foi adicionado à solução 500 µL de Solução de Nitrato de Prata. A solução foi descartada e, por várias vezes, os géis foram submetidos a sucessivas lavagens com Água Milli-Q. Em seguida, foram mergulhados em 100 mL de Solução de NaOH 2,25% e, após alguns minutos sob agitação, foi aplicado 1,5 mL de Formaldeído 37%. Após o aparecimento das bandas, a solução foi descartada e os géis lavados várias vezes com Água Milli-Q. Ainda úmidos, os géis foram estendidos entre 2 folhas de papel celofane e, sobre uma placa de vidro, presos com fita adesiva até a completa secagem.

III.12. Eletrotransferência do RNA para Membrana de Nylon

A transferência foi realizada imediatamente após a eletroforese. O gel foi removido das placas de vidro e, para facilitar a identificação da sequência das amostras, foi feita uma marca cortando-se uma das extremidades do gel. O gel foi rapidamente mergulhado no tampão de Eletro-transferência e foi montada uma sequência de camadas da seguinte forma: a. Suporte plástico; b. Manta sintética; c. 2 camadas de papel de filtro; d. gel (gel cortado do lado direito - invertido); e. Membrana de nitrocelulose Hybond N+ (Amersham), também cortado do lado direito; f. 2 camadas de papel de filtro; g. Manta sintética; h. Suporte plástico. sanduiche foi montado na própria cuba contendo tampão. A membrana é posicionada no lado do cátodo (+) e os eletrodos foram ligados para correr em 30V por 2 horas, sob refrigeração.

Após a transferência, o sanduiche foi desmontado e o excesso de tampão foi retirado com papel de filtro. A membrana pode ser utilizada imediatamente após o procedimento ou mantida a 4°C, entre folhas de papel de filtro e envolvidas em filme plástico. Para documentação do procedimento, os géis foram digitalizados em Scanner de mesa e processados com programa de imagens.

III.13. Reação de Imunodeteção com Soro de Pacientes Portadores de LES (Revelação Colorimétrica: Fosfatase alcalina + NTB/BCIP)

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 25 mL de Solução Salina Tamponada com Tris contendo Tween 20 0,05% (TBS/Tween) e Leite Desnatado 5% por 1 hora no agitador de bandeja, em temperatura ambiente. A diluição do "pool" de soros de pacientes e indivíduos normais realizada foi de 1:400, em TBS/Tween e Leite Desnatado 5%, por 1 hora, sob agitação e em temperatura ambiente

Após este período de incubação, a membrana foi lavada rapidamente por 3 vezes com TBS/Tween e mais 4 vezes TBS/Tween por 5 minutos cada. Adicionou-se o segundo anticorpo, anti-IgG humano produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (1:1000), diluído em TBS/Tween e Leite Desnatado 5% e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Novamente, a membrana foi lavada rapidamente 3 vezes com TBS/Tween e mais 4 vezes com TBS/Tween por 5 minutos cada. Aplicou-se a solução reveladora que consiste em: 5mL de Tampão AP; 33 µL de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) e 6,3 µL de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl-1-Phosphate (BCIP). Após a revelação a membrana foi lavada com água Milli-Q, seca em papel de filtro e digitalizada para documentação.

III.14. Análise Estatística

Para a avaliação do efeito da hidrólise alcalina sobre o reconhecimento dos anticorpos foi utilizado o teste Wilcoxon, não paramétrico e pareado. Já no teste de avaliação do efeito do fracionamento do RNA sobre o reconhecimento, as comparações estatísticas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney. Os testes foram executados utilizando os softwares GraphPad Prism, Versão 3.0 e GraphPad Instat, Versão 3.0.

IV. RESULTADOS

IV.1. Visualização de leveduras com Nanquim da China

A Figura 1 é uma foto retirada de um campo da lâmina, onde observamos nitidamente as células e algumas organelas em seus interiores. Apesar da rígida e espessa parede celular (composta basicamente por polissacarídeos) da levedura, foi possível visualizá-la devido ao bloqueio quase total de luz, proporcionado pelo corante, que permitiu que ela atravessasse apenas a célula. O procedimento foi realizado tanto com leveduras cultivadas em meio de cultura como adquiridas comercialmente, em ambas condições as células possuíam as mesmas características, como: presença parede íntegra e regular, a superfície destas eram brilhantes e delimitadas por um pequeno halo. Por toda extensão das lâminas foi encontrada apenas a forma encapsulada, não havia presença de células em divisão.

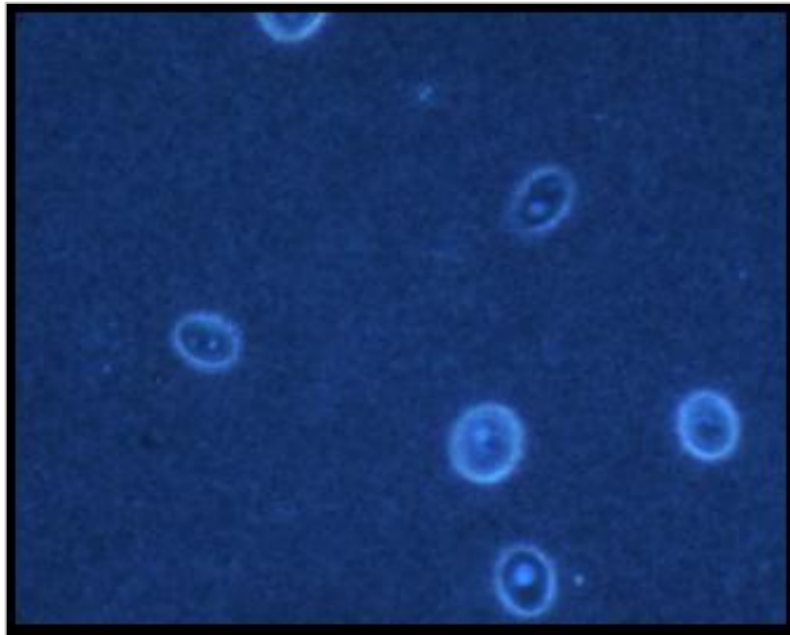


FIGURA 1. Preparação a fresco de leveduras, corada com Nanquim da China e observada em microscópio óptico. Aumento de 1000 X.

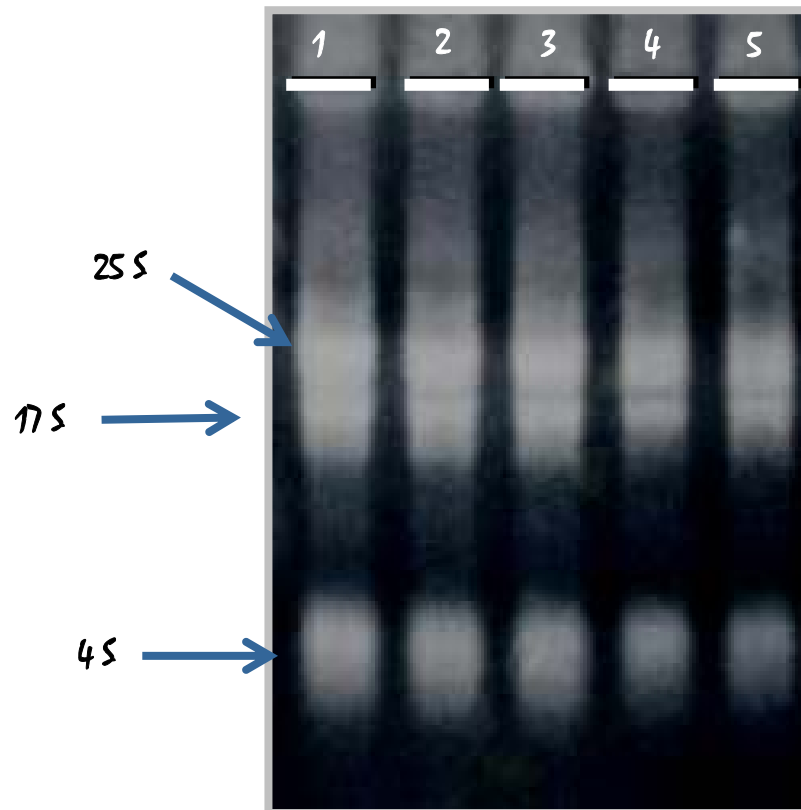
IV.2. Determinação Espectrofotométrica de RNA

Em média, as preparações continham de 50 a 80 µg/mL de RNA total.

IV.3. Eletroforese em Gel de Agarose com Formaldeído para Avaliação da Integridade da Amostra

A análise eletroforética, em gel de agarose em condição denaturante, das preparações de RNA total revelou a presença dos fragmentos com os coeficientes de sedimentação 25S, 17S e 4-5S, característico dos fungos, demonstrando que não houve degradação e sendo assim, considerada apropriada para utilização nos ensaios posteriores. A Figura 2 representa uma das preparações de RNA total de levedura, onde foram aplicadas concentrações decrescentes de amostra em cada raia.

Por sugestão do Prof. Dr. Içor de Almeida do ICB/USP, foi realizado o mesmo procedimento de extração, mas ao invés de utilizar leveduras propagadas em meio de cultura (YDP) foram utilizadas leveduras adquiridas comercialmente (Fermento Biológico Fleischmann). De ambas condições foram obtidas preparações consideradas apropriadas para aplicação em nossos procedimentos.



*FIGURA 2. Eletroforese da preparação de RNA de levedura em gel de agarose com formaldeído, corado com brometo de etídeo. Aplicação de quantidades decrescentes de amostra de RNA total de levedura extraído pelo método que emprega Isotiocianato de Guanidina, Fenol e Clorofórmio (CHOMCZYSKI & SACCHI, 1987), na *saia* 1: 16 μ g; *saia* 2: 12 μ g; *saia* 3: 8 μ g; *saia* 4: 6 μ g e *saia* 5: 4 μ g.*

IV.4. Isolamento de RNA Poli (A+) por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Oligo dT-Celulose

O perfil cromatográfico apresentado na Figura 3 representa um dos muitos isolamentos executados. Em média, o rendimento obtido de RNAm ficou entre 65 - 70 µg/ml por procedimento (~1,75% do total).

Para acelerar o processo de coleta das frações e devido à indisponibilidade de uma bomba peristáltica, foi utilizada uma centrífuga com rotor móvel (EXCELSA BABY II - FANEM). Vários e curtos ciclos de centrifugação foram aplicados, onde o ângulo (180 °) formado favoreceu deslocamento do fluxo por toda extensão da coluna.

As frações contendo as populações de RNA Poli (A⁺) e Poli (A⁻) foram utilizadas nos ensaios de ELISA com quimiluminescência para determinar qual (ou quais) população (ões) é (são) alvo (s) dos anticorpos presentes no soro de pacientes portadores de LES.

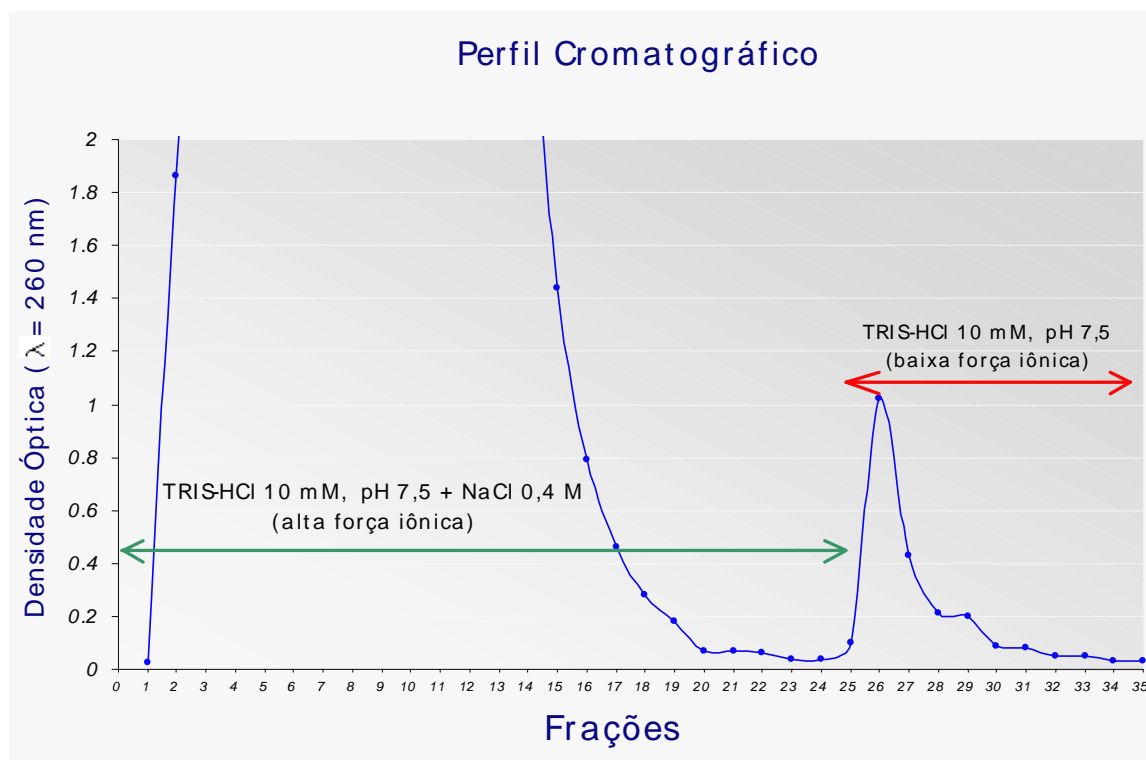


FIGURA 3. Perfil cromatográfico das frações obtido por leituras no comprimento de onda de 260 nm.

IV.5. Detecção de Anticorpos Anti-RNA de Levedura pelo Método de ELISA Quimiluminiscente

IV.5.1. Avaliação do Efeito da Hidrólise Alcalina com KOH 1N sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES

Assim como obtido no estudo realizado por CHEDIACK et al. (1997), foi verificado que o tratamento com KOH 1N aboliu o reconhecimento do RNA total pelos anticorpos presentes no soro de indivíduos portadores de LES. Neste ensaio foram utilizados para detecção de anticorpos soros de 05 pacientes com LES e 02 "pools" de soros de pacientes com LES, colhidos em períodos diferentes; a diluição das amostras de soros foi 1:1600. A Tabela 4 e a Figura 4 resumem os resultados obtidos.

TABELA 4. Avaliação do efeito da hidrólise alcalina com KOH 1N sobre o reconhecimento dos anticorpos presentes no soro de indivíduos com LES.

| <i>Paciente</i> | <i>RNA total, sem tratamento</i> | <i>RNA total, tratado com KOH 1N</i> |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>L.E.C.</i> | <i>8838^e</i> | <i>518</i> |
| <i>M.A.A.P.</i> | <i>3136</i> | <i>0</i> |
| <i>M.D.C.</i> | <i>2205</i> | <i>0</i> |
| <i>M.A.M.N.</i> | <i>3840</i> | <i>248</i> |
| <i>Pool LES + 1</i> | <i>2567</i> | <i>224</i> |
| <i>Pool LES + 2</i> | <i>3042</i> | <i>0</i> |
| <i>A.O.L.G.</i> | <i>5835</i> | <i>280</i> |

^eTítulo expresso em Unidade Relativa de Luminescência (URL)

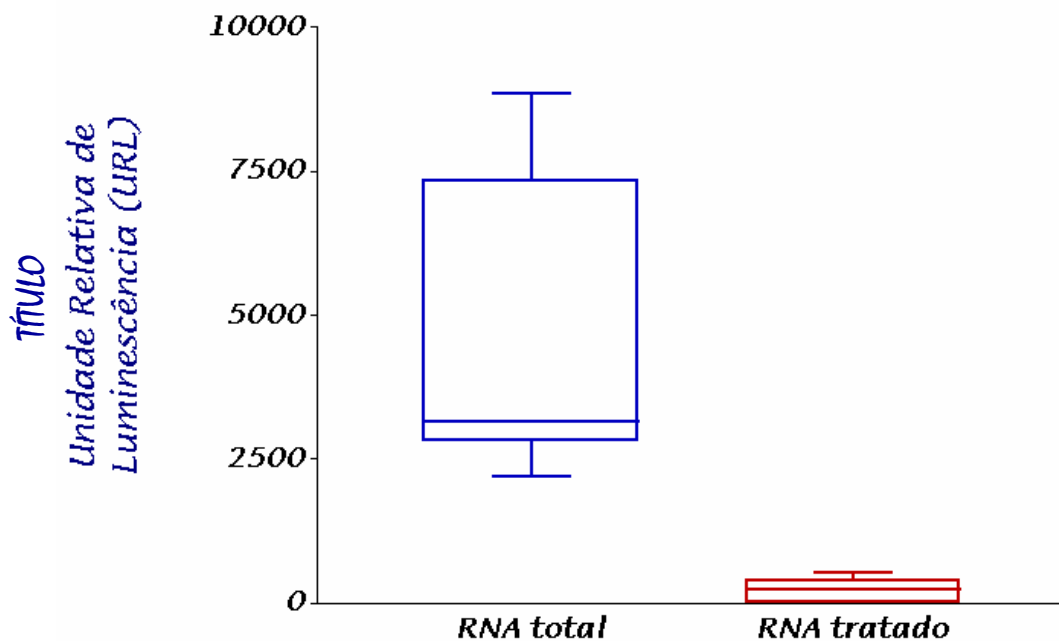


Figura 4. Efeito da hidrólise alcalina sobre o reconhecimento de anticorpos presentes no soro de pacientes com LES. Título em URL, $p=0,0078$.

IV.5.2. Avaliação do Efeito do Fracionamento do RNA de Levedura em Coluna de Oligo dT-Celulose sobre o Reconhecimento dos Anticorpos Presentes no Soro de Portadores com LES

No total, foram analisados 13 pacientes, 2 indivíduos saudáveis como controles negativos e 2 pools de soros de 2 remessas diferentes de soros coletados em 1997 e 2000 (Figura 5). Foi utilizado como "coat" da placa 1 μ g de RNA de levedura por poço, estes, nas seguintes condições: RNA total, RNA Poli (A+) ou RNAm e RNA Poli (A-), todos diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato. No caso do RNA Poli (A-), o limite de detecção do aparelho foi ultrapassado (leituras >3), sendo necessário uma diluição prévia da fração, como descrito em Materiais & Métodos, item III.6., sendo possível determinar a concentração da fração.

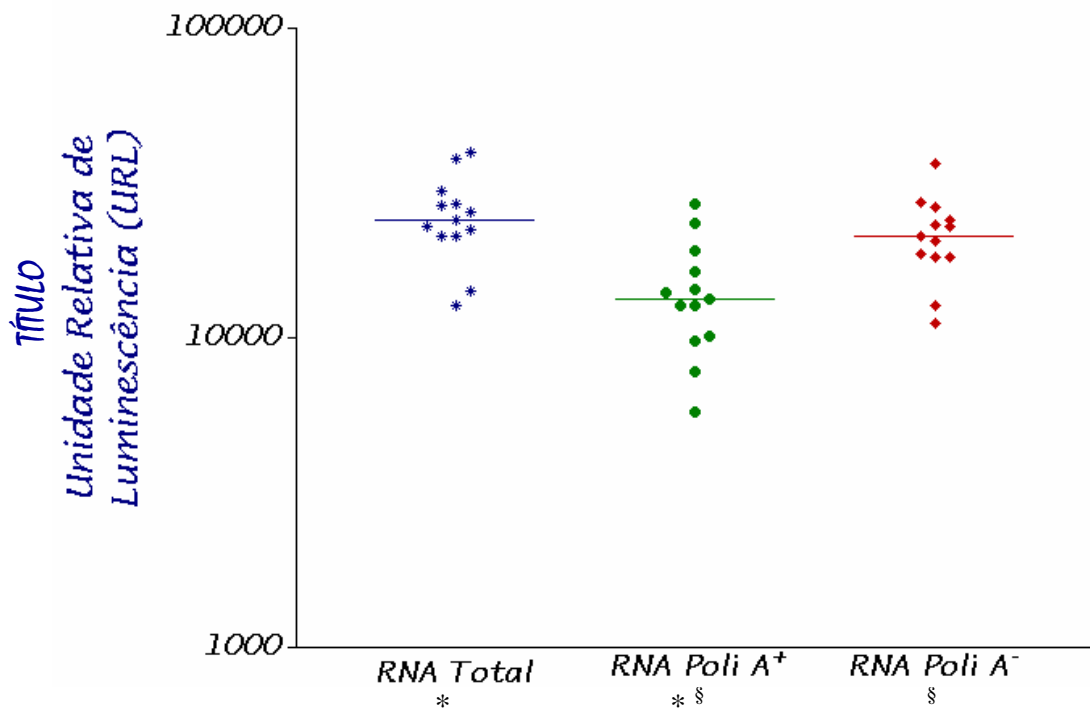


FIGURA 5. Avaliação do efeito do fracionamento do RNA de levedura em coluna de oligo dT-Celulose sobre o reconhecimento dos anticorpos presentes no soro de portadores com LES. Título expresso em Unidade Relativa de Luminescência (URL); barras horizontais: mediana; * $p < 0,001$; § $p = 0,10$.

IV.6. Reação de Imunodeteção com Soro de Pacientes Portadores de LES

Várias tentativas, sem êxito, foram realizadas com intuito de transferir o RNA do gel de agarose para um suporte sólido (membrana de Nylon) e obter um reconhecimento deste com os soros de pacientes. Optou-se, então, utilizar o mesmo método, proposto por LAEMMLI (1970), aplicado à separação de proteínas, com algumas modificações. O objetivo deste procedimento foi de estabelecer qual fração do RNA de levedura era reconhecida pelos anticorpos presentes no soro dos pacientes portadores de LES. No entanto, a malha estabelecida pela acrilamida e bis-acrilamida, após a polimerização, possibilita a separação de moléculas que se diferem em apenas alguns resíduos (no caso de proteínas) ou bases (ácidos nucleicos). Devido a este fato, os géis de poliacrilamida apresentam um número maior de bandas (Figura 6D), diferentemente do gel de agarose onde apresenta apenas 3 (Figura 2).

Para verificar RNA de alto peso molecular foi utilizado um gel a 4%, corado com prata (Figura 6A) e a sua réplica foi transferida para uma membrana de Nylon, que foi recortada em tiras e uma delas foi colocada para reagir com um "pool" de soros de pacientes com LES (Figura 6B) e a outra com um "pool" de soros de indivíduos normais (Figura 6C). A presença de bandas indica que houve reconhecimento do RNA imobilizado na membrana com anticorpos presentes no "pool" de soros utilizado (setas).

Para detecção de RNA de baixo peso molecular foi empregado um gel a 16%, corado com Nitrato de Prata (Figura 6D) e com sua réplica foi realizado um eletro-transferência para uma membrana de Nylon, esta foi recortada em tiras, onde uma delas foi exposta a um "pool" de soros de pacientes com LES (Figura 6E) e uma outra foi incubada com um "pool" de soros de indivíduos normais (Figura 6E). Neste caso, a presença de bandas no local de aplicação da amostra, indicou que a porção antigênica do RNA de levedura não chegou a entrar no gel de empilhamento (setas).

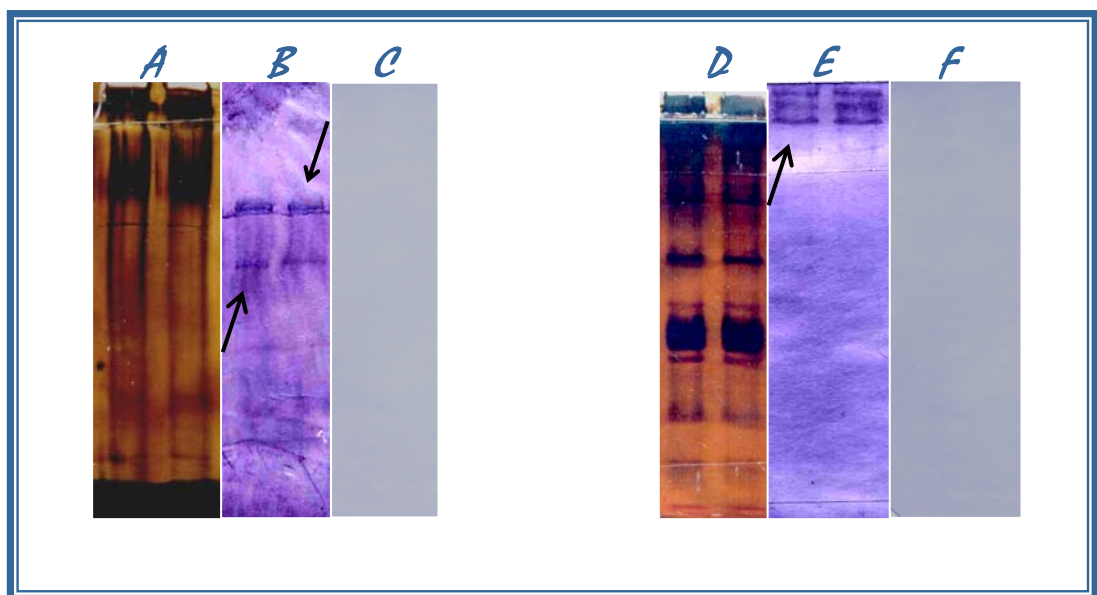


FIGURA 6. Gel de poliacrilamida a 4% (A) e 16% (D), corados com nitrato de prata e imunodeteção utilizando "pools" de soros de pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (B e E) e de soros de indivíduos normais (C e F). Cada gel corado com Nitrato de Prata continha, em cada raia, aproximadamente 65 µg de amostra de RNA total de levedura. Os géis que foram submetidos à eletro-transferência seriam submetidos à transferência foi aplicado 100 µg por raia.

V. DISCUSSÃO

Como podemos observar na Figura 5, ambas frações de RNA foram reconhecidas pelos anticorpos de indivíduos portadores de LES. Há poucos relatos na literatura mencionando a respeito de reconhecimento de RNAm por auto-anticorpos. Isso se deve principalmente pela labilidade da molécula, no entanto, LIPES & KEENE (2002) demonstraram, utilizando RNAm extraído de células HeLa, que, apesar da baixa abundância e instabilidade da molécula, ela é capaz de reagir com auto-anticorpos gerados durante uma resposta auto-imune. Os autores sugerem que possa haver um mimetismo estrutural entre um auto-antígeno protéico e uma molécula de RNA envolvido na geração de auto-epitopos no RNA, possivelmente uma proteína antigênica é o imunógeno original e a reatividade anti-RNA resulta da reatividade cruzada devido ao mimetismo estrutural.

Em relação à população de RNA Poli (A), que compreende tanto os RNAs ribossômicos (RNAr) como RNAs transportadores (RNAt), existem alguns trabalhos relatando o reconhecimento desta por auto-anticorpos. SRIWIDADA et al. (1996) verificou, que apenas 1 soro de um paciente com Síndrome de Sjögren, dentre 168 amostras analisadas, foi capaz de precipitar um RNAt desproteínado e iniciador de metionina de células HeLa e de levedura, mas não de cloroplastos de feijão ou *E. coli*. Ao compararem a sequência e a estrutura secundária do RNAt^{met} humano com a estrutura do RNAt de levedura, eles observaram em ambos, a região de reconhecimento do anticorpo possuíam as mesmas bases e a mesma conformação.

Os RNAr também são alvos de auto-anticorpos, SATO et al. (1994), sintetizaram, *in vitro*, 6 fragmentos de RNA que cobriam o domínio GTPase do RNAr 28 S e, em seguida, os protegeram da ação de ribonucleases e utilizou como antígeno. Verificaram que este domínio era alvo de auto-anticorpos em 77% dos pacientes com LES.

A importância de se investigar a presença de anticorpos anti-RNA de levedura em indivíduos com alguma disfunção auto-imune se deve ao fato de muitos constituintes da levedura estarem presentes também em na espécie humana, compartilhando muitas vezes, propriedades antigênicas. Como é o caso de uma proteína de 32 kDa. de *S. cerevisiae* que exibe similaridade de sequência na região N-terminal do auto-antígeno La, que se liga preferencialmente ao RNA *in vitro* (LIN-MARK & CLARKSON, 1995). Outro exemplo é a proteína hPrp18 que possui 30% de identidade com um fator de "splicing" de levedura (Prp18) (HOROWITZ & KRAINER, 1997).

Espera-se que os achados desse estudo possam contribuir, de alguma forma, para a elucidação dos mecanismos de auto-imunidade.

V. CONCLUSÕES

1. A preparação de RNA de levedura, tanto de células propagadas em laboratório como as adquiridas comercialmente, exibiu, por análise eletroforética, as frações 25 S, 17 S e 45 S. Em relação à análise espectrofotométrica, só foram consideradas adequadas para os procedimentos aquelas preparações que estivessem dentro das exigências estabelecidas na literatura (razões entre as leituras);
2. Assim como Chediack et al., 1998 haviam demonstrado, o método de detecção de anticorpos anti-RNA de levedura utilizado foi sensível e mostrou-se bastante reprodutível;
3. De acordo com os resultados, todas as frações de RNA de levedura são reconhecidas por anticorpos presentes no soro desta amostra de pacientes portadores de LES;
4. O método de "immunoblotting" elaborado demonstrou ser bastante específico e sensível, embora algumas condições poderiam ser testadas para refinar a resolução do ensaio de detecção.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; DOBER, J.S. Imunologia celular e molecular. 4.ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2003.
- ARBUCKLE, M.; McCLAIN, M.T., RUPERTONE, M.V.; SCOFIELD, R.H.; DENNIS, G.J.; JUDITH, A.; HARLEY, J.B. Development of auto antibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med., Waltham, v.349, n.16, p.1526-1533, 2003.
- BLANCO, F.; KALSI, J.; ISENBERG, D.A. Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases. Clin. Exp. Immunol., Oxford, v.8, p.66-70, 1991.
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2000.
- CHEDIAK, L.; ALMEIDA, I.C.; PASSOS, G.A.S.; CARVALHO, I.F. Application of a chemiluminescent immunoassay technique to the determination of circulating anti-yeast RNA antibodies in systemic lupus erythematosus. Biomed. Chromatogr. London, v.13, p.193-194, 1999.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., San Diego, v.162, p.156-159, 1987.
- D'CRUZ, D. Testing for autoimmunity in humans. Toxicol Let., v. 127, p.93-100, 2002.
- EGNER, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J. Clin. Patol., London, v.53, n.6, p. 424-432, 2000.
- EILAT, D.; ANDERSON, W.F. Structure-Function correlates of autoantibodies to nucleic acids. Lessons from immunochemical, genetic and structural studies. Mol. Immunol., v. 31 (18), p. 1377-1390, 1994.
- GORDON, C.; SALMON, M. Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis. Clin.Med., v.1, n°1, p.10-14, 2001.
- HERRMANN, M.; VOLL, R.E.; KALDEN, J.R. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Imm. Today, v. 21(9), p.424-426, 2000.

HIROKAWA, K.; TAKASAKI, Y.; TAKEUCHI, K.; KANEDA, K.; IKEDA, K.; HASHIMOTO, H. Anti-TS1-RNA: Characterization of novel antibodies against sequence-specific RNA by random RNA selection in patients with Sjögren's syndrome. J.Rheumatol., v. 29, 931-937, 2002.

HOROWITS, D.S.; KRAINER, A.R. A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing in functionally related to a yeast splicing factor. Genes and Dev., Woodbury, v.11, p.139-151, 1997.

ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol., Washington, v.153, p.163-168, 1983.

JOYCE, G. The antiquity of RNA-based evolution. Nature, London, v.418, p.214-221, 2002.

KITAMURA, T.; TAMDA, Y.; TAKAMA, H.; YOKOCHI, K.; NITTA, Y.; IKEYA, T. Diagnostic approach to autoimmune blistering diseases using immunoblotting with chemiluminescence. J. Dermatol., Tokyo, v.21, n.9, p.652-654, 1994.

LIM, Y.; LEE, D.-Y.; LEE, S.; PARK, S.-Y.; KIM, J.; CHO, B.; LEE, H.; KIM, H.-Y.; LEE, E.; SONG, Y.W.; JEDUNG, D.-I. Identification of auto antibodies associated with systemic lupus erythematosus. Biochem. Biophys. Res. Comm., New York, v.295, p.119-124, 2002.

LIN-MARK, N.; CLARKSON, S.G. A yeast RNA binding protein that resembles the human autoantigen La. J. Mol. Biol., Oxford, 245: 81-85, 1995.

LIPES, B.D.; KEENE, J.D. Autoimmune epitopes in messenger RNA. RNA, Cleveland, v.8, p. 762-771, 2002.

MADDISON, P.J. Is it SLE? Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., Eastbourne, v.16, n.2, p.167-180, 2002.

MELI, M.; BENJAMIN, A.-F.; MAUREL, M.-C. Recent findings in the modern RNA word. Int. Microbiol., Barcelona, v.4, p.5-11, 2001.

MOK, C.C.; LAU, C.S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J. Clin Pathol, v. 56, p. 481-490, 2003.

NAGPAL, S.; SRIRAMARAO, P.; KRISHNASWAMY, P.R.; METCALFE, D.D.; RAO, P.V. Demonstration of IgE antibodies in patients with LES. Autoimmunity, UK, v.8, p.59-64, 1990.

PENG, S.L.; CRAFT, J. Antinuclear antibodies. In: RUDDY, S.; HARRIS, E.D.; SLEDGE, C.B. (eds.) Kelley's Textbook of Rheumatology. 6. ed. Philadelphia, Saunders, 2001. p. 161-174

PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol., Eastbourne, v.16, n.5, p.847-858, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATO, I.E.; BONFÁ, E.D.; COSTALLAT, L.T.L.; SILVA, N.A.; BRENOL, J.C.T.; SANTIAGO, M.B.; SZAJUBOK, J.C.M.; RACHID FILHO, A.; BARROS, R.T.; VASCONCELOS, M. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Ver. Bras.Reumatol., v. 42 (6), p. 362-370, 2002.

SATO, T.; UCHIUMI, T.; ARAKAWA, M.; KOMINAMI, R. Serological association of lupus autoantibodies to a limited functional domain of 28 S ribosomal RNA and to the ribosomal proteins bound to the domain. Clin. Exp. Immunol., London, v.98, p.35-39, 1994.

SCHUR, H.P.; MONROE, M. Antibodies to ribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.63 p.1108-1112, 1969.

SRI-WIDADA, J.; GRAAFLAND, H.; DIETZ, R., BRUNEL, C., CATHALA, G.; JEANTEUR, P. A human auto-immune antibody specifically recognizing initiator methionine tRNA from yeast and higher eucaryotes. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v.139, n.1, p.275-280, 1986.

STRYER, L. Bioquímica. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1996.

TEODORESCU, M.; FROELICH, C.J. ELISA and Other Immunologic Techniques. In: TEODORESCU, M.; FROELICH, C.J. (Eds.). Advanced Immunoassay in Rheumatology, Boca Raton, CRC Press, 1994. p.20.

WALDPOR, M. J. Complement (second part). N. Engl. Med., Waltham, v.334, n.15, p.1140-1144, 2001.

WANCHU, A. Antinuclear antibodies: clinical applications. J. Postgrad. Med., Mumbai, v.46, p.144-148, 2000.

WATANABE, N.; FISCHER, H.M.; EPSTEIN, W.V. Specificity and reactivity of cytoplasmatic and nucleolar antibody in SLE sera. Arth. Rheum., New York, v.12, p.173-180, 1969.

WUNDER, P.R. Doenças auto-imunes, cap. 35. In: FERREIRA & ÁVILA, ed. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, 2ª ed., p. 414-430, Ed. Motha, São Paulo, 2001.

VII. APÊNDICE

VII.1. Reagentes e Soluções

- Acetato de Sódio 2 mol/L, pH 4,0.
- Agarose 1,5% (p/v).
- Água Milli-Q com DEPC 0,1% (v/v).
- Álcool Etilico 75% (v/v).
- Álcool Isopropílico Resfriado a -20 °C.
- Anticorpo Anti-IgG Humano Conjugado com Biotina.
- Anticorpo Anti-IgG Humano Conjugado com Fosfatase Alcalina.
- Brometo de Etideo 10 mg/ml.
- Cloroformio : Álcool Isoamílico (49:1).
- EDTA 200 mmol/L.
- Fenol Destilado e Saturado em Água, pH 5,0.
- Formaldeído 37%.
- Formamida Deionizada.
- Hipoclorito de Sódio 10%.
- KOH 1 mol/L
- NaCl 0,85%.
- NaOH 0,1 mol/L.
- Oliga (dT) Celulose.
- PBS-T: PBS-Tween 20 0,05% (v/v).
- Peroxidase de Raiz Forte Conjugada com Streptavidina.
- Persulfato de Amônio 10 % (p/v).
- SDS 10% (p/v).
- Solução de Bloqueio da ELISA: PBS-T+Leite Desnatado 5% (p/v).
- Solução de Bloqueio da Imunodeteção: TBS-T+Leite Desnatado 5% (p/v).
- Solução Denaturante: Isotiocianato de Guanidina 4 mol/L; Citrato de Sódio 25 mmol/L; Sarkosyl 0,5%; β -Mercaptoetanol 0,1mol/L.
- Solução Amplificadora de Quimiluminescência (ECL).
- Solução Estoque de Acrilamida : N,N'Methylene Bis-Acrilamida (30 : 0,8).

Anticorpos Anti-RNA de Levedura & LES

- Solução Estoque de TRIS-HCl 2 mol/L, pH 6,8.
- Solução Estoque de TRIS-HCl 2 mol/L, pH 8,8.
- Solução Fixadora: Álcool Etílico 16,6% (v/v); Ácido Acético Glacial 0,66% (v/v).
- Solução de Nitrato de Prata: AgNO₃ 0,2 g/3 mL Água Milli-Q.
- Solução "Loading Dye": Glicerol 50%; Fosfato de Sódio 10 mmol/L, pH 7,0; Azul de Bromofenol 0,25%; Xileno Cianol 0,25%.
- Solução Reveladora: NaOH 2,25% (p/v); após alguns minutos sob agitação, adicionar Formaldeído 37 % 1,5% (w/v).
- Solução Tamponada com Fosfatos (PBS): NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na₂HPO₄ 1,2 g/L ; KH₂PO₄ 0,2 g/L, pH 7,4.
- Solução Salina Tamponada com Tris (TBS): TRIS-HCl 10 mmol/L, pH 8,3; NaCl 150 mmol/L.
- Tampão de Electro-transferência: TRIS-HCl 25 mmol/L, pH 8,3; Glicina 192 mmol/L; Metanol 20%.
- Tampão de Migração para PAGE: TRIS-HCl 25 mmol/L, pH 8,3; Glicina 192 mmol/L; SDS 0,1%.
- Tampão Carbonato-Bicarbonato 50 mmol/L, pH 9,6.
- Tampão de Migração para Eletroforese de RNA: MOPS 0,1 mol/L, pH 7,0; Acetato de Sódio 50 mmol/L; EDTA 5 mmol/L.
- Tampão de Revelação para Fosfatase Alcalina: TRIS 0,1 mol/L; NaCl 0,1 mol/L; MgCl₂ 5 mmol/L; 0,001 % NBT (p/v); 0,0005% (p/v) BCIP.
- TBS-T: TBS-Tween 20 0,05% (v/v)
- TEMED
- TRIS-HCl 100 mmol/L, pH 7,5.
- TRIS-HCl 100 mmol/L, pH 7,5 + NaCl 0,4 mol/L.

VII.2. Meio de Cultura para Leveduras

- YED: Extrato de levedura 10 g/L; Bacto peptona 20 g/L; Dextrose (D-Glucose) 20 g/L

VII.3. Método de Preparo das Principais Soluções e Tampões Utilizados

VII.3.1. Meio de Cultura YED (extrato de levedura, peptona e dextrose)

| | |
|----------------------|---------------|
| Extrato de levedura | 5,0 g |
| Bacto peptona | 10,0 g |
| Dextrase (D-Glucose) | 10,0 g |
| Água Milli-Q | q.s.p. 500 ml |
| Autoclavar | |

VII.3.2. Água Milli-Q Tratada com DEPC 0,1%

| | |
|---|---------------|
| Diethylpirocarbonato | 0,1 ml |
| Água Milli-Q | q.s.p. 100 ml |
| Manter a 37 °C por 12 horas e autoclavar. | |

VII.3.3. Solução Denaturante (500 mL)

| | |
|-------------------------------|---------|
| Isotiocianato de Guanidina 4M | 23,63 g |
| Citrato de Sódio 25 mM | 0,37 g |
| Sarkosil 0,5% | 0,25 g |
| β -Mercaptoetanol 0,1M | 1,12 g |

VII.3.4. Fenol Destilado e Saturado em Água, pH 5,0

Liquefazer, em banho-maria a 65°C, 100 mL de fenol destilado. Em seguida, adicionar 100 mg de hidroxiquinolina e adicionar igual volume de água, agitar vigorosamente em agitador magnético por 15 minutos e aguardar a separação das fases. Aspirar o máximo de volume possível da camada superior utilizando uma pipeta de vidro. Repetir o procedimento por 2 vezes, após a 4ª homogeneização acondicionar a mistura em frasco âmbar a 4°C sob abrigo da luz.

VII.3.5. Clorofórmio + Alcool Isomilico (49:1)

Anticorpos Anti-RNA de Levedura & LES

| | |
|--------------------------|--------------|
| <i>Clorofórmio</i> | <i>49 ml</i> |
| <i>Álcool Isoamílico</i> | <i>1 ml</i> |

VII.3.6. Acetato de Sódio 2M, pH 4,0

| | |
|--|-----------------------|
| <i>Acetato de Sódio</i> | <i>13,6 g</i> |
| <i>Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1%</i> | <i>q.s.p. 1000 ml</i> |

VII.3.7. Etanol 75%

| | |
|--|----------------------|
| <i>Etanol Absoluta</i> | <i>75 ml</i> |
| <i>Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1%</i> | <i>q.s.p. 100 ml</i> |

VII.3.8. Solução Salina

| | |
|--|----------------------|
| <i>NaCl</i> | <i>0,85 g</i> |
| <i>Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1%</i> | <i>q.s.p. 100 ml</i> |

VII.3.9. Solução Neutralizante

| | |
|--|-----------------------|
| <i>NaOH (0,5 M)</i> | <i>20 g</i> |
| <i>Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1%</i> | <i>q.s.p. 1000 ml</i> |

VII.3.10. Tampão de Migração (5X)

| | |
|--|-----------------------|
| <i>MOPS</i> | <i>20,6 g</i> |
| <i>Acetato de Sódio</i> | <i>3,9 g</i> |
| <i>EDTA</i> | <i>0,5 g</i> |
| <i>Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1%</i> | <i>q.s.p. 1000 ml</i> |
| <i>Ajustar pH 8,0</i> | |

VII.3.11. Gel de Agarose 1,5 % (110 mL)

| | |
|---------------------------------|-------|
| Formaldeida 37% | 20 mL |
| Tampão MOPS SX | 20 mL |
| Agarose fundida em Água Milli-Q | 70 mL |

VII.3.12. PBS 10X (Solução Tampoadada com Fosfatos)

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| NaCl | 80,0 g |
| KCl | 2,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 g |
| Água Milli-Q, tratada com DEPC 0,1% | q.s.p. 1000 mL |
| Ajustar pH 7,4 | |

VII.3.12. Componentes dos Géis de Separação e Empilhamento

TRIS HCl 2M, pH 8,8
TRIS HCl 2M, pH 6,8
EDTA 200 mM
ACRIL - BIS (30:0,8)
TEMED
Persulfato de Amônio 10%

VII.3.13. Tampão de Electro-Transferência

| | |
|-------------------------------|--------|
| 25mM TRIS HCl, pH 8,3 | 1,95 g |
| 192mM de Glicina | 9,35 g |
| Dissolver em H ₂ O | 500ml |
| Checar o pH | |
| Metanol 20% | 130 mL |
| Completar volume para | 650 mL |

VII.3.14. Tampão AP

| | |
|------------------------|--------------------------------|
| 0,1 M TRIS | 3,03 g |
| 0,1 M NaCl | 1,46 g |
| 5 mM MgCl ₂ | 2,5 mL de Solução Estoque a 1M |
| H ₂ O | 250 mL |
| Ajustar pH= 9,5 | |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)