JULIANA MATTOS DE ALMEIDA BESSA

**Determinação de alvos antigênicos
na doença reumática cardíaca
utilizando *phage display***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia Clínica e Alergia
Orientadora: Prof. Dra. Luiza Guilherme Guglielmi

São Paulo

2005

AGRADECIMENTOS

...De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre recomeçando; a certeza de que precisamos continuar; a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Portanto, devemos fazer: da interrupção, um caminho novo; da queda, um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte; da procura, um encontro...

(Fernando Pessoa)

À Dra. Luiza Guilherme Guglielmi, minha orientadora. Obrigada pela confiança que depositou em mim. Com você aprendi muito. Não apenas Imunologia, Febre Reumática e cultura celular. A vejo como um exemplo de perseverança e admiro o amor e entusiasmo que tem pelo seu projeto e linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil. Obrigada por TODAS as oportunidades. Do princípio ao fim. Desde o momento em que cheguei à São Paulo em 2002, meio perdida, mas determinada a iniciar uma pós-graduação e ingressar no mundo da pesquisa, até o dia de hoje, pela chance de finalizar uma etapa importante de minha vida com esta Dissertação de Mestrado, a qual será imprescindível para meu futuro profissional. É um orgulho ter seus conhecimentos, experiência e sabedoria fazendo parte de minha formação. Serei eternamente grata ao senhor!

Ao Dr. Ricardo Giordano. Por toda confiança e amizade durante os 2 anos em que trabalhamos juntos. Com você aprendi não somente os princípios do *Phage Display*, mas seguramente seus conselhos e ensinamentos contribuíram muito para meu crescimento profissional e científico.

À Dra. Anna Carla Goldberg, por participar diretamente de minha tese, me avaliando desde a entrevista para o ingresso na pós-graduação até o exame de Qualificação. Suas sugestões e visão crítica sem dúvida me ajudaram muito.

Ao Dr. Edécio Cunha Neto, que mesmo com todas tarefas do dia-a-dia, esteve sempre aberto para discussões e sugestões.

À Dra. Verônica Coelho, sua leveza e palavras amigas sempre trouxeram conforto.

À Dra. Renata Pasqualini e ao Dr. Wadih Arap, por ceder as bibliotecas de *Phage Display*, possibilitando a realização deste trabalho.

À Tânia Joicy Mota, com toda simpatia e doçura sempre presente e prestativa.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Basheshi, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FMUSP, pela decisão de aceitar a transferência do meu programa de Doutorado para Mestrado.

Ao Prof. Dr. Rizzo, Dr. Fabio Castro e todos os membros da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, pelo apoio científico e oportunidade de crescimento através dos retiros anuais do departamento.

À FAPESP, cujo apoio financeiro possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À querida amiga Georgia Porto, que praticamente desde o princípio esteve ao meu lado. Crescemos juntas. A pessoa com quem pude discutir todos os assuntos: “phage”, imunologia e assuntos da vida.

À Beatriz Stolf, que embora tenha se juntado mais tarde ao grupo do “phage” e ao Laboratório, em pouco tempo revelou seu lado amigo e generoso.

À Dra. Kellen Faé, que nos momentos de ausência da minha orientadora, sempre se mostrou muito acessível e prestativa. Toda sua ajuda e orientação foram muito importantes para mim. A admiro muito!

À Rose, pela amizade e companheirismo. Com seu jeito único, conseguia me fazer rir nos momentos de dificuldade em que me punha a chorar.

À Selma Alioti, pela amizade e sinceridade das palavras. Da maneira (por muitas vezes dura) que sempre me aconselhou e me apoiou.

À Sandra Emiko, por toda ajuda na cultura celular. Desde os princípios básicos quando ingressei no Laboratório até os experimentos finais. Muito obrigada mesmo!

À Andrea V Freitas, que sempre se empenhou para a finalização de impressões de relatórios e da tese.

Ao grupo de Vacina contra Febre Reumática, Flávio Alcântara, Letícia, Samar, Edil, Fabinho, Iolanda, Raquel, Cláudio, Washington, Simoninha, por toda atenção e ajuda. Foi um prazer fazer parte da sua equipe de trabalho!

À Cristina Caldas e Simone Fonseca, de um jeito amigo, sempre dispostas a ajudar e a dividir o conhecimento em imunologia.

Ao Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz, do Departamento de Cardiopneumologia, pelo investimento no projeto de pesquisa da Febre Reumática.

Aos meus irmãos, Marcela e Eduardo, por todo amor, mesmo por muitas vezes demonstrado de uma maneira difícil e complicada de entender. E mais recentemente, ao meu pequeno Murilo, por encher de alegria a vida de toda nossa família.

Aos meus tios-padrinhos Ronuel e Marili, por todo apoio e confiança. O amor e carinho recebido em casa por vocês durante este período foi essencial para eu superar os momentos difíceis e seguir acreditando.

Ao amigo Rogério Patah, por sempre me incentivar e contribuir com meu desenvolvimento e amadurecimento pessoal.

Aos meus pais, Élida e Totonho, não há palavras que possam exprimir a gratidão, pelo apoio, confiança e amor incondicional que sempre tive de vocês a qualquer momento e em qualquer situação. Vocês são a fonte de amor e esperança que necessito diariamente para seguir lutando.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular a todos os membros do Laboratório de Imunologia do InCor, agradeço de coração!

À Deus, pela vida!

Sumário

	página
1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Manifestações clínicas	3
1.3 Histopatologia	4
1.4 A febre reumática e o <i>S. pyogenes</i>	6
1.5 O agente etiológico: <i>Streptococcus pyogenes</i>	7
1.6 Marcadores genéticos de susceptibilidade à febre reumática ...	10
1.7 A resposta imune e auto-imunidade na FR	12
1.8 Reconhecimento antigênico por linfócitos T	15
1.9 Utilização do <i>Phage Display</i> na identificação de epitopos reconhecidos por linfócitosT	18
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. Pacientes e Material de trabalho	20
3.1 Pacientes	20
3.2 Material	20
3.2.1 Determinação dos antígenos HLA-DR e DQ	20
3.2.2 Fragmentos do tecido cardíaco para obtenção das linhagens e clones de linfócitos T intralesionais	23
3.2.3 Obtenção das linhagens de linfócitos T infiltrantes no tecido valvular	23
3.2.4 Obtenção de clones de linfócitos T intralesionais	24
3.2.5 Caracterização fenotípica das linhagens de linfócitos T ...	24
3.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)	25
4. Métodos Empregados	26
4.1. Caracterização das subpopulações linfocitárias componentes das linhagens Lu 3.1. e Lu 10.1 através da identificação do receptor da célula T (RCT)	26
4.1.1 Extração de RNA	26
4.1.2 Quantificação do RNA	27
4.1.3 Transcrição reversa	27
4.1.4 Reação de PCR para determinação das famílias J β do RCT (V β -J β)	28
4.1.5 Síntese de peptídeos de diferentes isoformas da miosina cardíaca	29
4.2 Congelamento e descongelamento das linhagens intralesionais Lu 10.1 e Lu 3.1 e clone Lu 3.1.17.	30
4.3 “ <i>Phage Display</i> ”	31
4.3.1 Biblioteca de peptídeos de “ <i>Phage Display</i> ”	31
4.3.2 <i>Phage Display</i> , empregando a metodologia BRASIL	32
4.3.3 Cultura e infecção bacteriana	33

4.3.4 Seleção dos clones de fagos (colônias bacterianas)	35
4.3.5 PCR para amplificação do DNA dos clones de fagos selecionados	35
4.3.6 Sequenciamento dos fagos	36
4.3.7 Preparo do gel de sequenciamento	36
4.3.8 Identificação do DNA inserido na pIII dos fagos e tradução para peptídeo	37
4.3.9 Análise dos peptídeos selecionados em banco de dados	38
4.3.10 Preparação em larga escala dos fagos	40
4.4 Ensaios de validação biológica para fagos com homologia com proteínas cardíacas e proteína M do estreptococo e ligante do receptor da IL-1	41
4.4.1 Ensaio de Proliferação celular antígeno específico	41
4.4.1.1 Obtenção de células apresentadoras de antígenos (APC)	44
4.4.2 Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	44
5 Resultados.....	46
5.1 Ligantes do receptor da célula T (RCT)	46
5.1.1 Repertório de linfócitos T componentes das linhagens intralesionais Lu 3.1 e Lu 10.1	46
5.1.1.1 Linhagem de linfócitos T intralesional Lu 3.1	46
5.1.1.2 Linhagem de linfócitos T intralesional Lu 10.1	47
5.2 Análise das Seqüências	47
5.2.1 Linhagem intralesional Lu 3.1	49
5.2.2 Clone linfócito T Intralesional Lu 3.1.17	53
5.2.3 Linhagem intralesional Lu 10.1..	58
5.3 Análise comparativa dos fagos ligantes da miosina e da laminina: busca de seqüências compartilhadas	60
5.4 Ligantes de outras moléculas expressas em linfócitos T intralesionais	61
6 Discussão	67
7 Conclusões	77
Referências Bibliográficas	78
Apêndice	89

Abreviaturas

a.a. – aminoácidos

APC – “antigen presenting cells”, células apresentadoras de antígenos

CD49 – VLA1 (“very late antigen”);

CD49c - cadeia $\alpha 3$; CD49f – cadeia $\alpha 6$

CD104 - ITGB4(cadeia $\beta 4$ integrina)

CFU – colony forming unities

CMSP – células mononucleares de sangue periférico

CPH – Complexo Principal de Histocompatibilidade

Cpm – contagem por minuto

CR1 – receptor do complemento do tipo 1 (CD35)

GlcNAc – N-acetil- β D-glucosamina

GNPS – glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica

GRP – “glucose regulated protein”, proteína regulada pela glicose

HSP – “heat shock protein”, proteína de choque térmico

IE – índice de estimulação

IELs – “intraepithelial lymphocytes”, linfócitos intra-epiteliais

IL-1Ra – antagonista do receptor da IL-1

IL-1R1 – receptor tipo 1 da IL-1

IL-1R2 - receptor tipo 2 da IL-1

Kan – kanamicina

LAF – lymphocyte activator factor

LB – Luria Bertani

LMM – “light meromyosin”

MHC – “Major Histocompatibility Complex” (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

pI – ponto isoelétrico

PMF - “peptide mass fingerprint”

RCT – receptor de célula T

R-Fibro – receptor de fibronectina

RMN – ressonância magnética nuclear

PHA – fitohemaglutinina

SGA – Streptococo do grupo A

TB – Terrific Broth

Tet – tetraciclina

TOCSY - TOfal Correlation

Spectroscopy

TU – Transducing unities

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 Prevalência da Doença Reumática Cardíaca	2
Figura 2 Nódulo de Aschoff	5
Figura 3 Reconhecimento do <i>S. pyogenes</i> pelo sistema imune15 ..	9
Figura 4 Representação esquemática da estrutura do <i>S. pyogenes</i>	10
Figura 5 Receptor do linfócito T $\alpha\beta$	16
Figura 6 RCT e Interações Moleculares	17
Figura 7 Esquema das etapas envolvidas na metodologia BRASIL	34
Figura 8 Esquema para identificação do inserto no gene da pIII do fago e tradução para peptídeo	37
Figura 9 Esquema da análise da freqüência de tripeptídeos dentro de um peptídeo de 10 aminoácidos	39
Figura 10 Peptídeos da cadeia pesada da miosina reconhecidos por clones de linfócitos T derivados da linhagem intralesional Lu 3.1	52
Figura 11 Alinhamento do fago clo-a4 com os peptídeos da porção N-terminal da proteína M5, cadeia pesada da miosina cardíaca e fragmentos da proteína M29 e queratina19	57
Figura 12 Ensaio de ligação <i>in vitro</i> do fago masa-45 com IL-1RI	64
Figura 13 Imagem 3D mostrando interação do peptídeo masa-45 com domínios 1 e 2 do IL-1RI	65
Figura 14 RMN mostrando a interação entre peptídeo masa-45 e IL-1RI	66

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 Critérios de Jones	3
Tabela 2 Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes	22
Tabela 3 Caracterização fenotípica das populações linfocitárias	25
Tabela 4 Primers utilizados para amplificação das famílias J β do RCT	29
Tabela 5 Peptídeos da miosina cardíaca com homologia com as sequências dos fagos	30
Tabela 6 Sequências de peptídeos da cadeia pesada da miosina cardíaca humana	43
Tabela 7 Determinação das famílias J β do RCT na linhagem intralesional Lu 10.1	47
Tabela 8 Número de sequências obtidas nos 3 <i>biopannings</i>	48
Tabela 9 Fagos recuperados no biopanning com a linhagem Lu 3.1-SLA com homologia com a miosina cardíaca	49
Tabela 10 Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 3.1-SLA com homologia com a laminina	50
Tabela 11 Fagos recuperados no biopanning com a linhagem Lu 3.1 - SLA com homologia com <i>S. pyogenes</i>	51
Tabela 12 Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com o clone de linfócitos T Lu 3.1.17 com homologia com a miosina cardíaca	54
Tabela 13 Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com o clone de linfócitos T Lu 3.1.17 com homologia com a laminina	55
Tabela 14 Fagos recuperados no biopanning com o clone Lu 3.1.17 com homologia com a proteína M	56
Tabela 15 Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 10.1 com homologia com a miosina cardíaca	58

Tabela 16	Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 10.1 com homologia com a laminina	59
Tabela 17	Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 10.1 com homologia com proteínas estruturais do <i>S. Pyogenes</i>	59
Tabela 18	Análise comparativa dos fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 3.1 com homologia com a miosina cardíaca e laminina	60
Tabela 19	Análise comparativa dos fagos recuperados no <i>biopanning</i> com o clone Lu 3.1.17 com homologia com a miosina cardíaca e laminina	60
Tabela 20	Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 3.1 com homologia com integrina	61
Tabela 21	Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com o clone Lu 3.1.17 com homologia com integrina	62
Tabela 22	Fagos recuperados no <i>biopanning</i> com a linhagem Lu 10.1 com homologia com laminina	62

Bessa J. Determinação de alvos antigênicos na doença reumática cardíaca utilizando *phage display* [tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005

A febre reumática (FR) é o exemplo mais convincente de uma patologia auto-imune pós-infecciosa em humanos, na qual o agente etiológico é bem caracterizado (*Streptococcus pyogenes*), no entanto, os auto-antígenos alvos das lesões cardíacas ainda não são totalmente conhecidos. Pacientes com doença reumática cardíaca (DRC) desenvolvem lesões valvares, mediadas por linfócitos T, predominantemente CD4⁺. O mimetismo molecular, mecanismo pelo qual linfócitos T infiltrantes das lesões cardíacas são capazes de reconhecer tanto proteínas do *Streptococcus pyogenes*, como proteínas cardíacas, foi evidenciado primeiramente por nosso grupo (GUILHERME L et al, 1995). No presente trabalho empregamos uma biblioteca peptídica de *Phage Display* para identificar auto-antígenos cardíacos envolvidos com as reações cruzadas e capazes de serem reconhecidos por duas linhagens intralesionais de linfócitos T e um clone derivado de uma das linhagens de pacientes com DRC. A análise em banco de dados de proteínas das 209 seqüências peptídicas recuperadas nos 3 *biopannings*, mostrou nas 3 populações celulares empregadas, linhagens Lu 3.1 e Lu 10.1 e o clone Lu 3.1.17, 9% , 14% e 18% de homologia com a miosina cardíaca de diferentes isoformas, respectivamente. Entre as isoformas, identificamos seqüências da cadeia pesada da miosina cardíaca alfa e beta, cadeia leve, miosina-like e “myosin binding protein C” que está associada com a contração muscular cardíaca. Além da miosina, outras proteínas com estrutura *coiled-coil* como laminina, vimentina, queratina de cito-esqueleto, colágeno tipo IV foram identificadas.

Seis fagos (7%) recuperados no *biopanning* com o clone de linfócito T Lu 3.1.17, mostraram homologia com a miosina cardíaca e com a proteína M. Estes peptídeos são exemplos de mimotopos capazes de gerar reatividade cruzada pelo processo de mimetismo molecular. Outro fago mostrou homologia com fragmento da proteína M29 (95-100) e queratina 19 (133-138), e adicionalmente estas três seqüências se alinharam ao peptídeo da miosina cardíaca LMM25 (1607-1624) e

proteína M5 (163-177), os quais foram previamente reconhecidos por ensaio de proliferação celular pelo clone de linfócito T Lu 3.1.17. O reconhecimento de múltiplas sequências não idênticas são indicativas da degeneracidade do reconhecimento antigênico pelo receptor da célula T.

Peptídeos homólogos a ligantes do receptor tipo I da IL-1 (IL-1RI) também foram identificados, o que sugere expressão aumentada do receptor IL-1RI em linfócitos T infiltrantes provavelmente em resposta a IL-1 secretada por macrófagos presentes no foco inflamatório. Um exemplo foi o fago masa-45, mimético da molécula do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra), que se ligou especificamente ao IL-1RI.

Em conclusão, este trabalho mostrou novos epitopos de reação cruzada provavelmente envolvidos no processo auto-imune da DRC bem como a participação de moléculas inflamatórias como citocinas, integrinas e fatores de crescimento.

Bessa J. Identification of molecular markers involved in the pathogenesis of rheumatic heart disease by *phage display* [thesis]. University of São Paulo Medical School University of São Paulo; 2005

Although there has been documented decreases in the both the incidence of acute rheumatic fever (RF) and in the prevalence of rheumatic heart disease (RHD) in industrialized countries, RF and RHD are still causes of concern.

In Brazil, children and young adults from low-income families are still affected, and the high cost of health-care and indirect economic consequences of the disease have a detrimental effect on the socio-economic development of the country.

RHD patients develop valvar lesions with T lymphocytes, predominantly CD4⁺ infiltrating into the heart. Molecular mimicry between proteins from *Streptococcus pyogenes* and cardiac proteins recognized by these T lymphocytes has been shown by our group (GUILHERME L et al, 1995) and may explain the auto-aggressive phenotype of these lesions. RF is the most convincing example of molecular mimicry in humans which is able to trigger an autoimmune reaction and furthermore its etiologic agent is well characterized. Despite this, the auto-antigen targets of the cardiac lesions are still not totally known. In the present work we use a "*Peptidic Phage Display Library*" in to identify new cardiac auto-antigens which can be recognized by two heart infiltrate T cell lines and by a T cell clone derived from one of the lines which was isolated from RHD patients. Using the protein data bank BLAST as a tool to analyse the 209 peptides sequences recovered on the 3 biopanning, we observed that many sequences (9% and 14% with the T cell lines Lu 3.1 and Lu 10.1 respectively and 18% with the T cell clone Lu 3.1.17) showed homology to different isoforms of cardiac myosin. These included, the cardiac myosin heavy chain alpha and beta, light chain, myosin-like and myosin binding protein C which is associated with the modulation of cardiac contraction. Other proteins with a *coiled-coil* conformation, such as vimentin, cytoskeletal keratin and also laminin (which had a higher frequency) could be identified by *Phage Display*.

Some phages recovered with the T cell clone Lu 3.1.17 (V β 5J β 2S7 e V α 1J α 32), such as clo-b7, clo-b8, clo-b10, clo-e4, clo-e5 e clo-e6 showed homology with both, cardiac myosin as well as the streptococcal M protein, suggesting that these peptides can represent examples of “mimotopes” which can trigger cross reactivity by a molecular mimicry mechanism. Another phage named as clo-a4, showed homology with a fragment of M29 protein (95-100) and keratin 19 (133-138). Interestingly, these 3 sequences aligned to the light meromyosin peptide LMM25 (1607-1624) and M5 peptide (163-177), both which were previously recognized by the T cell clone Lu 3.1.17.

Using *Phage Display* as a screening tool, we identified peptides showing homology to IL-1RI ligands. This suggests that this receptor is over expressed in the heart infiltrating T lymphocytes in response to IL-1 secreted by macrophages present in the inflammatory lesion. The phage masa-45 mimics a fragment of IL-1Ra and we saw by RMN that it binds specifically to IL-1RI, but not to IL-1RII meaning that such a peptide may have therapeutic applications as an application as anti-inflammatory agent.

In conclusion, this work shows that the identification of auto-antigenic cardiac epitopes involved in RHD is not a trivial process. Considering that the aim is to develop an effective streptococcal vaccine which is able to protect but not injure the heart, further studies addressing the identification of cross-reactive epitopes are need.

1. Introdução

A Febre Reumática (FR) caracteriza-se como seqüela não-suprativa de infecção na orofaringe (faringite), causada pelo estreptococo beta hemolítico do Grupo A ou *Streptococcus pyogenes*, que ocorre em indivíduos susceptíveis e não tratados. As manifestações clínicas compreendem artrite, coréia de Sydenham, cardite reumática, nódulos subcutâneos, eritema marginado. Estas manifestações podem vir associadas ou não. A cardite reumática pode evoluir para a doença reumática cardíaca (DRC), considerada a manifestação mais grave da doença.

A DRC ainda no século 21 é uma importante causa de doença cardiovascular em muitos países do mundo. O esclarecimento dos mecanismos patogênicos da doença que ainda não são completamente conhecidos possibilitará o desenvolvimento de métodos seguros e eficazes para sua prevenção e tratamento.

1.1. Epidemiologia

A epidemiologia da FR reflete à da faringite estreptocócica. A maior incidência é entre os 5 e 15 anos (KAPLAN, 1996; BISNO AL, 1996; SHULMAN ST et al., 2000), sendo raro o surto inicial em menores de 3 anos e maiores de 18 anos. No entanto, as recidivas podem ocorrer em qualquer idade.

Embora indivíduos do sexo feminino apresentem maior propensão em desenvolver coréia de Sydenham e estenose mitral (EBAID M et al., 2000), não existe nenhuma associação da doença em função do gênero masculino ou feminino.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int>), embora a FR e DRC sejam raras em países desenvolvidos, ainda são consideradas como problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, com incidência diretamente ligada a situação sócio-econômica da população.

Dados sobre a prevalência da cardite reumática (FELDMANT T, 1996) (Figura 1), mostra que em países como Irã, Tailândia, Bolívia, Índia, países da África como Argélia, Egito e Marrocos, entre outros, o número de crianças acometidas é superior a 10 por 1.000. Nos EUA, onde apesar do considerável declínio na incidência de FR a partir dos 1950s, (TARANTA A et al., 1959; KAPLAN E, 1996) dados apontam uma deflagração da doença em algumas regiões do país a partir de 1985 (CUNNINGHAM MW, 2000).

O Brasil encontra-se na 12^a posição com prevalência de 6,5/1000 crianças (FELDMAN T, 1996). Cerca de 90% das cirurgias cardíacas infantis realizadas no país, são decorrentes da DRC, representando um alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), na ordem de US\$ 8.000,00 a 10.000,00 para cada cirurgia de troca valvar (SNITCOWSKY R, 1996). Estes custos alcançam o valor de US\$ 51 144 347 devido à invalidez e até morte prematura dos pacientes (TERRERI MT et al., 2001).

Figura 1

Dados publicados por FELDMAN T, 1996.

1.2. Manifestações Clínicas

A FR acomete principalmente o coração, articulações e sistema nervoso central. A Tabela 1 mostra os critérios de Jones, revisados posteriormente por DAJANI AS et al., 1993, os quais são ainda empregados no diagnóstico da doença reumática.

Tabela 1. Critérios de Jones

Manifestações Maiores	Manifestações Menores
Cardite	Febre, caracterizando uma inflamação sistêmica
Poliartrite	Artralgia
Coréia de Sydenham	VHS, ASLO, PCR elevado (atividade inflamatória elevadas)
Eritema <i>marginatum</i>	Intervalo PR prolongado no ecocardiograma
Nódulos Subcutâneos	

VHS: velocidade de hemossedimentação; ASLO: anticorpos anti-estreptolisina O; PCR: proteína C-reativa.

As manifestações clínicas da doença surgem dentro de 1 a 5 semanas, após a infecção pelo estreptococo (STOLLERMAN, 1997). A fase aguda da doença é caracterizada por um quadro de poliartrite migratória das grandes articulações (tornozelos, joelhos, cotovelos e punhos), acompanhada de febre e eventualmente manifestações cutâneas. A artrite é a manifestação clínica mais freqüente, ocorrendo em 66 a 75% dos ataques iniciais de doença reumática aguda (SANYAL, 1974; AGARWAL, 1986; FEINSTEIN, 1993; revisado por NARULA, 1999).

Pode haver manifestações como cardite que ocasionalmente evoluem para insuficiência cardíaca. A cardite pode ser considerada a manifestação clínica mais importante da fase aguda da doença por levar a lesão orgânica grave. A prevalência da cardite na fase aguda da doença é de aproximadamente 30 a 45% e pode acometer o pericárdio, miocárdio e

endocárdio, sendo neste caso denominada pancardite (SANYAL, 1974; FEINSTEIN, 1993; revisado por NARULA, 1999).

Cronicamente, as lesões valvares tendem a progredir, em especial na ocorrência de novos surtos reumáticos agudos. As valvas mais atingidas são a mitral e a aórtica, o envolvimento das valvas tricúspide e pulmonar ocorrem mais raramente.

Além da poliartrite e da cardite, pode ocorrer a coréia de Sydenham, uma síndrome neurológica, caracterizada por movimentos involuntários de pequena amplitude que cessam durante o sono, havendo alterações psíquicas como irritabilidade. O paciente apresenta dificuldade para a realização de movimentos delicados, como por exemplo, a escrita e fraqueza muscular (DÉCOURT, 1972). Nódulos subcutâneos e eritema marginado aparecem raramente. A coréia pode ocorrer na forma “pura” ou em associação com a cardite (DÉCOURT, 1972). Recentemente, observou-se que pacientes portadores de cardite leve (65%) apresentavam concomitantemente coréia enquanto que esta raramente estava associada com a presença de cardite grave (5%) (GUILHERME, et al. 2001a).

1.3. Histopatologia

A FR é caracterizada por lesões inflamatórias no tecido afetado. No coração, a alteração patognomônica é o nódulo de Aschoff (Figura 2) que evolui em três fases: (1) a exudativa, (2) a proliferativa e a (3) cicatricial. A fase exudativa dura de duas a três semanas e é mediada por células mononucleares e polimorfonucleares (EBAID M et al., 2000). Citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e $TNF\alpha$ são secretadas (FRASER WJ et al., 1997).

Figura 2. Nódulo de Aschoff – células grandes, alongadas, com núcleos grandes e algumas vezes multinucleadas. Imagem obtida no Instituto do Coração, Lab. Anatomia Patológica. Fragmento de válvula mitral; coloração HE (Hematoxilina-Eosina); aumento de 400 X. Setas apontam para o aglomerado de células de Aschoff.

A fase proliferativa pode durar meses e é constituída por monócitos, macrófagos e linfócitos, predominantemente $CD4^{+}$ e pelas células de Anitschkow e Aschoff. Nesta fase, além das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e $TNF\alpha$ secretadas pelos macrófagos há também a produção de IL-2 por linfócitos ativados (FRASER WJ et al., 1997). Posteriormente, na fase cicatricial do processo reumático agudo, as lesões são caracterizadas por fibrose e hialinização do nódulo de Aschoff.

A valvulite aguda é caracterizada pela presença de vegetações, degeneração fibrinóide ou necrose, edema e leucócitos polimorfonucleares e mononucleares como monócitos e linfócitos T, predominantemente $CD4^{+}$. Este infiltrado mononuclear também é característico do processo crônico, onde as valvas encontram-se retraídas, espessadas e deformadas, apresentando calcificação e fusão das comissuras. As cordas também podem apresentar-se encurtadas, espessadas e fundidas. As disfunções valvares e subvalvares geradas pelas deformidades definitivas do processo cicatricial são características das cardiomiopatias reumáticas crônicas.

Mais recentemente, nosso grupo demonstrou por imunohistoquímica que células mononucleares infiltrantes tanto no tecido valvular como no miocárdio eram capazes de secretar predominantemente $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ (Th1). Células secretoras de citocinas reguladoras IL-10 e IL-4 (Th2)

também foram detectadas em mais de 75 % das amostras de miocárdio. Diferentemente, em amostras de tecido valvular, raras células produtoras de IL-4 foram encontradas em 75% das amostras estudadas, porém o padrão para a IL-10 foi o mesmo observado no miocárdio. Estes dados sugerem que apesar da presença de células do tipo Th2 no tecido, os efeitos reguladores da IL-10 não são suficientes para reverter os efeitos inflamatórios e agressivos do IFN γ e TNF α , o que provavelmente favorece a progressão das lesões valvares. Este perfil de citocinas manteve-se constante tanto para amostras provenientes de pacientes em fase aguda ou crônica da doença. (GUILHERME et al., 2004).

1.4. A febre reumática e o *S. pyogenes* ou estreptococo beta hemolítico do grupo A

Como descrito acima, a FR está associada com uma infecção previa no trato respiratório superior (orofaringe) pelo *S. pyogenes* ou estreptococo beta hemolítico do grupo A.

Em 1941, REBECCA LANCEFIELD classificou sorologicamente, os estreptococos com base nos antígenos de origem polissacarídica presentes na parede celular (grupos A, B, C, F e G). O estreptococo do grupo A é o único relacionado com a etiopatogênese da FR e DRC.

O *S. pyogenes* é caracterizado em diversos sorotipos em função da proteína M, antígeno imunodominante presente da parede celular. (LANCEFIELD RC, 1962). Segundo, relatório da Organização Mundial da Saúde (2001) até os dias atuais já foram identificados mais de 130 sorotipos (cepas) diferentes de proteína M, dos quais muitos são capazes de causar faringite, no entanto apenas um número restrito de cepas ocasiona FR e por isso são denominadas “reumatogênicas”. Entre estas podemos citar as cepas M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19 e M24. (STOLLERMAN GH, 1997). Existem diferentes cepas de estreptococos capazes de colonizar a pele e estas cepas causadoras de infecções cutâneas como piodermite / impetigo, celulites, erisipela, fascitis necrotizantes não são capazes de causar FR, mas sim a glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica (GNPS), cuja

incidência é menor que a FR nos diversos países. Os sorotipos M2, 49, 57, 59, 60 e 61 estão associados com piodermite e glomerulonefrite aguda (NARULA J et al., 1999; DALE JB, 2000).

Nos Estados Unidos, os sorotipos M1, M3 e M8 são os mais freqüentemente encontrados nos episódios de infecções estreptocócicas invasivas. Na Tailândia, onde um grande número de crianças são portadoras de FR, apenas 20% dos estreptococos responsáveis pelas infecções orofaríngeas são sorotipados. Na Austrália, os soros convencionais não foram capazes de identificar números elevados de episódios de estreptococcia, sugerindo que existem outras cepas virulentas além das já identificadas (FISCHETTI V, 1991). No Brasil, até o momento há pouca informação sobre a prevalência dos sorotipos ou cepas estreptocócicas responsáveis pelos episódios de FR nos diferentes Estados.

1.5. O agente etiológico: *Streptococcus pyogenes*

O *Streptococcus pyogenes* é uma bactéria gram-positiva composta estruturalmente por uma cápsula, parede celular, membrana citoplasmática e citoplasma. A cápsula é formada por uma camada de ácido hialurônico que confere à bactéria sua aparência mucóide quando cultivada em ágar sólido e a capacidade de resistir à fagocitose, sendo, portanto, considerado um importante fator de virulência bacteriano, além de contribuir para a aderência da bactéria à orofaringe (BISNO AL, 1988). Interessantemente, cepas de estreptococo com maior quantidade de cápsula mucosa, denominadas cepas produtoras de muco estão mais freqüentemente relacionadas com epidemias de estreptococcias e indução de FR. Diferentemente, cepas pobres em muco são menos virulentas.

Os mecanismos de aderência do *S. pyogenes* as células do hospedeiro, vêm sendo estudados de modo a se obter maior conhecimento dos mecanismos patogênicos da doença e conseqüentemente desenvolver vacinas capazes de prevenir a colonização ao epitélio. Por exemplo, imunização com adesinas do *S. Pyogenes* podem induzir anticorpos que se

concentram na camada mucosa e impedem a aderência e colonização da bactéria ao epitélio (CUNNINGHAM MW, 2000).

Já é bem estabelecida a capacidade antifagocítica do *S. pyogenes*, que ocorre devido à exposição da proteína M e da cápsula de ácido hialurônico na superfície. O mecanismo de resistência à fagocitose exercida pela cápsula de ácido hialurônico parece ser por bloqueio físico entre o C3b depositado na membrana bacteriana e o CR1 nas células fagocíticas. Deste modo os fagócitos não tem acesso as proteínas do complemento que auxiliariam na opsonização da bactéria (DALE JB, 1996).

A parede celular é composta por três camadas, sendo a mais externa de origem protéica e compreende as proteínas M, T e R e o ácido lipoteicóico (LTA), o qual é caracterizado por um polímero longo composto de fosfoglicerol. Este é responsável pela ligação da bactéria a fibronectina presente no epitélio oral do hospedeiro (SIMPSON WA, 1983).

A proteína M é a mais abundante na superfície e é considerada como o principal componente antigênico da bactéria. Esta proteína apresenta uma estrutura fibrilar em α -hélice dupla (“*coiled-coil*”) que se projeta na superfície da bactéria. Possui aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos dispostos em 4 regiões (A, B, C, D) que apresentam blocos de repetições. A porção N-terminal é a mais polimórfica (regiões A e B) e diferenças na região de repetição A definem os sorotipos conhecidos desta bactéria. As porções C e D são conservadas e compõe a região C-terminal, que se insere na superfície da bactéria (FISCHETTI V, 1991). Esta proteína é considerada um fator importante de virulência e impede a fagocitose devido à ligação com Fator H, uma proteína reguladora da cascata do Sistema Complemento, que inibe a deposição da proteína C3b, conseqüentemente impedindo a opsonização do estreptococo (BISNO AL, 1991). A Figura 3 ilustra o mecanismo de opsonização do *S. pyogenes* por dois mecanismos principais. Após ativação do sistema complemento pela via alternativa, o C3b que é a principal opsonina do sistema complemento recobre a superfície do *S. pyogenes*, facilitando a fagocitose do mesmo através da ligação ao CR1 expresso nos fagócitos. Adicionalmente, os anticorpos anti-estreptococo

secretados pelos linfócitos B ativados formam complexos imunes ao se ligarem à bactéria. Posteriormente, o complexo imune é eliminado por opsonização, um processo mediado pela ligação do fragmento Fc do anticorpo ao Fc-R expresso no fagócito.

Figura 3. Reconhecimento do *S. pyogenes* pelo sistema imune – tanto proteínas do sistema complemento como anticorpos anti-estreptococo facilitam a opsonização da bactéria, a qual é posteriormente eliminada por fagocitose. FcR – receptor do fragmento Fc da imunoglobulina G; CR1 – receptor tipo 1 do complemento que se liga ao componente C3b da via alternativa de ativação do complemento.

De fato, anticorpos reativos à proteína M com capacidade opsonizante, facilitam a fagocitose e podem ser protetores (FISCHETTI V, 1991), no entanto, alguns anticorpos podem reagir com estruturas do hospedeiro, tais como miosina e tropomiosina (KAPLAN MW et al., 1964; DALE JB, 1985a, b, 1986; CUNNINGHAM MW et al., 1986 e 1992; FENDERSON PG et al., 1989) e desencadear a FR.

As camadas interna e média da parede celular contêm carboidratos que conferem rigidez à parede e permitem a divisão dos estreptococos nos chamados grupos de Lancefield. Estes carboidratos (ramnose e N-acetilglicosamina) apresentam propriedades antigênicas que ocasionam a produção de auto-anticorpos contra as proteínas valvares.

Existe ainda uma camada da parede celular do estreptococo composta por mucopeptídeos e a membrana protoplasmática, onde se

encontra um complexo de lipoproteínas também altamente antigênico (BISNO AL, 1991).

A Figura 4, adaptada de FISCHETTI (1991), apresenta de forma esquemática as estruturas da parede celular do estreptococo.

O estreptococo apresenta outros fatores de virulência que são produtos extracelulares, como as estreptolisinas O e S, deoxiribonuclease B (DNase B), hialuronidase, C5a peptidase, estreptoquinases e toxinas pirogênicas (exotoxinas) SpeA, SpeB, SpeC, SpeD e SpeF (revisado por CUNNINGHAM MW, 2000).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura do *S. pyogenes*. Adaptado de FISCHETTI, 1991. LTA – ácido lipoteicóico.

1.6. Marcadores Genéticos de Susceptibilidade à Febre Reumática

Embora exista uma alta prevalência da faringite estreptocócica em toda população, observa-se que apenas alguns indivíduos acometidos pela infecção bacteriana desenvolvem a FR aguda (STOLLERMAN GH, 1991). Este fato mostra que, além da infecção, outros fatores, tais como fatores ambientais, sócio-econômicos e principalmente genéticos devem estar envolvidos na suscetibilidade à doença.

Dentre os marcadores genéticos, inicialmente, pesquisou-se o envolvimento dos grupos sanguíneos ABO com a suscetibilidade à FR. Posteriormente, o estado secretor e não secretor de substâncias do grupo ABO (H) na saliva (GLYNN IE, HOLBOROW EJ, 1961). No entanto, nenhum dos estudos mostrou correlação com a doença.

Na década de 70, com a descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) classe I, buscou-se a associação destes marcadores com a FR, porém, não foi possível mostrar nenhuma associação com os antígenos HLA classe I.

Em 1979, PATARROYO ME et al., identificaram o antígeno 883 presente em linfócitos B de 75% dos pacientes portadores de FR na Colômbia e em 80% dos pacientes com FR nos Estados Unidos. Em 1985, ZABRISKIE JB et al., produziram anticorpos monoclonais específicos ao antígeno de membrana dos linfócitos B identificado como 883. Eles observaram que entre os anticorpos monoclonais produzidos, o anticorpo denominado D8/17 era capaz de detectar uma proteína presente em até 20% dos linfócitos B em 100% dos pacientes com FR e em apenas 7% dos controles. Este marcador parece estar associado com a presença de coréia e de outras doenças de espectro psiquiátrico com histórico de infecção estreptocócica (PANDAS) (SWEDO SE et al., 1997).

Finalmente, na década de 80 foi possível associar as moléculas HLA de classe II (HLA-DR e DQ), então recém descobertas, com a FR. Estas moléculas são altamente polimórficas e desempenham um papel fundamental na apresentação do antígeno ao linfócito CD4⁺, influenciando assim o processo de reconhecimento imunológico e conseqüentemente o desencadeamento da resposta imune em cada indivíduo. Neste sentido, estas moléculas destacam-se entre os outros fatores genéticos analisados e de fato alguns antígenos HLA-DR estão associados com a susceptibilidade à doença em diferentes populações.

Por exemplo, o antígeno DR4 foi encontrado com maior freqüência em pacientes caucasóides americanos; DR2 em populações afro-americanas (AYOUB EM et al., 1986); DR1 e DRw6 em pacientes com FR

da África do Sul (ROBERTS S et al., 2001); HLA-DR3 em pacientes indianos (JHINGHAN B et al., 1986), os quais também tiveram baixa frequência do alelo DR2. Nos pacientes com FR na Ásia, a associação foi feita com o antígeno DQW2, na Turquia com DR11 (OLMEZ, U et al., 1992), na Arábia Saudita com DR4 (RAJAPKSE, CNA et al., 1987) e no Egito com DR7 (GUEDEZ, Y et al., 1999). Em uma amostra da população brasileira constituída por mulatos escuros e claros, observamos uma associação da manifestação da doença com antígenos HLA-DR7 e DR53 (GUILHERME, L et al., 1991) (WEIDEBACH, W et al., 1994). No sul do Brasil, em uma população constituída por indivíduos de origem caucasóide, os mesmos antígenos foram encontrados (VISENTAINER, JE et al., 2000). Estes dados sugerem que cada população tem seu próprio marcador HLA de classe II (predominantemente HLA-DR), para a susceptibilidade à febre reumática. É possível que exista um gene que confira susceptibilidade à FR muito próximo ao *locus* HLA-DR. Resultados da análise da segregação de haplótipos HLA em famílias de pacientes portadores de febre reumática corroboram com esta hipótese (GERBASE-DELIMA, M et al., 1994). Este achado de diferentes marcadores para cada população está de acordo com a observação de que a incidência da FR após faringite estreptocócica é praticamente em torno de 3 a 4% em todo o mundo em situações epidêmicas. Já em situações endêmicas que acometem determinadas regiões, a incidência de FR é de 0,3% (KISS, MH, comunicação pessoal). Possivelmente, diferentes cepas de estreptococos estão envolvidas e as diversas moléculas HLA de classe II apresentam peptídeos antígenicos diferentes.

1.7. A Resposta Imune e Auto-imunidade na FR

Postula-se como hipótese de desencadeamento da doença, a presença de reação cruzada entre antígenos do estreptococo e antígenos próprios por mimetismo biológico, que geram agressão aos tecidos humanos, em indivíduos geneticamente susceptíveis. A hipótese do mimetismo biológico é sustentada por observações prévias de semelhança

antigênica entre constituintes do estreptococo e tecidos humanos e adicionalmente devido à ausência do *S. pyogenes* na lesão cardíaca.

Em 1963, KAPLAN MH et al. mostraram que anticorpos presentes em soros de coelhos e em pacientes com FR eram capazes de reconhecer estruturas da parede celular e da proteína M do estreptococo bem como proteínas tissulares de mamíferos com estruturas semelhantes como a miosina, tropomiosina, vimentina, desmina. Estes dados permitiram Kaplan definir o termo “mimetismo biológico” para explicar o reconhecimento de proteínas humanas pelo sistema imune, após o desencadeamento da resposta humoral de defesa contra a bactéria (KAPLAN MH, 1963; KAPLAN MH et al. 1964; KAPLAN MH & FRENGLEY JD, 1969). Mais tarde, outros pesquisadores (STOLLERMAN GH, 1991; CUNNINGHAM MW, 2000) sustentaram a hipótese do mimetismo molecular ao demonstrar que anticorpos anti-estreptococos eram capazes de reagir com diversos tecidos humanos como coração, pele, cérebro, membrana basal glomerular e músculo liso.

Na década de 90, CUNNINGHAM MW et al identificaram epitopos B (indutores de resposta imune humoral) de reação cruzada entre miosina cardíaca humana e proteína M5 em modelo murino. Os autores imunizaram camundongos com peptídeos da miosina cardíaca e testaram com peptídeos da proteína M5, das regiões de repetição A,B e observaram a presença de epitopos de reação cruzada com a miosina cardíaca humana.

Mais tarde, em 2000, GALVIN JE et al. mostraram que um anticorpo monoclonal de reação cruzada anti-miosina e anti-GlcNAc presentes no soro de pacientes com FR também eram capazes de reconhecer o endotélio valvular e membrana basal através da reatividade contra a laminina. Deste modo, os autores puderam concluir que estes anticorpos de reação cruzada presentes na periferia também participam no processo de agressão ao tecido valvar.

Além destes trabalhos existem várias evidências de anticorpos de reação cruzada contra a proteína M do estreptococo e a miosina cardíaca (KRIESHER K & CUNNINGHAM MW, 1985), (DALE & BEACHEY, 1985b),

(CUNNINGHAM MW & SWERLICK RA, 1986), (CUNNINGHAM MW et al., 1992), tropomiosina (FENDERSON PG et al., 1989), vimentina (CUNNINGHAM MW & SWERLICK RA, 1986), (KRAUS W et al., 1989), (BAIRD RW et al., 1991).

O papel da resposta imune celular na FR somente começou a ser investigada na década de 70; 25 anos após a descrição da presença de anticorpos de reação cruzada com o tecido cardíaco presentes no soro de pacientes com FR. Os primeiros estudos avaliaram a reatividade de linfócitos T presentes no sangue periférico de pacientes com FR e DRC contra antígenos presentes na parede celular do estreptococo (READ SE et al., 1974), (GRAY ED et al., 1981), (GROSS WS & SCHLAAK M, 1984). Posteriormente, também foi demonstrado que nas tonsilas e no sangue periférico de pacientes com FR havia um número elevado de linfócitos T CD4⁺ quando comparado com indivíduos saudáveis (BATHIA R et al., 1989). A atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ presentes no sangue periférico de indivíduos normais contra células cardíacas humanas imortalizadas também foi descrita (DALE, JB et al., 1981), (KOBT, M et al., 1989). Todas estas observações sustentam o que hoje já está bem estabelecido, ou seja, a cardite que ocasiona as lesões valvares características na DRC é um processo mediado por linfócitos T auto-reativos.

A reação cruzada celular por linfócitos T CD4⁺ infiltrantes das lesões cardíacas foi, inicialmente demonstrada pela reatividade de peptídeos da proteína M5 do estreptococo e proteínas derivadas do tecido valvular (GUILHERME L et al., 1995). A observação de que linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de FR e DRC apresentavam o mesmo padrão de reação cruzada dos linfócitos infiltrantes do coração (GUILHERME L et al., 2001). Estes achados sugerem que populações de linfócitos ativadas pelo estreptococo na vigência da infecção da orofaringe, liberados para a circulação periférica, migram preferencialmente para o tecido cardíaco nos pacientes reumáticos que desenvolvem lesões no coração. O modo pelo qual ocorre infiltração celular no coração foi elucidado recentemente, através da observação de que anticorpos contra antígenos

estreptocócicos como carboidratos do tipo N-acetil-glucosamina, antígeno também presente no tecido valvular, e anticorpos de reação cruzada com a miosina humana, ligam-se no endotélio valvular e induzem o aumento de expressão de VCAM1 e outras moléculas de adesão iniciando assim o processo inflamatório. A interação de VCAM1 com VLA4 ($\beta 1$ integrina) expressa nos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados, favorece o influxo destas células, amplificando assim o processo inflamatório (ROBERTS S et al., 2001; CUNNINGHAM MW, 2003).

A identificação molecular do reconhecimento antigênico pelos linfócitos infiltrantes do tecido cardíaco, através da análise da identificação das famílias V beta do receptor da célula T (RCT), mostrou a presença de expansões oligoclonais no tecido cardíaco (GUILHERME et al., 2001). Alguns destes clones apresentaram reconhecimento de múltiplos antígenos, mostrando que o reconhecimento antigênico na FR é degenerado (FAÉ, K et al., 2004), confirmando dados experimentais descritos anteriormente por Mason D (MASON D, 1998).

1.8. Reconhecimento antigênico por linfócitos T

Tanto os linfócitos B como os linfócitos T utilizam seus receptores antigênicos de superfície, conhecidos como BCR e TCR (do inglês, B cell receptor e T cell receptor) respectivamente, para efetuarem o reconhecimento do antígeno.

Neste trabalho analisamos o reconhecimento de auto-antígenos de reação cruzada com estruturas do *S. pyogenes* por linfócitos T intralesionais por mimetismo molecular, portanto descrevemos as bases moleculares do reconhecimento antigênico por linfócitos T.

O RCT é um heterodímero, composto por duas cadeias polipeptídicas glicosiladas, designadas α e β , que estão ligadas covalentemente entre si por pontes de dissulfeto (Figura 5). Existe ainda um outro tipo de RCT, menos comum, encontrado num pequeno sub-grupo de linfócitos T, composto pelas cadeias γ e δ .

Cada linfócito T é constituído de aproximadamente 30.000 moléculas de RCT expressos na superfície celular.

Figura 5. Receptor do linfócito T $\alpha\beta$. A cadeia α e a cadeia β na porção extracelular apresentam os domínios, variável (V) e constante (C) e uma região transmembrânica e cauda citoplasmática.

Os genes que codificam as cadeias α e β do RCT consistem de uma região variável (V), elementos de junção (J) e de uma região constante (C), sendo que o *locus* da cadeia β também contém segmentos gênicos de diversidade (D).

Tanto a cadeia α quanto a cadeia β são constituídas dos domínios imunoglobulina-like (domínios constante e variável). As regiões localizadas no domínio variável que interagem com o complexo peptídeo-MHC são conhecidas como regiões CDRs, do inglês, “complementary-determining regions”. Cada cadeia α e β apresentam 3 regiões CDR. O CDR1 e CDR2 são constantes para cada tipo de cadeia e interagem com a molécula de MHC. Já o CDR3 é altamente variável (cadeia α difere da cadeia β na região do CDR3) devido à recombinação somática, inserções e deleções de resíduos de aminoácidos e está relacionado com a especificidade antigênica, uma vez que interage com a estrutura primária do peptídeo antigênico. A Figura 6, adaptada de GARCIA KC, ADAMS, EJ, 2005 ilustra bem essas interações.

Figura 6. RCT e Interações Moleculares. Interação RCT/pMHC (esquerda). À direita, interação do CDR1 e 2 com as hélices do MHC, enquanto o CDR3 interage com o peptídeo antigênico ligado ao MHC. Figura publicada por GARCIA KC, ADAMS, EJ, 2005.

O mecanismo pelo qual o sistema imune adaptativo discrimina o próprio do não-próprio é dependente de um reconhecimento antigênico apropriado, onde antígenos são apresentados aos linfócitos T pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II (MHC) presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). As células apresentadoras de antígenos após processarem antígenos em pequenos peptídeos os combinam com as moléculas de MHC I – (antígenos intracelulares) e MHC II (antígenos extracelulares). Após a migração do complexo peptídeo-MHC (pMHC) para a membrana celular da APC, este passa então a ser apresentado aos linfócitos T e o reconhecimento do antígeno como próprio ou não próprio é feito através dos seus RCTs $\alpha\beta$.

Quando o RCT interage com o peptídeo apresentado pelo MHC, o linfócito T é estimulado a executar sua função efetora, seja a produção de citocinas por linfócitos $CD4^+$ auxiliares ou citotoxicidade no caso dos linfócitos T $CD8^+$ desencadeando o processo da resposta imune (GARCIA KC, ADAMS, EJ, 2005).

1.9. Utilização do *Phage Display* na identificação de epitopos reconhecidos por linfócitos T

A identificação de epitopos protéicos reconhecidos por linfócitos T é essencial para o estudo da especificidade antigênica de linfócitos T com relevância em doenças auto-imunes como a FR. Para esta finalidade, a metodologia do “Phage Display” foi empregada como uma ferramenta para “varrer” a superfície dos linfócitos T, seja pelo receptor do linfócito T ou através de outros receptores de superfície expressos nas células T.

Phage display de peptídeos foi descrito pela primeira vez por George Smith (1985) ao demonstrar que fagos filamentosos (vírus de bactérias) poderiam ser utilizados para apresentar peptídeos antigênicos fundidos a uma proteína do capsídeo viral denominada de pIII. Esta metodologia foi inicialmente empregada para caracterização de epitopos de anticorpos monoclonais e policlonais (SMITH G, 1985), na qual fagos "apresentando" peptídeos poderiam então ser imuno-capturados pelo respectivo anti-soro dirigido contra o antígeno contendo os peptídeos presentes na superfície do capsídeo viral (SMITH G, 1985). Assim, surgiu o conceito de "*Peptide Phage Display*", que permitiu que bibliotecas de *phage display* fossem amplamente utilizadas na identificação de peptídeos ligantes de virtualmente qualquer alvo biológico, tais como anticorpos, receptores, enzimas, moléculas de adesão, carboidratos, entre outros.

Esta metodologia também pode ser utilizada para varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares (BROWN, KC, 2000; GIORDANO RJ et al., 2001).

No presente trabalho abordamos a identificação de epitopos com capacidade de ligação aos linfócitos T (RCT ou outras moléculas de superfície) infiltrantes do tecido cardíaco de pacientes com doença reumática cardíaca. O intuito foi identificar proteínas mais freqüentemente envolvidas no processo auto-imune por reações cruzadas com antígenos do estreptococo ou moléculas ativadoras do processo inflamatório reumático.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a utilização da biblioteca peptídica de *Phage Display* como ferramenta na identificação de auto-antígenos cardíacos, alvos do reconhecimento por linfócitos T infiltrantes do coração isolados de pacientes com doença reumática cardíaca.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar peptídeos ligantes do RCT de duas linhagens e um clone de linfócito T infiltrantes do tecido cardíaco na busca de epitopos mímicos (mimotopos) de auto-antígenos cardíacos e mimotopos de antígenos estreptocócicos envolvidos na reatividade cruzada.
- Identificar ligantes de outras moléculas de superfície expressos nos linfócitos T intralesionais, que não o RCT.

3. Pacientes e Materias de trabalho

3.1. Pacientes

O presente trabalho incluiu o estudo de duas crianças portadoras de doença reumática cardíaca DRC grave. Estes pacientes foram avaliados por cardiologistas pediátricos da Unidade de Cardiologia Pediátrica do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, FMUSP e preenchem os critérios de Jones (DAJANI AS et al., 1993) utilizados no diagnóstico de FR.

Os pacientes foram submetidos à cirurgia para correção valvar no Instituto do Coração. Fragmentos cirúrgicos de valva aórtica (v. Ao) e/ou valva mitral (v. Mi) e tecido do miocárdio do átrio esquerdo (A.E.) foram removidos durante o processo cirúrgico e enviados ao Laboratório de Imunologia e processados para estabelecimento de clones e linhagens intralesionais de linfócitos T. Amostras destes fragmentos encaminhadas ao Serviço de Anatomia Patologia, InCor para análise histopatológica.

A obtenção deste material foi realizada após parecer favorável do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas - FMUSP.

3.2. Materiais

Neste ítem estão descritas as metodologias empregadas em trabalhos anteriores para obtenção e caracterização das populações celulares empregadas neste trabalho. As metodologias desenvolvidas e utilizadas no decorrer deste estudo estão especificadas no ítem Métodos Empregados.

3.2.1. Determinação dos antígenos HLA-DR e DQ

Os pacientes estudados tiveram os antígenos HLA de classe II (DR e DQ) previamente identificados por PCR-SSP (do inglês, "Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers" - Reação de polimerização em cadeia com iniciadores de sequência específicos), segundo metodologia descrita por (OLERUP O & ZETTERQUIST, H, 1992).

A Tabela 2 sumariza os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes, bem como os antígenos HLA de classe II e material biológico a ser analisado.

Tabela 2. Caracterização clínica e histológica dos pacientes estudados e identificação do material analisado.

Pacientes	Idade* anos	Gênero	HLA classe II	Dados clínicos	Material para obtenção de linfócitos T	Histopatologia	Identificação linhagens T
SLA	6	M	DRβ1* 15, 7, 51, 53	Insuficiência grave de valva mitral e moderada	v. Mi.	Valvopatia crônica, nódulos de Aschoff no músculo papilar.	Lu 3.1
			DQβ1* 6, 2	de valva aórtica			
MASA	9	M	DRβ1* 11, 13, 52	Insuficiência grave das valvas aórtica e mitral	v. Ao.	Valvopatia mitral e aórtica aguda	Lu 10.1
			DQβ1* 5, 7				

M: masculino; v. Mi.: valva mitral; v. Ao.: valva aórtica; * Idade dos pacientes no momento da coleta das amostras.

3.2.2. Fragmentos do tecido cardíaco para obtenção das linhagens e clones de linfócitos T intralesionais

Fragmentos de miocárdio e de tecido valvular foram retirados assepticamente da peça a ser enviada para o serviço de anatomia patológica durante o procedimento cirúrgico para correção da valvulopatia reumática. Em seguida, estes fragmentos foram acondicionados em meio para cultivo celular RPMI 1640 para posterior obtenção de linhagens e clones de linfócitos T intralesionais. A retirada dos fragmentos do tecido cardíaco foi autorizada pela Comissão de Ética do Instituto do Coração, HC-FMUSP e InCor.

3.2.3. Obtenção das linhagens de linfócitos T infiltrantes no tecido valvular

Primeiramente, os fragmentos foram cortados em microfragmentos com auxílio de tesouras e agulhas estéreis e colocados em microplacas de cultura celular de 96 orifícios (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro humano normal inativado (provenientes do hemocentro do Hospital das Clínicas - HC), 2mmol/l de L-Glutamina (Sigma), 10mmol/l Hepes (Sigma), 1% de piruvato de sódio, antibióticos (Garamicina e Peflacin) à concentração de 40µg/ml e 20µg/ml respectivamente. Esse meio foi chamado meio completo, e posteriormente adicionado de 40UI/ml de IL-2 recombinante humana (Biosource Inc., Camarillo, CA).

Em seguida, foram adicionadas células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais HLA-DR compatível como alimentadoras, ou seja, como fonte de citocinas e outros fatores de crescimento (10^5 células/orifício), irradiadas a 5000 rads. As células foram então incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, sendo o meio de cultivo no início trocado a cada 4-5 dias, e posteriormente com mais freqüência devido à expansão celular. As linhagens foram estabelecidas em 20-30 dias. Os clones foram obtidos imediatamente após a expansão das linhagens com 1 a

2 estímulos por PHA, sendo que até 8-10 expansões não há alteração da população (GUILHERME L, et al.,1995).

3.2.4. Obtenção de clones de linfócitos T intralesionais

As linhagens intralesionais de linfócitos T estabelecidas foram expandidas pela adição de 2,5 µg/ml de PHA-P (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) em meio de cultura completo acrescido de 40UI/ml de IL-2, 2,5 ng/ml de IL-7 e IL-15 na presença de células mononucleares do sangue periférico irradiadas a 5000 rads.

A partir dos linfoblastos obtidos durante o estabelecimento de cada linhagem, clones de linfócitos T foram gerados através da técnica de diluição limitante, a qual consiste na diluição dos linfoblastos em suspensão. O procedimento de clonagem foi realizado utilizando 3 (três) diluições diferentes: 0,3; 0,5 e 1 linfoblasto/orifício, os quais foram expandidos na presença de 2,5 µg/ml PHA-P, células mononucleares de sangue periférico irradiadas (10^6 células/ml), 40UI/ml de IL-2 e 2,5ng/ml de IL-7 e IL-15. Esta suspensão celular foi então distribuída em placa de 96 orifícios de meia área ou alternativamente em microplacas de Terazaki. Após 15 a 20 dias, os clones obtidos foram expandidos como descrito anteriormente e utilizados posteriormente em testes de proliferação celular antígeno específico.

3.2.5. Caracterização fenotípica das linhagens de linfócitos T

As características fenotípicas das linhagens dos pacientes MASA-Lu 10.1 e SLA-Lu 3.1, bem como do clone SLA -Lu 3.1.17 foram determinadas por citometria de fluxo e estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização fenotípica por citometria de fluxo das duas linhagens de linfócitos T infiltrantes do coração e do clone Lu 3.1.17.

Linhagem	Marcadores Celulares (%)			
	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	RCT $\alpha\beta$ ⁺
Lu 10.1 - MASA	99,1	97,3	0	97,6
Lu 3.1 - SLA	99,8	87,2	7,4	94,4
Lu 3.1.17	99,6	99,1	0	99,9

Os resultados foram analisados na região de linfócitos. Foram adquiridas 5.000 células / evento.

3.2.6. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Dentre os fagos estudados, obtivemos um fago (masa-45) da linhagem Lu10.1 com sequências compatíveis com o receptor da IL-1. Para validarmos este resultado sintetizamos um peptídeo denominado masa-45, contendo 10 resíduos de aminoácidos de uma das sequências da biblioteca utilizada. Este peptídeo foi usado para a análise da capacidade de ligação ao receptor da IL-1 por RMN, ou seja, por mudança de deslocamento químico. Para tal, o receptor da IL-1 comercialmente disponível e o peptídeo sintético (masa-45) foram analisados por 1H-1D-RMN e TOCSY (do inglês, “Total Correlation Spectroscopy”) sozinhos e combinados numa relação ótima determinada (BRAUNSCHWEILER L & ERNST EE, 1983). Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Dr. Fabio Almeida da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4. Métodos Empregados

4.1. Caracterização das subpopulações linfocitárias componentes das linhagens Lu 3.1. e Lu 10.1 através da identificação do receptor da célula T (RCT)

4.1.1. Extração de RNA

O conhecimento das subpopulações celulares componentes das linhagens estudadas pode auxiliar a interpretação dos resultados a serem obtidos usando-se a ferramenta do *phage display* para a análise de auto-antígenos ligantes do RCT.

O determinação das famílias V β do RCT das linhagens intralesionais Lu 3.1 (v.Mi.) e Lu 10.1 (V.Ao) foi realizado por Faé, KC (Tese de Doutorado). Para a linhagem Lu 3.1 também foram avaliadas as subfamílias J β .

Para a linhagem intralesional Lu 10.1 (v.Ao.) analisamos as subfamílias J β . Primeiramente, ampolas da linhagem celular Lu 10.1 que haviam sido congeladas na data da realização do *biopanning* foram descongeladas em banho à 37°C. A razão deste critério foi obter um repertório linfocitário o mais semelhante possível do empregado no processo do *biopanning*.

A extração do RNA da linhagem de linfócito T intralesional Lu 10.1 (v.Ao) foi realizada pelo método descrito por CHOMZYNSKI P & SACCHI, N, 1987, o qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. Partindo de uma suspensão de aproximadamente 1 a 5x10⁶ linfócitos T da linhagem intralesional Lu 10.1, adicionou-se 1ml de Trizol. Esta solução foi homogeneizada e então incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Durante esta fase as amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Em seguida adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio

para cada ml de trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 1120xg a 4°C. Após esta centrifugação ocorre a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 ml de álcool isopropílico para cada ml de trizol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi homogeneizado por inversão, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e então centrifugado novamente a 1120g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA lavado com etanol 75% diluído em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) seguido de centrifugação a 640g por 5 minutos a 4°C. O RNA assim obtido foi exposto por 5 minutos à temperatura ambiente de modo a permitir a evaporação do etanol e então ressuspendido em 10µL de água DEPC. Este material foi mantido a – 80°C até o momento da transcrição.

4.1.2 Quantificação do RNA

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 a 1,8. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA/ml no comprimento de onda de 260 nm (SAMBROOK, 1989).

4.1.3 Transcrição reversa

A obtenção do cDNA foi realizada utilizando teste comercial (cDNA Cycle Kit for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi utilizado 1µg de RNA total, acrescido de 1µl de oligodT (0,2 µg/µl) e água estéril q.s.p. 12,5µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C em termociclador (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) para remoção de estruturas

secundárias, e mantida a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1µl de inibidor de RNase (10U/µl), 4µl de tampão de transcrição 5x, 1µl de dNTP 100mM (25mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1µl de pirofosfato de sódio 80mM e por último, 0,5µl da enzima transcriptase reversa (AMV) (10U/µl). Esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 60 minutos e 95°C por 2 minutos. A qualidade da transcrição foi avaliada através de PCR para o “house keeping gene” HPRT- Hipoxantina Fosforibosil Transferase (HPRT, do inglês, “hypoxanthina phosphoribosyl transferase”).

4.1.4. Reação de PCR para determinação das famílias Jβ do RCT (Vβ-Jβ)

Em um volume final de 20µl foram utilizados 2,5% de cDNA transcrito, tampão 10x (500mM KCl e 100mM Tris-HCl), 1,5mM de MgCl₂, 200µM dNTP, 0,5µM do “primer” Vβ específico (família Vβ previamente definida), 0,5µM do primer Jβ específico, 1U Taq polimerase e água q.s.p. 20µl. A amplificação foi realizada em termociclador por 1 minuto e 30 segundos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, completados com uma extensão final de 4 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi carregado em gel de agarose 1,5% e agarose-1000 1,5% (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/ml) e submetido a corrida eletroforética de 100 V por 1 h 30 minutos. Na Tabela 4 estão listados os primers utilizados e suas especificidades.

Tabela 4. Sequência dos primers utilizados para amplificação das famílias J β do RCT.

Famílias Jβ	Sequências dos primers	Especificidades amplificadas
J β 1.1	5' CACAGCGACCTCGGGTGGG 3'	J β 1S1
J β 1.2	5' ACAACGGTTAACTTGGTCCCCGAA 3'	J β 1S2
J β 1.3	5' GGTCTCTACAACAGTGAGCCAAC 3'	J β 1S3
J β 1.4	5' AAGAGAGAGAGCTGGGTTCCTACTG 3'	J β 1S4
J β 1.5	5' GGAGAGTCGAGTTCCATCA 3'	J β 1S5
J β 1.6	5' TGTCACAGTGAG CCTGGTCCCATT 3'	J β 1S6
J β 2.1	5' CCTGGCCCGAAGAACTGCTCA 3'	J β 2S1
J β 2.2	5' GTCCTCCAGTACGGTCAGCCTAGA 3'	J β 2S2
J β 2.3	5' TGCCTGGGCCAAAATACTGCG 3'	J β 2S3
J β 2.4	5' TCCCCGCGCCGAAGTACTGAA 3'	J β 2S4
J β 2.5	5' TCGAGCACCAGGAGCCGC 3'	J β 2S5
J β 2.6	5' CTGCTGCCGGCCCCGAAAGTC 3'	J β 2S6
J β 2.7	5' TGACCGTGAGCCTGGTGCCCG 3'	J β 2S7

4.1.5. Síntese de peptídeos de diferentes isoformas da miosina cardíaca

Após análise das seqüências dos fagos em banco de dados, os melhores candidatos, ou seja, os fagos que apresentaram melhor homologia com fragmentos da miosina cardíaca (levando em conta a identidade entre os resíduos de aminoácidos) foram considerados e peptídeos da miosina foram sintetizados variando entre 13 e 20 o número de resíduos de aminoácidos. A síntese destes peptídeos foi realizada em sintetizador automático múltiplo de oito canais (Shimadzu, Inc., modelo PSSM-8, Kyoto, Japão). Os peptídeos foram purificados por cromatografia de alta pressão (HPLC) e analisados por espectrometria de massa. Na Tabela 5 estão descritos as seqüências dos peptídeos sintetizados.

Tabela 5. Peptídeos da miosina cardíaca com homologia com as seqüências dos fagos.

Nomenclatura peptídeo (fago de origem)	Proteína	Sequência peptídeo	Resíduos a.a.
sla-75	Miosina cardíaca beta	RVKVGNEYVTKGQSVQQV	18
masa-19	Miosina cardíaca beta	KALQEAHQALDDLQ	15
clo-a11	Miosina cardíaca beta	DGTEEADKSAYLMGL	15
masa-26	Miosina cardíaca alfa	KMDADLSQLQSEV	13
masa-71	Miosina cardíaca alfa	LEAQTRPFDIRTE	13
clo-g10	MYH7B	DKAAYLMGVSSGDLLKGLLH	20
sla-92	Miosina Ventricular cadeia leve	VREMLTTQAERFSKEEVDQM	20
sla-92	Miosina IXB	KITTCVEMLIKEQMRKYKVK	20
clo-e4	Miosina-like	LDLEKKAVAVGHSQV	15
sla-52	MYH7B (frag.1)	VSALTAKALRLQEQVEDL	18
sla-52	MYH7B (frag.2)	KCSSLEKAKLRLQTESEDVT	20
sla-47	Myosin-binding protein C	DGEVTVGGSITFSARVAGAS	20

Em vermelho - resíduos de aminoácidos idênticos aos peptídeos dos fagos.

4.2. Congelamento e descongelamento das linhagens intralesionais Lu 10.1 e Lu 3.1 e clone Lu 3.1.17

As células foram centrifugadas a 400xg por 8 minutos e ressuspendidas em solução de congelamento contendo 50% de meio RPMI 1640 (Sigma), 40% de soro fetal bovino inativado - SFBi (HyClone) e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), em banho de gelo. As células foram congeladas gradativamente em galões de nitrogênio líquido: 10 minutos a 10cm do nível, 10 minutos ao nível do nitrogênio e finalmente imersas em nitrogênio.

Para o descongelamento, a ampola retirada do N2 líquido contendo as células, foi rapidamente imersa em banho a 37°C mantendo suave agitação. Adicionou-se à solução descongelada rapidamente em 9 ml de meio de cultura RPMI 1640 e procedeu-se a centrifugação a 400g por 8

minutos. Após remoção do meio, o processo de lavagem celular foi repetido por mais duas vezes de modo a eliminar toda a solução de congelamento contendo DMSO, substância essa que é tóxica para as células. Finalmente as células foram ressuspensas em meio DMEM completo, contadas em hemocítmetro (câmara de Neubauer) e após determinação da viabilidade celular com Azul de Tripam (Gibco), o volume da suspensão foi ajustado para a concentração de células desejadas.

4.3. “*Phage Display*”

4.3.1. Biblioteca de peptídeos de “*Phage Display*”

A biblioteca de peptídeos de *Phage Display* empregada no presente estudo foi produzida nos laboratórios dos Drs. Wadih Arap e Renata Pasqualini (*University of Texas – M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA*) e Dr. Erkki Koivunen (Universidade de Helsinque, Finlândia), utilizando-se o vetor fUSE5 (baseado no fago fd-tet). A metodologia empregada na construção desta biblioteca foi desenvolvida por Smith e Scott (SMITH G & SCOTT JK, 1993), com aplicação de modificações para melhor eficiência e obtenção de maior número de clones finais (KOIVUNEN E et al., 1993, 1999a, 1999b).

O gene de resistência à tetraciclina constituído no genoma do fago (Tet^R) é o que possibilita o crescimento e seleção de bactérias infectadas com fago em meio de cultura LB (Luria-Bertani) contendo tetraciclina. Em meio líquido (solução) LB kan/tet (kanamicina/tetraciclina) as concentrações finais são de 100µg/ml e 20µg/ml respectivamente e em meio sólido LB tet/água a concentração final é de 40µg/ml).

Foram utilizadas bibliotecas cíclicas do tipo CX₁₀C (C, cisteína; X, qualquer resíduo de aminoácido). As ligações dissulfídicas entre as 2 (duas) cisteínas flanqueando os 10 (dez) resíduos aleatórios de aminoácidos conferem uma conformação circular do peptídeo, restringindo o grau de liberdade do peptídeo (maior rigidez) e conseqüentemente produzindo peptídeos mais estáveis e que se ligam com maior avidéz ao ligante.

4.3.2. *Phage Display*, empregando a metodologia BRASIL

Para a seleção de fagos ligantes específicos das linhagens de linfócitos T infiltrantes Lu 3.1 e Lu 10.1, bem como do clone Lu 3.1.17 desenvolvemos o protocolo de seleção empregando a metodologia BRASIL (Figura 7) (GIORDANO RJ et al., 2001).

A etapa de seleção dos fagos ligantes denominada de *biopanning* foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, denominada “pré-clearing” utilizamos 5×10^6 células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos saudáveis. Esta etapa visa remoção de fagos ligantes de linfócitos não ativados e outras células hematopoiéticas não relacionadas a DRC. Inicialmente, as CMSP foram lavadas em meio DMEM, ressuspensas em 100 μ l de meio RPMI contendo 1% BSA, transferidas para tubos de 1,5ml e adicionadas de 5 μ l da biblioteca de fagos CX₁₀C, correspondente a aproximadamente 1×10^9 TU ou CFU, do inglês, *transducing units* ou *colony forming units*, respectivamente.

Após incubação por 1-2 horas em gelo, a mistura CMSP-biblioteca de fagos foi transferida para tubos de 400 μ l (Eppendorf) contendo 200 μ l de óleo ftálico {dibutil-ftalato:ciclohexano (9:1 v/v)} e centrifugada a 10000xg por 10 minutos. Deste modo, o *pellet*, constituído das CMSP e dos fagos aderidos a elas, que penetra na fase orgânica ftálica é separado dos fagos não-ligantes que permanecem na fase aquosa superior, apresentando assim maior probabilidade de se ligarem especificamente aos linfócitos T infiltrantes empregados na etapa seguinte de seleção.

Antes de serem empregados na etapa de seleção, denominada de “*panning*”, os linfócitos T infiltrantes dos pacientes portadores de DRC (1×10^6 células) foram lavados, ressuspensos em meio DMEM e homogeneizados com os fagos não ligantes das CMSP que permaneceram na fase aquosa durante a etapa anterior de “pré-clearing”. Após um período de incubação de 2-4 horas em gelo, a suspensão linfócitos-fagos foi transferida para novo tubo de 400 μ l contendo 200 μ l do óleo ftálico e centrifugada a 10000xg por 10 minutos. Em seguida, o tubo foi acondicionado por 10 minutos à -80°C de modo a congelar a fase aquosa superior, evitando assim a contaminação do

pellet de interesse. Diferentemente da fase de “pré-clearing”, desta vez, o *pellet* formado no fundo do tubo (dentro da fase orgânica ftálica), constituído de linfócitos-fagos foi removido através da cisão do tubo com auxílio de tesoura, e os fagos ligados aos linfócitos foram posteriormente recuperados por infecção com *E.coli* K91kan (pequena quantidade de óleo restante não prejudica a infecção bacteriana).

4.3.3. Cultura e infecção bacteriana

A cepa bacteriana *E.coli* K91kan, que constitutivamente expressa o gene que confere resistência à kanamicina (Kan^R), foi inoculada em tubos de 50ml contendo 7ml de meio de cultura TB (do inglês “Terrific Broth”) suplementado com tampão fosfato e kanamicina sob agitação a 250rpm/37°C e utilizada para infecção dos fagos uma vez atingida a fase *log* de crescimento ($DO_{600} \cong 1.5-2.0$).

A parte inferior do tubo cortado contendo o *pellet* linfócitos-fagos foi transferido para tubo de 1,5ml e acrescido de 200µl da cultura bacteriana K91kan. A mistura contendo linfócitos, fagos e bactéria foi levemente agitada e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente de modo a facilitar a adesão dos fagos à bactéria e posterior infecção.

Passado esse tempo, as bactérias já infectadas pelos fagos foram transferidas para frascos Erlenmeyers estéreis contendo 20ml de meio LB com baixa concentração de tetraciclina (0,2µg/ml) e incubadas sob agitação por 1 hora a 37°C. Esta etapa possibilita a indução do gene de resistência à tetraciclina (Tet^R), aumentando assim a eficiência da infecção bacteriana. Em seguida, a concentração de tetraciclina foi ajustada a uma concentração final de 20 µg/ml de modo a favorecer o crescimento apenas das bactérias infectadas e após 16-18 horas de incubação sob agitação a 37°C, os fagos recuperados no *panning* foram amplificados.

Os fagos secretados no meio de cultura foram então concentrados por precipitação com PEG/NaCl (SMITH G & SCOTT JK, 1993) e utilizados nos sucessivos ciclos de seleção.

Foram realizados 3 ciclos de “pré-clearing”/seleção para as duas linhagens (Lu 10.1 e Lu 3.1) e para o clone (Lu 3.1.17).

O número de ciclos realizados foi determinado com base na experiência anterior do grupo, onde resultados significativos foram obtidos sem haver perda da diversidade de fagos ligantes à superfície celular (GIORDANO RJ et al., 2001). Diferentemente de *biopannings* em moléculas isoladas, células são alvos complexos que expressam uma grande diversidade de proteínas e receptores de membrana, os quais também variam o número de expressão, o que pode favorecer o enriquecimento dos fagos ligantes dos alvos com expressão aumentada. Ao final do terceiro ciclo de seleção, 96 colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente para posterior sequenciamento e identificação dos peptídeos apresentados pelos fagos.

Figura 7. Esquema das etapas envolvidas na metodologia BRASIL (desenvolvido por GIORDANO RJ et al., 2001)

4.3.4. Seleção dos clones de fagos (colônias bacterianas)

Ao final do último ciclo de seleção do *biopanning*, diferentes volumes da cultura bacteriana (1 – 100µl) foram semeados em placas de LB-ágar-tetraciclina (40µg/ml). Essa variação no volume visa garantir a obtenção de colônias isoladas. Deste modo, 96 colônias de *E.coli* infectadas com fagos foram selecionados aleatoriamente com auxílio de palitos de madeira estéreis e acondicionadas nos orifícios de placas de 96 orifícios contendo 50µl PBS/orifício. Estes clones contêm o DNA dos fagos selecionados necessários para a reação de PCR. Vale ressaltar que ao selecionar as colônias das placas de ágar (clones), impurezas bacterianas também são coletadas, no entanto estas não interferem na reação de PCR.

4.3.5. PCR para amplificação do DNA dos clones de fagos selecionados

A região do DNA contendo o inserto foi amplificada a partir de 2µl da suspensão de PBS (correspondendo a 4% de todo DNA do fago dissolvido em 50µl de 1X PBS). Em um volume final de 20µl, além dos 4% de DNA também foi adicionado à reação 2µl tampão para PCR (10mM Tris-HCl, 50KCl), 0,2µl dNTP (100X), 2 mM MgCl₂, 8 pmoles de cada primer específico para o gene da proteína pIII do fago, 2,5 U de Taq polimerase e água q.s.p. 20µl. Esta reação foi processada em termociclador por 35 ciclos que compreendem: denaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto.

Como controle do processo, o gene da pIII do fago selvagem Fd-Tet, que não contém o inserto de DNA exógeno codificante do peptídeo, sempre foi amplificado em paralelo, uma vez que o produto de PCR gerado é menor do que os clones de fagos contendo inserto. Considerando que a biblioteca utilizada foi a CX₁₀C, o produto de PCR dos fagos selecionados deve conter 30 pares de bases a mais que o fago controle.

Os “primers” utilizados para amplificar a região do gene da pIII contendo o inserto codificante do peptídeo foram: Forward 5’ – ^{HO} CATGCC

CGGGTA CCTTTC TATTCT C- 3' e Reverse 5' – ^{HO} CCCTCA TAGTTA GCGTAA CGATCT- 3'.

O produto de amplificação foi carregado em gel analítico de agarose 1,5% (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/ml) e submetido a corrida eletroforética de 100 V por 45 minutos.

4.3.6. Sequenciamento dos fagos

Uma vez confirmada a presença do inserto, o produto de PCR foi então submetido à reação de sequenciamento utilizando o “Cy5 AutoCycle Sequencing Kit” (Pharmacia Biotech) e analisado em sequenciador automático ABI Prism TM DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.3.7. Preparo do gel de sequenciamento

A análise do DNA inserido no gene da pIII do fago foi realizada em gel de sequenciamento contendo 6% de poliacrilamida, 8M de uréia e 1x tampão Tris-Borato-EDTA (TBE).

As placas de vidro foram lavadas com detergente não abrasivo (Extran, Merck, Merck SA, Indústria Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e enxaguadas com água corrente e depois com água destilada. Antes do acoplamento das placas no suporte de migração, as mesmas foram limpas novamente com metanol para completa remoção de resíduos.

Para uma solução de 50ml de gel foram pesados 18g de uréia e 1,3 a 1,4g da resina “Amberlite” (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), acrescidos de 24,5ml de água destilada e 5,2 ml de solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida 19/1 (BioRad, Hercules, CA, USA). Esta solução foi colocada em agitação leve até dissolução completa da uréia.

Em seguida, esta solução foi filtrada em filtro de 0,22µm contendo em sua parte inferior 5ml de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 10x). O volume da solução foi completado para 50 ml com água destilada. Por último acrescentou-se 250µl de solução de persulfato de amônia 10% e 35µl de TEMED (Amresco, Solon, Ohio, USA). Com o auxílio de uma seringa o gel

foi carregado nas placas de vidro e utilizado após completa polimerização (aproximadamente 1h30min).

Devido ao elevado número de fagos a ser sequenciado, somente os fagos candidatos após análise em banco de dados tiveram suas reações de sequenciamento repetidas para confirmação do inserto antes de se dar início aos ensaios funcionais.

4.3.8. Identificação do DNA inserido na pIII dos fagos e tradução para peptídeo

Para localizarmos a sequência de DNA inserido na pIII dos clones de fagos, procuramos por seqüências flanqueadoras da proteína pIII seguida das cisteínas, onde foi introduzido o inserto durante a construção da biblioteca. Posteriormente, softwares específicos como <http://au.expasy.org/tools/dna.html> foram utilizados para tradução da sequência de DNA para identificação do peptídeo apresentado por cada fago. A Figura 8 mostra como foi realizada a análise para a identificação do DNA inserido, bem como a tradução para peptídeo.

Figura 8. Localização do inserto no gene da pIII do fago e tradução para peptídeo.

Em azul – seqüências flanqueadoras do inserto codificando o peptídeo de fago. Em verde – codon das cisteínas presente nas bibliotecas cíclicas (CX₁₀C). Em vermelho – inserto codificante de um peptídeo de 10 resíduos de aminoácidos. Em marrom – peptídeo apresentado na pIII do fago flanqueado pelas cisteínas (cinza).

4.3.9. Análise dos peptídeos selecionados em banco de dados

A identificação de auto-antígenos cardíacos provavelmente reconhecidos pelo RCT e outros ligantes de linfócitos T que poderiam apresentar homologia com antígenos estreptocócicos e identificar moléculas imuno-ativas com papel funcional na patogênese da DRC, envolveu a análise dos peptídeos identificados nas colônias isoladas e seqüenciadas por duas abordagens: **1.** busca de homologia com proteínas cardíacas e/ou estreptocócicas e **2.** busca de homologia com proteínas solúveis capazes de modular a atividade dos linfócitos T, como por exemplo, citocinas.

Os fagos ligantes dos linfócitos T isolados das linhagens Lu10.1, Lu 3.1, e do clone Lu 3.1.17 selecionados durante o *biopanning* foram então analisados com relação a diversos critérios: distribuição, repetição de motivos de aminoácidos e similaridade entre si e com proteínas conhecidas e já descritas em banco de dados eletrônicos.

Numa primeira etapa, realizamos o alinhamento das sequências em busca de peptídeos homólogos, não idênticos, mas com características químicas semelhantes como carga e função. Alinhamos todas as sequências obtidas em um (1) *biopanning* entre si e posteriormente todas as sequências obtidas nos três (3) *biopannings* visando estabelecer marcadores comuns aos linfócitos T infiltrantes do tecido cardíaco e conseqüentemente a DRC. Esta análise foi realizada no programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Outra análise importante foi a distribuição de tri-ou tetrapeptídeos dentro da população dos peptídeos identificados utilizando o programa SAS. Baseado na sequência primária, este programa efetua o agrupamento de 3 (tri) e/ou 4 (tetra) aminoácidos que estejam posicionados sequencialmente dentro de uma sequência peptídica. A comparação da distribuição de tri- ou tetrapeptídeos obtidos no *biopanning* pode fornecer informações com relação à distribuição e enriquecimento dos peptídeos, auxiliando na seleção dos melhores candidatos (ARAP W et al., 2001). No presente estudo, esta análise visou identificar motivos (peptídeos ligantes) comuns às três populações celulares estudadas e conseqüentemente identificar epitopos de

tri ou tetrapeptídeos contidos em antígenos comuns, reconhecidos por RCT presentes nas três populações de linfócitos T empregadas no *biopanning*. A biblioteca CX₁₀C empregada neste trabalho, onde o inserto é constituído de 10 resíduos de aminoácidos, contém 8 tripeptídeos e 7 tetrapeptídeos. A Figura 9 mostra o procedimento destas análises.

Figura 9. Análise da frequência de tripeptídeos dentro de um peptídeo de 10 resíduos de aminoácidos, recuperado da biblioteca CX₁₀C. Análise feita pelo programa SAS. C – corresponde a resíduo de cisteína flanqueando o peptídeo. X – corresponde a qualquer resíduo de aminoácido. Análise similar foi feita para determinar frequência de tetrapeptídeos.

Após triagem e seleção dos melhores candidatos, em uma última etapa, comparamos as sequências peptídicas com proteínas já identificadas e contidas em bancos de dados eletrônicos. Para esta análise empregamos o programa BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) de acesso pela Internet, o qual possibilita que pequenos fragmentos peptídicos sejam comparados com proteínas. Uma vez fornecida a sequência do peptídeo de interesse, a análise pode ainda ser restringida em relação à espécie de interesse e utilizando palavras chaves. O programa retorna valores do “score”, ou seja, valores que expressam a similaridade (homologia) entre a sequência do peptídeo fornecido e a do fragmento da proteína onde o peptídeo se alinhou. Sabe-se que a homologia de sequência e a homologia conformacional entre peptídeos permite que estes compartilhem propriedades similares para efeito de reconhecimento antigênico.

Neste estudo a análise empregando o programa BLASTp foi realizada em 3 etapas. Primeiramente buscamos homologia com proteínas cardíacas humanas. Para essa análise utilizamos palavras-chaves como “coração, miosina, vimentina, actina, proteína de choque térmico (HSP), músculo”. A

escolha destas palavras-chaves foi baseada em dados da literatura que mostram o papel dessas proteínas na auto-imunidade da FR (CUNNINGHAM MW et al. 1989, 1992, 1997; GUILHERME L et al., 1995) e através da identificação por PM e pl de proteínas valvares feita por nosso grupo (da Silva, DD, Tese de Mestrado pelo Depto. de Imunologia, ICB, USP, *“Caracterização do(s) antígeno(s) do tecido cardíaco com reatividade cruzada com a proteína M do estreptococo”* – orientadora Profª Dra. Luiza Guilherme Guglielmi).

Numa segunda etapa, a análise foi realizada em busca de proteínas estreptocócicas, especialmente a proteína M, que pudessem estar envolvidas no reconhecimento cruzado pelos linfócitos T infiltrantes. Finalmente, a terceira abordagem visou a identificação de peptídeos solúveis que pudessem desempenhar um papel na patogênese da DRC e desta forma os respectivos receptores apresentariam uma expressão aumentada nos linfócitos T infiltrantes dos pacientes com DRC. Para isso, rastreamos o banco de dados utilizando palavras-chaves como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.

No caso de peptídeos miméticos a proteínas solúveis como citocinas, podemos ainda determinar a interação do peptídeo (apresentado pelo fago) e o respectivo receptor caso a estrutura deste esteja disponível em banco de dados como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e/ou <http://www.pdb.org>. Como a estrutura do receptor é determinada por cristalização com ligantes, o programa fornece a imagem do complexo e desta forma podemos localizar a seqüência peptídica no ligante.

4.3.10. Preparação em larga escala dos fagos

Após a busca de ligantes solúveis a outros receptores de superfície dos linfócitos T que não o RCT, como receptores de citocinas, e posterior confirmação da interação peptídeo:receptor no programa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, os clones de fagos selecionados foram preparados em larga escala para serem validados posteriormente através de

ensaio de ligação *in vitro* aos respectivos receptores caso estejam comercialmente disponíveis.

Este procedimento se assemelha com o crescimento dos fagos recuperados no processo de *biopanning*, mas como o próprio nome diz, neste caso é em grande escala. Primeiramente, recomenda-se repetir o sequenciamento do clone de fago (armazenado à -20°C em 1xPBS nas placas de 96 orifícios) de modo a confirmar a sequência do inserto.

O processo iniciou-se com a cultura da bactéria *E.coli* K91kan como descrito anteriormente. Apenas 1µl do clone selecionado foi suficiente para a infecção. A bactéria uma vez infectada foi cultivada em 150ml de meio LB/Tet (concentração final 20 µg/ml) por 16-18 horas. Passado esse tempo, a cultura foi centrifugada em garrafas Sorvall de 250ml à 4°C, 6000xg por 10 minutos e o *pellet* de bactéria formado desprezado. Ao sobrenadante, contendo os fagos secretados, foi adicionado PEG/NaCl (15% v:v) para precipitação dos fagos por um período de 4 horas em gelo. Esse processo de precipitação foi repetido, por períodos mais curtos, de modo a aumentar a pureza dos fagos. Ao final, o *pellet* de fagos foi ressuspendido em 300µl de 1xPBS estéril.

4.4. Ensaios de validação biológica para fagos com homologia com proteínas cardíacas e proteína M do estreptococo e ligante do receptor da IL-1

4.4.1. Ensaio de Proliferação celular antígeno específico

Em placas de cultura de 96 orifícios com fundo em U, foram colocados 3×10^4 clones de linfócitos T / orifício, em presença de células apresentadoras de antígeno alogênicas, HLA-DR compatíveis, na concentração de 10^5 células / orifício que foram irradiadas previamente a 5000 rads.

Os peptídeos da proteína M5 foram adicionados em triplicatas nas concentrações de 0,5 e 10 µg/ml. Para as frações do tecido cardíaco identificadas por PM e pl adicionaram-se 50µl/orifício, conforme

padronizações prévias (GUILHERME L, 1992 & DIEFENBACH DA SILVA, 2001). O controle negativo para os peptídeos foi composto da suspensão de linfócitos T adicionados de células apresentadoras de antígeno em meio completo. Já para as frações do tecido cardíaco foi utilizado como controle negativo 50 μ l de uma suspensão contendo apenas partículas de nitrocelulose que foram preparadas da mesma forma que os antígenos cardíacos. O controle positivo do teste foi composto da suspensão de linfócitos T, células apresentadoras de antígeno e PHA-P (5 μ g/ml). Após 72 horas de incubação das placas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C, as células foram pulsadas com timidina triciada (0,5 μ Ci/orifício) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Inglaterra). Dezoito horas depois foi realizada a contagem de incorporação de timidina através do método de cintilação líquida para radiação β , usando contador Beta de radiação (Beta-Plate 1205-LKB). A partir da relação entre a média das triplicatas em cpm (contagens por minuto) de uma dada condição pela média do controle negativo calculou-se o valor do índice de estimulação (IE). Foram consideradas positivas as proliferações que apresentaram valores de IE $\geq$ 2,5.

Os clones de linfócitos T foram também testados em ensaio de proliferação celular frente a peptídeos da cadeia pesada da miosina cardíaca humana que foram gentilmente cedidos pela Dra. Madeleine W. Cunningham da Universidade de Oklahoma, Oklahoma City, USA. A seqüência destes peptídeos está descrita na Tabela 6 e os mesmos foram utilizados na concentração de 3 μ M para os ensaios de proliferação celular. A escolha destes peptídeos foi baseada em dados da literatura que mostram, tanto em modelo animal como em pacientes com FRA, reatividade cruzada humoral e celular entre peptídeos da proteína M do estreptococo e regiões da miosina cardíaca humana – cadeia pesada (CUNNINGHAM MW, 1992, 1997; DALE, 1985a, b; MERTENS, 2000). Estes peptídeos estão localizados na região caudal da miosina, em um fragmento proteolítico denominado LMM (do inglês, “light meromyosin”).

Tabela 6. Sequências de peptídeos da cadeia pesada da miosina cardíaca humana.

Identificação	Sequência de aminoácidos	Localização dos resíduos
LMM18	EQLGSSGKTIHELEKVRKQ	1515-1533
LMM19	KVRKQLEAEKMELQSALE	1529-1546
LMM20	LQSALEEAEASLEHEEGKI	1541-1559
LMM21	EEGKILRAQLEFNQIKAE	1555-1572
LMM22	NQIKAEIERKLAEKDEEME	1567-1585
LMM23	DEEMEQAKRNHLRVVDSL	1581-1598
LMM24	VVDSLQTS LDAETRSRNE	1595-1612
LMM25	RSRNEALRVKKKMEGDLN	1608-1625
LMM26	EGDLNEMEIQLSHANRMA	1621-1638
LMM27	ANRMAAEAQKQVKS LQSL	1633-1650
LMM28	SLQSLLKDTQIQLDDAVR	1647-1664
LMM28B	DDAVRANDDLKENIAIVE	1660-1677
LMM29	RANDDLKENIAIVERRNN	1663-1680
LMM30	IAIVERRNNLLQAELEEL	1672-1689
LMM31	ELEELRAVVEQTERSRL	1685-1702
LMM32	RSRKLAEQELIETSERVQ	1699-1716
LMM33	SERVQLLSQNTSLINQK	1711-1728
LMM34	LINQKKKMDADLSQLQTE	1724-1741
LMM35	TEVEEAVQESRNAEEKAKK	1741-1759
LMM36	TIKDLQHRLDEAEQIALK	1751-1768
LMM37	AAMMAEELKKEQD TSAHL	1763-1780
LMM38	TSAHLERMKKNMEQTIKDL	1777-1795
LMM39	TIKDLQHRLDEAEQIALK	1791-1808
LMM40	EQIALKGGKKQLQKLEARV	1803-1821
LMM41	LEARVRELENELEAEQKR	1817-1834
LMM42	AEQKRNAESVKGMRKSER	1830-1847
LMM43	RKSERRIKELTYQTEEDR	1842-1859
LMM44	TEEDRKNLLRLQDLVDKL	1856-1872
LMM45	LVDKLQLKV KAYKRQAEE	1868-1885
LMM46	RQAEEAEEQANTNLSKFR	1881-1898
LMM47	LSKFRKVQHELDEAEERA	1894-1911
LMM48	AEERADIAESQVNKLRAK	1908-1925
LMM49	KLRAKSRDIGTKGLNEE	1920-1936

4.4.1.1. Obtenção de células apresentadoras de antígenos (APC)

Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais, HLA-DR compatível com os pacientes, foram utilizadas como apresentadoras de antígenos. Foram obtidas através de separação por gradiente em solução de Ficoll-Hypaque ($d = 1.077$) (BOYUM, 1974). As amostras de sangue foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente Ficoll-Hypaque. Primeiramente 3ml do gradiente “Ficoll-Hypaque” foi adicionado em tubos de 15ml, seguido da adição de 10ml da amostra de sangue, a qual foi cuidadosamente adicionada, favorecendo assim a formação da “núvem” celular na interface do sangue com o “ficoll-hypaque”.

Após centrifugação a 600g por 25 minutos, a nuvem de células mononucleares foi retirada e lavada em solução salina duas vezes com centrifugações de 400xg por 8 minutos e por último, para retirada de plaquetas, as células foram centrifugadas a 300xg por 8 minutos. As células foram então ressuspensas em meio DMEM completo e a concentração celular determinada por contagem em hemocítmetro. Posteriormente, as células foram irradiadas a 5000 rads.

4.4.2. Ensaio de ligação *in vitro*

Uma possibilidade para validar a interação entre peptídeos semelhantes a proteínas solúveis e seus receptores é através de ensaio de ligação *in vitro* dos fagos previamente produzidos em larga escala, e os respectivos receptores disponíveis comercialmente. No presente estudo, analisamos a capacidade de ligação do fago masa-45 no receptor solúvel da IL-1.

O receptor da IL-1 ($1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ PBS) foi imobilizado em placa de 96 orifícios de fundo chato a 4°C por 16-18 horas e PBS-3% BSA, como controle da especificidade da ligação peptídeo / receptor. Duas lavagens com PBS foram efetuadas, visando a remoção do excesso de receptor (estima-se que apenas 100ng é adsorvido à placa). O bloqueio com 200 μl PBS-3% BSA foi por 1-2 horas à temperatura ambiente. Durante esse

período, iniciou-se a cultura da bactéria *E.coli* K91 kan em 7ml de meio TB-suplemento, acrescido de 50µg/ml de kanamicina. O crescimento bacteriano foi monitorado de modo a utilizar a bactéria na fase *log* de crescimento, ou seja, fase em que a bactéria expressa o F-pili necessário para infecção.

Em seqüência, 1×10^9 TU do clone de fago expressando o peptídeo de interesse, bem como do fago selvagem controle Fd-tet (sem inserto de peptídeo exógeno) foram adicionados num volume final de 50µl PBS-1,5% BSA e incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

O título do fago masa-45 foi obtido após sucessivas infecções bacterianas de modo a obter um número mais preciso de partículas virais infectantes. Os orifícios foram lavados 9 vezes com PBS e os fagos ligados aos receptores imobilizados foram então recuperados por infecção com 100µl de *E.coli* K91 kan. Após o período de infecção de aproximadamente 20 minutos, a bactéria foi homogeneizada nos orifícios e 90µl foi removida para prosseguir com diluições em meio LB. Diluições seriadas foram então plaqueadas em meio LB-ágar-tetraciclina (40µg/ml), as placas incubadas por 16-18 horas em estufa a 37°C e o número de fagos aderidos à cada orifício pode ser quantificado por contagem de colônias (TU). Para ligações específicas do fago/receptor, esperamos obter maior número de colônias nos orifícios onde os clones de fagos candidatos foram adicionados aos receptores em comparação com os orifícios controle, ou seja, tanto com adsorção de PBS-3%BSA quanto com adição do fago Fd-tet no receptor imobilizado.

5. Resultados

5.1 Ligantes do receptor da célula T (RCT)

5.1.1. Repertório de linfócitos T componentes das linhagens intralesionais Lu 3.1 e Lu 10.1

A definição da frequência e da oligoclonalidade das subpopulações de linfócitos componentes das linhagens intralesionais estudadas (Lu 3.1 e 10.1) foram avaliadas pela análise das famílias $V\beta J\beta$ em trabalhos anteriores (GUILHERME L et al., 2000) pela metodologia do “Immunoscope”. Estas análises nos auxiliaram na interpretação dos resultados das seqüências de peptídeos obtidas nos clones de fagos após o *biopanning* na busca de auto-antígenos ligantes do RCT expressos pelos linfócitos T representados nestas linhagens infiltrantes.

5.1.1.1. Linhagem de linfócitos T intralesional Lu 3.1

De forma resumida, os resultados obtidos da linhagem infiltrante de valva mitral Lu 3.1 proveniente do paciente SLA, mostrou que as 24 famílias $V\beta$ estavam representadas no tecido cardíaco e que 10 $V\beta$ famílias apresentavam expansões oligoclonais. A análise das subfamílias $J\beta$ mostrou o uso de vários segmentos $J\beta$. Estes dados são ilustrativos da diversidade de populações componentes da linhagem Lu 3.1. Foram importantes para o auxílio na interpretação da diversidade das proteínas candidatas selecionadas pelas seqüências dos fagos ligantes do RCT obtidos pela metodologia do *Phage Display* e definição dos auto-antígenos provavelmente envolvidos na reação auto-imune da DRC.

Dentre as populações linfocitárias encontradas na linhagem Lu 3.1, selecionamos um clone (Lu 3.1.17) pertencente à família oligoclonal $V\beta 5J\beta 2S7$ e $V\alpha 1J\alpha 32$, para a análise pela metodologia do *Phage Display*, por reconhecer de forma cruzada um peptídeo derivado da proteína M5, resíduos de 163-177, peptídeo da cadeia pesada da miosina cardíaca, LMM25, resíduos 1607-1634, uma proteína derivada do tecido valvular de

56-59 kDa / pI 7,76 não identificada, representando assim um protótipo do modelo de reconhecimento cruzado.

5.1.1.2. Linhagem de linfócitos T intralesional Lu 10.1

Diferentemente da linhagem intralesional Lu 3.1, na linhagem Lu 10.1 detectamos menor número de famílias V β , apenas 12 das 24 famílias metade com frequência superior a 5% e as demais com frequência muito baixas (< 1%). As 6 famílias com frequência >5 % (V β 2, V β 3, V β 6, V β 17, V β 18 e V β 20) apresentavam expansão oligoclonal analisadas pela metodologia do Immunoscope (FAÉ K et al., 2004). No presente trabalho, a análise por PCR de 3 das 6 famílias V β da linhagem Lu 10.1, mostrou a presença de várias subfamílias J β indicando a presença de vários clones decorrentes da combinação das famílias V β e J β do RCT (Tabela 7).

Tabela 7. Análise das famílias J β do RCT de 3 famílias V β componentes da linhagem de linfócito T intralesional Lu 10.1

Linhagem	Família V β	Famílias J β												
		1S1	1S2	1S3	1S4	1S5	1S6	2S1	2S2	2S3	2S4	2S5	2S6	2S7
Lu 10.1	V β 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	V β 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	V β 17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

A determinação das famílias J β do RCT na linhagem intralesional Lu 10.1 foi realizada através de uma reação de PCR utilizando “primers” específicos para cada uma das famílias J β . + reação de PCR positiva para a família J β específica; - reação de PCR negativa.

5.2. Análise das Seqüências

Após padronização do *biopanning* utilizando a biblioteca peptídica de *phage display* CX₁₀C e linfócitos T infiltrantes do tecido cardíaco de pacientes com DRC empregando a metodologia BRASIL, 3 ciclos de seleção envolvendo “pré-clearing”/*panning* foram realizados com cada uma das três populações linfocitárias. Ao final do terceiro ciclo, 96 colônias isoladas, cada uma infectada por um único clone de fago foram selecionadas

aleatoriamente das placas de ágar seletivo e o DNA do fago foi amplificado por PCR para seqüenciamento.

Noventa e seis colônias de cada *biopanning* foram submetidas ao seqüenciamento, total 288 reações, no entanto, só foi possível obter seqüências de 209 colônias (Tabela 8). Essa diferença observada entre o número de seqüências obtidas nos *biopannings* empregando diferentes populações celulares é reflexo de problemas com as reações de sequenciamento, resultando em seqüências com um elevado número de “N” (aminoácido não-definido), o que impossibilita que as mesmas sejam traduzidas para proteínas.

Tabela 8. Número de seqüências obtidas de cada 96 colônias isoladas após o *biopanning*.

Paciente	Linhagem	Clone	Colônias seqüenciadas	Seqüências obtidas
SLA	Lu 3.1		96	64
		Lu 3.1.17	96	87
MASA	Lu 10.1		96	58
Total			288	209

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI Prism™ DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Considerando a primeira abordagem, a análise utilizando o programa BLASTp em busca da identificação de antígenos cardíacos, foi realizado empregando palavras-chaves como miosina, laminina, vimentina, coração, proteínas *coiled-coil*. Na busca de auto-antígenos de reação cruzada, usou-se o banco de dados para proteínas do *Streptococcus pyogenes*.

5.2.1. Linhagem intralesional Lu 3.1

A análise dos 64 clones de fagos mostrou que 48/64 (75 %) dos clones de fagos apresentaram epitopos com homologia com precursores da miosina, miosina-“like” ou miosina cardíaca humana. Dentre os clones de fago com homologia com a miosina cardíaca 6/64 (9,4%), dois apresentaram homologia com a cadeia pesada beta, apenas um com a cadeia leve e os demais com isoformas da miosina cardíaca (Tabela 9). Os resíduos idênticos variaram de 7 a no mínimo 4 aminoácidos. Além da miosina cardíaca, 37/64 (58%) dos fagos também apresentaram homologia com alguma isoforma da laminina (Tabela 10).

Tabela 9. Fagos recuperados no biopanning com a linhagem Lu 3.1-SLA com homologia com a miosina cardíaca.

Miosina Cardíaca							
Fago	Sequência do peptídeo Fago	Sequência da proteína	Cadeia Pesada				
			alfa	beta	leve	outras *	IX**
sla-52	SPTLYKARLR	L-KAKLR					
		S-SL-KAKLR					
		YKARL					
sla-75	KVGNDHMTRT	KVGNEYVT					
sla-92	KARMLTTEQM	MLTT-----DQM					
		ML-EQM					
sla-5	VSEPDLDHQ	ELADH					
sla-44	SSAAMNTQTE	SSAALN					
sla-47	SIGGSHTFAR	VGGS-TF-AR					

(*) isoforma da miosina cardíaca associada com a modulação da contração muscular; (**) miosina associada com sinalização da célula muscular. Em vermelho, resíduos de aminoácidos da sequência da miosina com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Dos 25% fagos (16/64) que não apresentaram homologia com miosina, 8 apresentam homologia com a laminina e três com Hsp 70.

Tabela 10. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 3.1-SLA com homologia com a laminina.

Fago	Sequência fago	Sequência proteina	Isoforma Laminina
sla-3	FLTNGDSRQG	GDS-QGC / YLT--DS NG SRQ	laminina alfa 3 laminina gama 2
sla-4	KSQLMAPGFY	APGFY CK-----PGFY PGFY QLMA GFYC QL-SPG	laminina alfa 5 precursor da laminina alfa 1 precursor da laminina alfa 1, 2 ; gama 1, 3 precursor da laminina alfa 1, beta 4 precursor da laminina gama 1 precursor da laminina gama 3
sla-5	VSEPDLDHQ	EP-L-DH	precursor laminina beta 1
sla-13	RNQSRLTDQ	RNQSD / QS---DQLT-QC RL--QC / ER-TD	laminina beta 4
sla-15	VRQYQGSEFT	RQHOGAE CIR-YQ / YQ--DF	laminina alfa 5 precursor laminina alfa 1
sla-17	WYGGTAAKEQ	YGGTA	laminina alfa 3, 4
sla-18	SKMGSGIGHN	IG-NC / GHNC	precursor laminina beta 1
sla-23	KAHIPQESVG	CK-H-PQ-SVG IPQE / PQ-SV	laminina beta 4 precursor laminina gama-3
sla-25	NPEGVGVPVAG	CNP-G--PV-GC / EGVG NPEG GPVAG / C-PE--GP CN-EGV / C-PE / PVAG CDPE-GV	laminina gama 2 laminina gama 2, alfa 5 laminina alfa 5 laminina alfa 3 precursor laminina gama 1
sla-26	TFVTNGTGQK	TGEKC	precursor laminina alfa 1
sla-28	PNAVSAWQSH	NA---WQ-H	precursor laminina alfa5
sla-32	TVGGRDSSLP	RD--LPC TV-GRES	laminina gama 2 precursor laminina alfa 1
sla-34	QDTGLDHYP	LDHY	laminina beta 1
sla-35	NPVWGDNSHY	CNPV NSHF	precursor laminina alfa 1, beta 1, gama 1 precursor laminina alfa 1
sla-36	GNTSHRGFTS	H-GF-SC / CGNT	precursor laminina beta 1
sla-40	LRTTQNSKTL	LRTTRDS	laminina alfa 5
sla-41	QERHGVLGKR	GV-GKRC / CE-RH GVVGRRC / GVLG / R-GV-G-RC / GRRC CQ---GV-GKRC / V-GQRC CRE--GV-GQRC / GKRC	precursor laminina alfa 1 laminina beta 2 precursor laminina alfa 2 laminina beta 4
sla-43	MTLLSPAGTH	LT--GTHC / AG-HC / LLSP SPAG SPAGT / GTHC / AG-HC / MSPAG	precursor laminina gama 3 precursor laminina gama 3, alfa 5 precursor laminina alfa 5
sla-44	SSAAMNTQTE	CA-AAMD---EC	precursor laminina gama 1
sla-45	NVGSTNQILT	CN---VGSTH DQILT	precursor laminina alfa 1 laminina alfa 3
sla-47	SIGGSHTFAR	SIGG-----RC	laminina alfa 5
sla-52	SPTLYKARLR	LF-ARLR	laminina alfa 5
sla-56	HGTRQEVSTH	T-QEVS TRQE / RQEV / EV--HC	laminina 5 beta 3 laminina alfa 5
sla-57	YVCVHSGSGSCI	VHSGC-AC-C / GS-IC C-VC--GS-----C-SC-C	laminina alfa 3
sla-60	GYDVLSPSHQ	LSPSH / Y-VL-PS / LSPS	laminina alfa 5
sla-63	LAANSHIRSV	LASNAHI / IRSV / AA--NV--VC NSHI / AANS	precursor laminina alfa 1 laminina cadeia M (merosina), laminina alfa 2
sla-72	TSWDASHSGH	HSGHC / DA-HS / SG-C / HS-HC	laminina alfa 5
sla-75	KVGNDHMTRT	DHMSR	laminina alfa 3
sla-78	RDQGTDPNGL	CRDQ	laminina alfa 3
sla-81	GLKGLGREC	GSL--EC	laminina beta 2
sla-82	SRGSWTRSPA	CSRG-W CSRGS	laminina cadeia M (merosina), laminina alfa 2 laminina beta 2
sla-83	QFDGAYSQPK	C-FD-----GAY C---GAYS / C-FD QFDG	laminina 5 laminina beta 4 laminina cadeia M (merosina), laminina alfa 2
sla-85	SRMDRLFTEL	MDRL	precursor laminina gama 1
sla-86	RTDQMKLDTS	CRTDE	precursor laminina beta 1
sla-91	GHIRQLSPEQ	PEQC / LSPE SPDQC	precursor laminina alfa 1 laminina beta 2

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

[illegible]

Quatro destes fagos (sla-5, sla-44, sla-52,) apresentaram homologia também com a miosina cardíaca ligadora da proteína C e o fago sla-92 com a cadeia leve da miosina ventricular (Tabela 9).

O receptor de IgA (R-IgA) é um componente extracelular do *S.pyogenes* que se liga fortemente a IgA, fracamente a IgG, mas não se liga ao fibrinogênio. Apresenta capacidade antifagocítica (HUSMAN LK et al., 1995), bem como elevada homologia de sequência com a proteína M (FRITHZ E et al., 1989).

Concordando com os dados apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11, observamos que clones de linfócitos T derivados da linhagem Lu 3.1 apresentaram resposta proliferativa frente a diferentes peptídeos da cadeia pesada da miosina cardíaca humana (LMM-light meromyosin) (Figura 10) e peptídeos da proteína M do *S. Pyogenes*. Esta observação apoia o mecanismo de mimetismo molecular entre miosina cardíaca e a proteína M como fator desencadeante na DRC. O fato dos clones de linfócitos T estarem reconhecendo vários peptídeos da miosina, cuja a expressão é elevada no miocárdio, sugere o envolvimento do mecanismo de espalhamento de epitopos, onde outros epitopos T (diferente dos que induziram a doença) passam a ser reconhecidos com o desenvolvimento da resposta imune.

Figura 10. Peptídeos da cadeia pesada da miosina reconhecidos por clones de linfócitos T derivados da linhagem intralesional Lu 3.1.

	1	7	10	12	14	15	17	19	22	24	25	26	28	31	32	34	35	37	39	41	42	44	45	46	49
3.1.3																									
3.1.7																									
3.1.8																									
3.1.9																									
3.1.12																									
3.1.13																									
3.1.17																									
3.1.21																									
3.1.79																									

Proliferação celular, IE > 2,5.

4.2.2. Clone linfócito T Intralesional Lu 3.1.17

A análise das 87 seqüências peptídicas geradas a partir do *biopanning* com o clone de linfócito T intralesional Lu 3.1.17, derivado da linhagem SLA Lu 3.1, mostrou que 16 dos fagos recuperados (18,4%) mostraram homologia com a miosina cardíaca, principalmente com as cadeias pesadas alfa e beta (Tabela 12). Além da miosina cardíaca, várias isoformas da miosina com distribuição e funções diversas apresentaram homologia com outros fagos recuperados no biopanning com o clone de linfócito T Lu 3.1.17. Outras proteínas como laminina (clo a3) e queratina (clo a4) também apresentaram alguma homologia. A Tabela 13 mostra que 13% (11/87) dos fagos também apresentam homologia à alguma das 12 cadeias que formam as diferentes isoformas da laminina.

Tabela 12. Fagos recuperados no *biopanning* com o clone de linfócitos T Lu 3.1.17 com homologia com a miosina cardíaca.

Fago	Sequência do peptídeo Fago	Sequência da proteína	Miosina Cardíaca				
			Cadeia Pesada		leve	outras *	IX**
			alfa	beta			
clo-a11	LGTEEASTYR	GTEEA-S-Y					
clo-b7	DDQAHEHRNT	EDQ-NEHR					
clo-b8, b10	VRGVPEYAE	PYDYA					
clo-e4	NVSVHSQVTS	VAV - HSQV					
clo-e5	RTLASVHDAS	RTL SV-DA					
clo-e6	FHYRDKVKLH	HY-KVK					
clo-f2	SNWGRAQRE	QGRE					
clo-f5	TLVQLESKLT	IQLEAK VQLE-K QLE-KL QLQ-KL					
clo-f7	NVAILDSVSL	NVSIL-S					
clo-g6	SSTTPRQDPW	PRQEP S-TTPR					
clo-g7	WRCVQNGVEC	VQ--VDC					
clo-g9	KWVPMYHDDH	KWLPVY					
clo-g10	PRMMGMSSGW	LMGVSSG					
clo-h6	EAEAKWYEV	E-KWY---EIR DAE-KW					
clo-h12	TTERVHHDSY	TSERV					

(*) isoforma da miosina cardíaca associada com a modulação da contração muscular e/ou miosina-like expressa no coração; (**) miosina associada com sinalização da célula muscular. Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Tabela 13. Fagos recuperados no *biopanning* com o clone de linfócitos T Lu 3.1.17 com homologia com a laminina

Fago	Sequência fago	Sequencia proteína	Isoforma Laminina
clo-a1	PASTTRLNGT	NGTC	precursor da laminin gama 3
clo-e8 & clo-f1	PHSQNSADVI	HS--QN--SSDVIC	laminina beta 4
clo-e9	PSKNIRGNTA	NIR-N	precursor da laminina gama 2
clo-f2	SNWGRAQQRE	W-RAEQRD	precursor da laminina gama 1
clo-f7	NVAILDSVSL	LDSVS	precursor da laminina gama 2
clo-g5	LWSAHQFDSR	WS-----FDS	laminina alfa 4
clo-g6	SSTTPRQDPW	SS---RQDP	laminina alfa 4
clo-g7	WRCVQNGVEC	CVQ-GV	precursor da laminina gama 1
clo-g10	PRMMGMSSGW	MM-GMAS	precursor da laminina gama 1
clo-g11	TGDPNMFATR	GDPNL	precursor laminina alfa 5
clo-e8	PHSQNSADVI	QDSADII	precursor colágeno tipo VI
clo-h4	NRFLDPNQSW	DPNQ	cadeia 3 colágeno tipo V

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Muitos fagos também apresentaram homologia com a proteína M de diversas cepas do *S. pyogenes*, das quais 15 foram identificadas (Tabela 14).

Tabela 14. Fagos recuperados no biopanning com o clone Lu 3.1.17 com homologia com a proteína M.

clone Lu 3.1.17																
Fago	CEPAS															
	M	1	3	5	12	15	18	22	24	26	28	48	60	63	71	72
clo a1																
clo a2																
clo a5																
clo a7																
clo a8																
clo a9																
clo a10																
clo a11																
clo b1																
clo b2																
clo b6																
clo b7																
clo b8																
clo b9																
clo b10																
clo b12																
clo c1																
clo c4																
clo c6																
clo c8																
clo c9																
clo c10																
clo c12																
clo d1																
clo d3																
clo d4																
clo d5																
clo d6																
clo d7																
clo d8																
clo d9																
clo d10																
clo d11																
clo e1																
clo e2																
clo e3																
clo e4																
clo e5																
clo e6																

Os retângulos em cinza correspondem a proteínas M, cuja cepa não foi especificada no banco de dados.

O alinhamento das seqüências peptídicas dos 87 fagos obtidos no *biopanning* com o clone intralesional Lu 3.1.17, com os peptídeos LMM25(1608-1625) e o peptídeo M5(163-177) utilizando o programa ClustalW, mostrou que o fago **clo-a4** alinhava-se significativamente com os dois peptídeos acima citados. A Figura 11 mostra o alinhamento do fago clo-a4 com o peptídeo da miosina cardíaca LMM 25(1608-1625), bem como com o peptídeo M5 (163-177). Também alinhamos as regiões da queratina 19 e proteína M29 com as quais o fago clo-a4 mostrou homologia.

M29 (95-100)	KVLKNRINSYLLRDKVVK--- 18
Queratina 19 (133-138)	---ED-----LRDKILGV-- 10
fago clo-a4	--CRDP----GLRDKMLC--- 12
LMM25(1607-1624)	-RSRNE--ALRVKKKMEGDLN 18
M5(163-177)	-ETIGT-----LKKILDETVK 15

Figura 11. Alinhamento do fago clo-a4 com os peptídeos da porção N-terminal da proteína M5, cadeia pesada da miosina cardíaca e fragmentos da proteína M29 e queratina19. O alinhamento mostra resíduos de aminoácidos comuns como a leucina, valina ou outro aminoácido hidrofóbico, bem como da lisina, o que pode sugerir a participação destes resíduos de aminoácidos com o RCT do clone Lu 3.1.17. Utilização do programa ClustalW.

O sequenciamento da região do CDR3 do clone Lu 3.1.17 revelou que este é composto de 8 resíduos de aminoácidos na cadeia beta, V β 5J β S7 (SPGSHEQY) e 11 resíduos de aminoácidos na cadeia alfa, V α 1J α 32 (VIYGGATNKLI). Ambos CDRs compartilham o aminoácido glicina (G) na região central do CDR3, o qual pode estar envolvido com a flexibilidade e conformação do CDR3 durante o reconhecimento antigênico, como já demonstrado anteriormente por ABERGEL C et al. em 1991.

Os peptídeos acima mostrados podem estar interagindo tanto com o CDR3 da cadeia alfa, como também com o CDR3 da cadeia beta. A

sequência do CDR3 da cadeia alfa ($V\alpha 1$) é constituída de um grande número de aminoácidos hidrofóbicos como a isoleucina (I), a leucina (L), a alanina (A) e valina (V) e existe, portanto, a possibilidade de que estes aminoácidos interajam com os aminoácidos hidrofóbicos compartilhados pelos diferentes peptídeos antigênicos reconhecidos pelo clone Lu 3.1.17 (Figura 11).

5.2.3. Linhagem intralesional Lu 10.1

A análise das sequências obtidas no *biopanning* com a linhagem Lu 10.1 mostrou que da mesma forma que a linhagem Lu 3.1, fagos apresentam homologia principalmente com as cadeias alfa e beta da miosina cardíaca 8/58 (14%) (Tabela 15).

Tabela 15. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 10.1 com homologia com a miosina cardíaca.

Fago	Sequência do peptídeo Fago	Sequência da proteína	Miosina Cardíaca			
			Cadeia Pesada		leve	outras *
			alfa	beta		
masa-19	RQGLDDLGT	Q-LDDL				
masa-26	LGMNGDISTE	DI-TEC MD-DLS				
masa-29	MPTERLGAYN	TERL				
masa-47	NDRLNRSKES	NRSKE				
masa-55	TGTMSDDPAY	LADD-AY				
masa-71	MRPDIRGTT	RPFDIR-TE RPFD				
masa-72	VSLDIKGNQQ	NIKG-QE				
masa-77	TANQLMGGRY	M-GRY				

(*) isoforma da miosina cardíaca associada com a modulação da contração muscular; Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Várias isoformas da miosina com distribuição e funções diversas também apresentaram homologia.

Da mesma forma, fagos provenientes da linhagem Lu 10.1 apresentaram seqüências com homologia com as proteínas cardíacas alfa 3 colágeno tipo IV (masa-15 e masa-17), desmulina (masa-1 e masa-81),

colágeno VI (masa-15, masa-33, masa-42 e masa-96) e colágeno XVIII (masa-17). Interessantemente, muitos fagos também mostraram homologia com a laminina, expressa na membrana basal do endotélio (Tabela 16).

Tabela 16. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 10.1 com homologia com a laminina.

Fago	Sequência fago	Sequência proteína	Isoforma Laminina
masa-5	SNSS ESGRTQ	GRTQC	precursor laminina alfa 5
masa-27	TVAANDMHRV	A-DMNR	laminina alfa 3, 4
masa-45	TPMEAGDPSY	PME-G	laminina alfa 3, 4
masa-49	RLVGWDNRMS	WD-RM-C	precursor laminina gama 3
masa-73	TGTTQINDTY	QIND	laminina alfa 3, 4
		TQIN	laminina gama 2
masa-75	MSRTDYGDAS	TDYG	laminina beta 4
masa-77	TANQLMGGRY	CTAD-LVG	precursor laminina alfa 5
		TADQLL	precursor laminina gama 1
masa-87	EGIVPTAGRS	T-GRNC	laminina beta 4

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Cinco fagos apresentaram homologia com proteínas estruturais do *S. pyogenes* (Tabela 17). Várias enzimas estreptocócicas também apresentaram homologia (dados não mostrados).

Tabela 17. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 10.1 com homologia com proteínas estruturais do *S. Pyogenes*.

Linhagem MASA	Proteínas estreptocócicas		
	M	M-like	R-Fibro
Fago			
masa-19			
masa-81		15	
masa-92	64		
masa-38			
masa-82			

R-Fibro – receptor de fibronectina

5.3. Análise comparativa dos fagos ligantes da miosina e da laminina: busca de sequências compartilhadas

Quatro fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 3.1 e 5 fagos com o clone Lu 3.1.17 mostraram homologia com a miosina e com a laminina. A análise comparativa mostrou a identidade de alguns resíduos de aminoácidos (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18. Análise comparativa dos fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 3.1 com homologia com a miosina cardíaca e laminina

Fago	Sequência fago	Miosina	Laminina
sla-5	VSEPDLDHQ	<u>E</u> LADH	EP-L-DH
sla-44	SSAAMNTQTE	SSAA <u>L</u> N	CA-AAMD---EC
sla-47	SIGGSHTFAR	V <u>GGS</u> -TF-AR	SIGG-----RC
sla-52	SPTLYKARLR	L-KAKLR	LF-ARLR

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Sublinhado, resíduos de aminoácidos compartilhados entre as sequências da miosina cardíaca e laminina.

Tabela 19. Análise comparativa dos fagos recuperados no *biopanning* com o clone Lu 3.1.17 com homologia com a miosina cardíaca e laminina

Fago	Sequência fago	Miosina	Laminina
clo-f2	SNWGRAQQRE	QQRE	W-RAEQRD
clo-f7	NVAILDSVSL	NV <u>SIL</u> -S	<u>LDSVS</u>
clo-g6	SSTTPRQDPW	<u>S</u> -TTPR / <u>PRQEP</u>	SS---RQDP
clo-g7	WRCVQNGVEC	<u>VQ</u> --VDC	CVQ-GV
clo-g10	PRMMGMSSGW	L <u>MGVSSG</u>	MM-GMAS

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Sublinhado, resíduos de aminoácidos compartilhados entre as sequências da miosina cardíaca e laminina.

A linhagem Lu 10.1 apresentou apenas um fago (masa-77) com homologia de sequência com a miosina e laminina, no entanto não houve compartilhamento de resíduos de aminoácidos entre as sequências selecionadas da miosina e laminina. (Tabelas 15 e 16).

5.4. Ligantes de outras moléculas expressas em linfócitos T intralesionais

Fagos recuperados no *biopanning* com as linhagens Lu 3.1 e Lu 10.1, e o clone Lu 3.1.17 apresentaram homologia com proteínas como integrinas.

Entre as 64 sequências de fagos recuperadas no *biopanning* com a linhagem Lu 3.1, 8 (13%) fagos apresentaram homologia com as integrinas descritas na Tabela 20. Algumas sequências foram compartilhadas por diversas integrinas, por exemplo, as identificadas com o fago sla-38.

Tabela 20. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 3.1 com homologia com integrina.

Fago	Sequência fago	Sequência proteína	Isoforma Integrina
sla-13	RNQSERLTDQ	ET ER LTD	precursor integrina alfa 3
sla-21	SSVVYGTLLS	SA-- YGT -LS	precursor integrina beta 4 (GP150) (CD104)
sla-26	TFVTNGTGQK	NGT GE -- KC	precursor integrina beta 1(VLA-4)
		FVTN	precursor integrina alfa 7
sla-32	TVGGRDSSLP	C-VG-R -- SLPC	precursor integrina alfa 1 (receptor de laminina e colágeno)
sla-33	RVNGDWPMMSM	RVDGD -P	precursor integrina beta 4 (GP150) (CD104)
		RVNG-W	precursor integrina alfa 3 (Galactoprotein B3) (VLA-3 alfa) (CD49c)
sla-36	GNTSHRGFTS	CGNT	precursor integrina beta 5
sla-38	LMDLSRNC	LMDLS	precursor integrina beta 1(VLA-4), 3 , 5, 7
		MDL-RN	precursor integrina alfa 6 (VLA-6) (CD49f)
sla-49	NSSAHYNSQD	SAHY-SQD	precursor integrina alfa 1 (receptor de laminina e colágeno)

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Oito fagos (9%) também foram observados para as sequências recuperadas no *biopanning* com o clone Lu 3.1.17 (Tabela 19).

Tabela 21. Fagos recuperados no *biopanning* com o clone Lu 3.1.17 com homologia com integrina.

Fago	Sequência fago	Sequência proteína	Isoforma Integrina
clo-e8	PHSQNSADVI	S-NSSNVI	precursor integrina beta 1
clo-f3	NSDGLAHSII	C-SEGI	precursor integrina beta 1
clo-f6	PIGPNMQDVG	CP-GPD	precursor integrina beta 1
clo-f9	VMYESRGVER	IM--SR--ERC	precursor integrina beta 4 (GP150) (CD104)
clo-f10	SVVYANGIIC	NGLIC	precursor integrina beta 1
clo-g9	KWVPMYHDDH	VP-YH	precursor integrina alfa 6 (VLA-6) (CD49f), 7
clo-h3	TTEANYTNKA	NYT--AC / CTSE-N-T	precursor integrina beta 1
clo-h5	DASGLVVQFD	D-SG-VVQ-DC	precursor integrina alfa 4

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Com a linhagem Lu 10.1, o número de fagos que apresentaram homologia com as integrinas foi mais elevado, quando comparado com a linhagem Lu 3.1 e o clone Lu 3.1.17 correspondendo a 22% (13/58) dos fagos recuperados (Tabela 20).

Tabela 22. Fagos recuperados no *biopanning* com a linhagem Lu 10.1 com homologia com laminina.

Fago	Sequência fago	Sequência proteína	Isoforma Integrina
masa-8	TDRNEAVYMA	TNR--AVYL	precursor integrina alfa 3 (Galactoprotein B3) (VLA-3 cadeia alfa) (CD49c)
masa-15	VDYVSRTMNK	EFVSRTL	precursor integrina beta 4 (GP150) (CD104)
masa-25a	VIDTGNGPTL	VINTGN	precursor integrina alfa 4
masa-34	KGAWRGKSYS	GA--WKG-SY	precursor integrina alfa 3 (Galactoprotein B3) (VLA-3 cadeia alfa) (CD49c)
masa-39	SYFGSSEAPM	SYFGAS	precursor integrina alfa 4
		YFGSA-A	precursor integrina alfa 3 (Galactoprotein B3) (VLA-3 cadeia alfa) (CD49c)
masa-64	GTNLGLVHAY	C-SNL-LVHA-FC	precursor integrina alfa 7
masa-71	MRPFDIRGTT	FEIR-T	precursor integrina alfa 4
masa-72	VSLDIKGNQQ	SLDM-GNQ	precursor integrina alfa 7
masa-82	KQSYSPTVNN	SYSPTV	precursor integrina alfa 7
masa-83	GMNSSGVLYS	MDSS-VL / MSSNGLL-S	precursor integrina beta 3
masa-86	WQYDAVNIAR	QY-AV-I-R	precursor integrina alfa 7
masa-90	TKVDEQSYPF	VDE--YP / EEE-YP	precursor integrina alfa 3 (Galactoprotein B3) (VLA-3 cadeia alfa) (CD49c)
masa-93	VQGTGASKMI	C-QGT-A	precursor integrina alfa 7

Em vermelho, resíduos de aminoácidos com identidade com a sequência do peptídeo do fago.

Além das integrinas, encontramos fagos com homologia com o receptor alfa do fator de crescimento de granulócitos (GM-CSF), e precursor da IL-7; fator de crescimento de monócitos (M-CSF) e moléculas transportadoras de cálcio (dados não mostrados).

Os fagos da linhagem Lu 10.1, masa-6, masa-45, e masa-86 apresentaram homologia com ligantes do receptor da IL-1.

O fago identificado como masa-45 mostrou homologia significativa ao antagonista do receptor de IL-1 humano (hIL-1Ra), ou seja, dentre os 12 resíduos de aminoácidos (incluindo as cisteínas flanqueando o peptídeo), 6 aminoácidos mostraram identidade com fragmento do IL-1Ra humano.

Iniciamos os ensaios de validação da interação específica do par peptídeo: receptor com ensaios de ligação *in vitro* (GIORDANO RJ et al., 2001; CARDÓ-VILA M et al., 2003) do fago masa-45 ao seu respectivo receptor solúvel IL-RI (rhIL-1 sRI).

O fago masa-45 ligou-se ao receptor de IL-1, de forma específica e com uma intensidade de quatro vezes em relação a soro albumina bovina (BSA) e também em relação ao fago controle Fd-Tet ligado ao receptor de IL-1 e BSA (Figura 12).

Figura 12. Ensaio de ligação *in vitro* do fago masa-45 e fago controle Fd-Tet no IL-1RI imobilizado. A especificidade da ligação do fago masa-45 é observada comparando com a ligação no BSA.

Através do programa Cn3D disponível gratuitamente na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Structure&tool=toolbar> tivemos acesso à estrutura tridimensional do IL-1RI complexado aos seus 3 ligantes naturais, ou seja, IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. Esta análise confirmou que a região da molécula do IL-1Ra em que o peptídeo masa-45 apresenta homologia, interage diretamente com os domínios 1 e 2 do IL-1RI (Figura 13).

Figura 13. Interação do peptídeo masa-45 com os domínios 1 e 2 do IL-1RI.

Em roxo (D1) – domínio 1; azul (D2)– domínio 2; marrom (D3)– domínio 3. Em verde – IL-1Ra. Em amarelo – fragmento do IL-1Ra, cujo peptídeo masa-45 apresenta homologia. Imagem obtida no banco de dados de proteínas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Structure&tool=toolbar>

Confirmamos a ligação específica do peptídeo masa-45 ao IL-1RI através de ensaios de ressonância magnética nuclear (RMN), realizados em colaboração com o Dr. Fábio Almeida da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A Figura 14 mostra que o peptídeo masa-45 sofreu alterações no deslocamento químico de quatro ressonâncias (círculos amarelos) quando na presença do receptor tipo I, mas não na presença do receptor tipo II, sugerindo que o peptídeo interage com IL-1 RI.

Figura 14. Interação do peptídeo masa-45 com IL-1RI humano. A. Peptídeo masa-45 na presença do receptor tipo I da IL-1 sofre alterações no deslocamento químico de 4 ressonâncias. **B.** Peptídeo masa-45 na presença do receptor tipo II da IL-1 não sofre deslocamento químico. Imagens obtidas de espectros de RMN.

6. Discussão

Este trabalho abordou a identificação de antígenos cardíacos usando a metodologia do *phage display* para identificação de peptídeos de proteínas com capacidade de se ligarem a receptores de superfície de linfócitos T infiltrantes das lesões cardíacas decorrente da febre reumática.

A busca de auto-antígenos de reação cruzada com o estreptococo em linhagens intralesionais pelo *Phage Display*, mostrou a complexidade das reações cruzadas que possam ocorrer e estarem implicadas com o desencadeamento de lesões no coração. As duas linhagens intralesionais estudadas apresentavam várias famílias de linfócitos T em expansão oligoclonal. Conforme, descrito anteriormente estas populações foram ativadas na periferia e posteriormente migraram para o tecido cardíaco (GUILHERME L et al., 2000, 2001; FAÉ K et al., 2004).

A análise das 209 sequências obtidas de fagos ligantes de duas linhagens de linfócitos T intralesionais e de um clone mostraram que inúmeros fagos apresentavam seqüências homólogas principalmente com a miosina cardíaca. Estes resultados são originais e concordam com a hipótese da miosina cardíaca ser um dos auto-antígenos mais relevantes no processo auto-imune da DRC. Além disso, mostram a diversidade de seqüências da miosina cardíaca, capazes de se ligarem ao linfócito T, o que amplia de forma considerável o número de epitopos com potencial capacidade de gerar reações auto-imunes.

A miosina cardíaca é a proteína mais abundante no miocárdio e os vários fagos recuperados no *biopanning* apresentaram alto grau de homologia de identidade principalmente com a cadeia beta da miosina, que apresenta estrutura “*coiled coil*”. A biblioteca de fagos compreendia seqüências compostas de 10 resíduos de aminoácidos e o grau de homologia com as seqüências comparadas em banco de dados de proteínas foi bastante elevada, tendo sido observada identidade em até 6 a 7 resíduos de aminoácidos para as três populações de linfócitos estudadas (p.ex. fago sla-52 e clo-a11 com a cadeia pesada beta e masa-71 com cadeia pesada

alfa) e (Tabelas 9, 12 e 15). Além da cadeia pesada da miosina cardíaca, muitos fagos apresentaram homologia com uma isoforma da miosina cardíaca, a “myosin binding protein C” que modula a contração do músculo cardíaco pela fosforilação do AMP cíclico dependente de proteína quinase. O papel desta isoforma da miosina na DRC não é conhecido, no entanto, sabe-se que mutações desta isoforma de miosina cardíaca consistem em uma das causas de cardiomiopatia hipertrófica familiar (WANG, P et al., 2005). Também observamos identidade de 5 resíduos de aminoácidos (fago, masa-47) como apresentado na Tabela 15, com a miosina do tipo I que apresenta uma cauda monomérica (fragmento S1) e, portanto não apresenta conformação *coiled-coil*. O fato desta região não apresentar conformação em alfa-hélice provavelmente não impede o reconhecimento destes epitopos pelo receptor da célula T (RCT). Em conformidade com este achado, recentemente mostrou-se que clones de linfócitos T derivados do sangue periférico de pacientes portadores de doença de Chagas, obtidos após estímulo por uma proteína do *T. cruzi*, foram capazes de reconhecer vários epitopos da miosina cardíaca cadeia beta, entre os quais os resíduos de 5-19 correspondentes a região N-terminal da cabeça globular da miosina, que não apresenta conformação em alfa-hélice, o fragmento S1 (IWAI LK et al., 2005). Embora a doença de Chagas comprometa exclusivamente o miocárdio, onde a miosina é a proteína de expressão majoritária, os mesmos epitopos podem estar envolvidos na progressão das lesões valvares na DRC ocasionados por espalhamento de epitopos, mecanismo pelo qual vários auto-antígenos são reconhecidos em decorrência da resposta imune inicial a um antígeno imunodominante do patógeno (LEHMANN PV et al., 1992).

O reconhecimento de proteínas do tecido humano ocorre por mimetismo molecular com proteínas estreptocócicas. As análises das seqüências dos fagos em banco de dados de proteínas na busca de homologia com proteínas do *S. pyogenes* mostraram que aproximadamente 67% das seqüências obtidas para a linhagem Lu 3.1 e 45% das seqüências ligantes do clone de linfócitos Lu 3.1.17 apresentavam homologia com proteínas estruturais do *S. pyogenes*, principalmente a proteína M (Tabelas

11 e 14). Já a linhagem Lu 10.1 apresentou 8,6% de fagos com homologia com o estreptococo (Tabela 17). Estes resultados indiretamente implicam em reconhecimento cruzado de proteínas do tecido humano, principalmente miosina. Seis fagos ligantes do clone Lu 3.1.17 apresentaram homologia com miosina cardíaca e proteína M (clo-b7, clo-b8, clo-b10, clo-e4, clo-e5, clo-e6) (Tabelas 12 e 14) e podem ser considerados como exemplos do mimetismo molecular entre o estreptococo e a miosina cardíaca. Além disso, a grande variedade de epitopos das diversas isoformas da miosina cardíaca identificados através dos fagos recuperados com o clone intralesional Lu 3.1.17 capazes de se ligarem ao RCT, são favoráveis à hipótese do reconhecimento degenerado de auto-antígenos por linfócitos intralesionais de pacientes com DRC já descritos (FAÉ K, 2004, 2005) e do fenômeno de espalhamento de epitopos (LEHMANN PV et al., 1992), como forma de ampliar a rede de reações auto-imunes.

Em modelo murino foram identificados epitopos T dominantes de reação cruzada entre a miosina e a proteína M do estreptococo. Linfócitos T isolados dos linfonodos de camundongos imunizados com a miosina cardíaca humana eram capazes de proliferar preferencialmente frente a peptídeos correspondentes a três regiões específicas da proteína M5 do estreptococo, incluindo a região amino terminal, N (40-76 resíduos de a.a.), região B (137-193 resíduos de a.a.) e região C3 (293-308 resíduos de a.a.) (CUNNINGHAM MW et al., 1997). Estes resultados mostram o mimetismo molecular entre a miosina cardíaca humana e antígenos estreptocócicos em modelo animal.

Anticorpos contra antígenos estreptocócicos e/ ou anti-miosina presentes no soro de pacientes portadores de FR também evidenciaram reação cruzada entre a miosina cardíaca e a bactéria. Em 1995, QUINN, A et al., mostraram que um anticorpo monoclonal humano anti-estreptococo da cepa M5 era capaz de reagir cruzadamente com peptídeos da cadeia pesada da miosina LMM-10(1411-1428), LMM-23(1580-1597), LMM-27(1632-1649) e LMM-30 (1671-1687). Além disso, anticorpo monoclonal anti-GlcNAc/anti-miosina isolado de paciente com DRC reconheceu o

fragmento S1 da miosina cardíaca, região da cabeça globular da miosina (GALVIN JE et al., 2000), região esta, que apresentou homologia com fagos ligantes do TCR conforme mencionado acima.

Recentemente, avaliamos a resposta proliferativa de clones intralesionais de linfócitos T derivados de fragmentos do tecido cardíaco de pacientes portadores de DRC frente a peptídeos da cadeia pesada da miosina cardíaca (LMM). O percentual de reconhecimento foi muito elevado (63%, 38/60 clones) (manuscrito submetido) e concorda com os achados do *Phage Display*. Diversos clones derivados da linhagem Lu 3.1 (Figura 10) reconheceram um ou vários peptídeos da miosina. Entre eles, o clone Lu 3.1.17 reconheceu o peptídeo LMM25(1607-1624) (Figura 11) com reação cruzada com o peptídeo do estreptococo M5(163-177).

Dentre os fagos ligantes tanto da linhagem Lu 3.1 bem como do clone Lu 3.1.17 encontramos pouca homologia ou ausência de identidade das seqüências dos fagos com as seqüências dos peptídeos LMM estudados, reforçando o conceito da degeneracidade do reconhecimento. Neste sentido o alinhamento da seqüência de um fago, clo-a4 que apresentou homologia com seqüência da proteína M29 do estreptococo e da queratina 19, com as seqüências dos peptídeos LMM 25 e M5(163-177) (Figura 11), mostrou a presença de alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como a leucina (L) e aminoácidos ácidos carregados como a lisina (K), compartilhados e que provavelmente participam da ligação do peptídeo ao receptor da célula T para o desencadeamento da resposta imune. Este achado pode indicar que os peptídeos cíclicos de 10 resíduos de aminoácidos apresentados na proteína pIII do fago possuem a habilidade de se ligarem ao RCT dos linfócitos T. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que o reconhecimento antigênico pelo RCT é o resultado principalmente da interação do receptor com apenas 3-5 resíduos de aminoácidos sobressalentes do peptídeo apresentado pela molécula de CPH (revisto por GARCIA et al., 1997; DAVIS et al., 1998). Assim, vale ressaltar que o clone Lu 3.1.17 reconheceu em proliferação celular os peptídeos LMM25 (1607-1624), M5 (163-177) e uma proteína isolada da válvula mitral com peso molecular e ponto isoelétrico

compatível com a queratina do tipo II (DIEFENBACH DA SILVA, D, 2001), corroborando com esta hipótese.

O fago clo-h12 ligante do clone de linfócitos T Lu 3.1.17 apresentou homologia com fragmento de 1709-1714 resíduos de aminoácidos da cadeia pesada beta da miosina cardíaca humana, correspondente aos peptídeos LMM 32 e LMM 33.

Com o *Phage Display*, também pudemos identificar outras proteínas com expressão no coração, que podem corresponder à auto-antígenos reconhecidos por linfócitos T infiltrantes dos pacientes com DRC grave. Entre eles, a vimentina foi identificada, apresentando homologia com os fagos sla-5, sla-91. A vimentina é uma proteína de cito-esqueleto que também apresenta conformação α -hélice *coiled-coil* e expressão no tecido valvar. Através da abordagem de proteômica, a vimentina foi identificada por nosso grupo pela técnica de eletroforese bidimensional de proteínas por peso molecular e ponto isoelétrico (53,5 kDa e pI = 5,06) e identificada pela técnica de “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF). Foi reconhecida por linfócitos T de sangue periférico de pacientes com DRC (DIEFENBACH DA SILVA, D, 2001). Concordando com este achado, outro grupo mostrou o reconhecimento de uma proteína de 50-54kDa compatível com a vimentina, isolada do miocárdio por linfócitos T do sangue periférico de pacientes com DRC (EL-DEMELLAWY M et al., 1997). Anticorpos contra a vimentina foram descritos há vários anos (revisado por CUNNINGHAM MW, 2000).

Além da vimentina, também a queratina 19 tipo I de citoesqueleto, região 133-138 resíduos de aminoácidos, foi identificada (fago clo-a4) (Figura 11) como mencionado acima. A queratina é uma proteína com estrutura *coiled-coil* assim como a proteína M do estreptococo e a região caudal da miosina cardíaca. Trabalhos mostraram que esta proteína apresentou reconhecimento por um anticorpo monoclonal de reatividade cruzada contra miosina e proteínas derivadas do estreptococo (CUNNINGHAM MW et al., 1986). Adicionalmente, EICHBAUM, QG et al., em 1994, também identificaram a citoqueratina a partir de biblioteca de

cDNA de tecido cardíaco humano, como auto-antígeno reconhecido por soro de pacientes com FR aguda.

Interessantemente, fagos selecionados no *biopanning* realizado com as três populações celulares estudadas também mostraram homologia com diferentes isoformas e cadeias da laminina (Tabelas 10, 13 e 16). A laminina é uma proteína *coiled-coil* de matriz extracelular, que apresenta um alto grau de homologia com a proteína M e miosina cardíaca. Estudos realizados por GALVIN (GALVIN JE et al., 2000) e CUNNINGHAM (CUNNINGHAM MW, 2003) mostraram que anticorpo monoclonal humano anti-GlcNAc/anti-miosina isolado de paciente com DRC mostrou atividade citotóxica frente a células endoteliais humana (células HUVE) e foi capaz de reconhecer tanto a miosina cardíaca no miocárdio quanto a laminina expressa no endotélio valvar (superfície valvar) e no interior da membrana basal. Estes achados apontam a laminina como fator de atração e deposição de anticorpos na valva, e que aumentam assim os sinais inflamatórios pelo endotélio, e mostram o papel dos anticorpos de reação cruzada no desencadeamento da lesão tecidual.

Interessantemente, nossos resultados mostraram que em alguns fagos com homologia com as sequências da miosina e da laminina, houve o compartilhamento de alguns resíduos de aminoácidos com estas proteínas (Tabelas 18 e 19) sugerindo que apenas alguns resíduos são necessários para o desencadeamento de reação cruzada. Este fato sustenta as hipóteses: 1. do mimetismo molecular, 2. do espalhamento de epitopos e 3. de que o reconhecimento pelo RCT é degenerado.

Não somente proteínas de superfície foram identificadas em banco de dados de proteínas através da análise dos peptídeos selecionados pelo *Phage Display*. Os fagos masa-1 e sla-62 mostraram homologia com a proteína de choque térmico HSP70, (do inglês “heat shock protein”) a qual é induzida pela proteína reguladora de glicose, GRP78 (do inglês “glucose regulated protein”). A HSP70 é uma chaperona que auxilia no dobramento de proteínas intracelulares e que apresenta elevado grau de homologia com HSPs de patógenos. Adicionalmente a este achado empregando o *phage*

display, a GRP78 também foi identificada por “peptide mass fingerprint” (PMF) quando isolada de gel bidimensional (pI/PM) de valva mitral e mostrou reatividade por linfócitos de sangue periférico e clones de linfócitos T intralesionais derivados de pacientes portadores de DRC (manuscrito em preparação).

Em relação aos ligantes de outros receptores de superfícies expressos nos linfócitos T infiltrantes, algumas seqüências peptídicas dos fagos apresentaram homologia com diferentes integrinas. As integrinas são proteínas heterodiméricas extracelulares que desempenham importante papel na adesão de linfócitos T. A cadeia β define a classe da integrina e a cadeia α define as diferentes integrinas dentro de uma mesma classe. Dentre as β , temos LFA-1 que exerce função importante na adesão de linfócitos T às células endoteliais e células apresentadoras de antígenos e o VLA que está envolvido nas interações entre células e célula-matriz celular. O VLA-4 (integrina $\alpha_4\beta_7$) possui expressão elevada em linfócitos T ativados e têm a função de se ligar à molécula de adesão VCAM-1 no endotélio vascular e é importante para o recrutamento de linfócitos T efetores em sítios de infecção. Na DRC, foi recentemente descrito que anticorpos auto-reativos dirigidos principalmente contra a miosina cardíaca, ou N-acetilglucosamina (GlucNAc) induzem o aumento de VCAM-1 no endotélio valvular e pela ligação com o VLA-4 favorecem a infiltração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o tecido valvular (ROBERTS et al., 2001).

Outros fagos como o sla-36 mostraram homologia com o receptor alfa do GM-CSF, o qual é secretado por linfócitos T e macrófagos ativados. O papel do GM-CSF em doença auto-imune foi investigado em modelo animal para uso terapêutico em Esclerose Múltipla. Os autores mostraram em camundongos deficientes de GM-CSF (GM-CSF^{-/-}), que a ausência de GM-CSF impede a progressão da EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) na fase tardia da doença (MCQUALTER JL et al., 2001). Em modelo de miocardite auto-imune, camundongos deficientes de GM-CSF (GM-CSF^{-/-}) também parecem estar protegidos. Uma hipótese do mecanismo de proteção, neste modelo seria a redução de recrutamento de macrófagos

para o coração, redução de IL-1 e consequentemente do processo inflamatório (SONDEREGGER I, comunicação pessoal).

Observamos que fagos selecionados a partir do *biopanning* com a linhagem de linfócitos T intralesional Lu 10.1 isolados da valva aórtica do paciente MASA, apresentaram homologia com ligantes do receptor da IL-1 (IL-1R) quando, analisados em banco de dados de proteínas, fato que indicava que os linfócitos T infiltrantes no coração presentes na linhagem Lu 10.1, apresentavam uma expressão aumentada do IL-1R1. Essa hipótese é baseada na premissa de que a ativação e recrutamento de linfócitos T para o local da lesão cardíaca é mediada por citocinas pro-inflamatórias, secretadas pelos macrófagos, entre elas a IL-1. Os nódulos de Aschoff, sinal patognomônico da febre reumática, caracteriza-se por uma lesão granulomatosa, composta por um aglomerado de células do tipo neutrófilos, monócitos/macrófagos, células gigantes denominadas de células de Anitschikow, que produzem diversas citocinas de acordo com sua fase evolutiva. IL-1 e TNF- α são produzidas por macrófagos nos primeiros estágios da lesão, ao passo que IL-2 só é detectada num estágio mais avançado da lesão em presença de linfócitos T (FRASER WJ et al., 1997). Recentemente, foi descrito que células mononucleares infiltrantes do miocárdio e do tecido valvular produzem citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN. Interessantemente, foi demonstrado que no tecido valvular de pacientes portadores de DRC, tanto em fase aguda como em fase crônica da doença, poucas células produziam IL-4 enquanto que esta citocina era produzida por um grande número de células no miocárdio. Estes resultados sugeriram que a falta de IL-4, no tecido valvular estava correlacionada com a progressão e permanência das lesões nas válvulas mitral e aórtica (GUILHERME L et al., 2004).

O fato de termos fagos ligantes de linfócitos T que apresentaram homologia com ligantes do receptor da IL-1 em uma linhagem derivada da válvula aórtica, pode implicar em aumento da expressão do receptor IL-1 na superfície dos linfócitos T e consequente recrutamento de células inflamatórias e manutenção das lesões. A ligação específica do clone de

fago masa-45 ao receptor tipo 1 da IL-1 (IL-1R1) foi confirmada através ensaios de ressonância magnética nuclear (NMR) (Figura 14) mostrando que a ligação foi específica para o receptor do tipo I. O fago masa-45 mimetizou a molécula do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra) que se liga especificamente ao IL-1RI, mas não ao IL-1RII. Estes resultados são importantes e podem ter implicações terapêuticas com ações antiinflamatórias. Neste sentido, necessário se faz avaliar a secreção desta citocina no tecido valvular, pelas células mononucleares infiltrantes da lesão em pacientes em fase aguda da doença bem como em fase crônica, uma vez que as lesões valvulares são permanentes e progressivas, mediadas por citocinas do tipo inflamatório como já mencionado. Alguns estudos voltados ao desenho e desenvolvimento de pequenos antagonistas ao IL-1RI vêm sendo desenvolvidos (VIGERS GPA et al., 2000; AKESON AL et al., 1996).

A metodologia do *Phage Display* tem sua eficácia comprovada quando comparada com outras ferramentas empregadas na identificação de peptídeos ligantes de alvos biológicos como anticorpos, receptores, enzimas, moléculas de adesão como integrinas, entre outros, onde a identificação do ligante requer apenas a interação com a molécula alvo.

O significado biológico dos diversos fagos ligantes dos linfócitos T, aqui descritos deverão ser validados empregando-se ensaios biológicos funcionais, onde peptídeos sintéticos correspondentes às seqüências de auto-antígenos cardíacos identificados a partir das seqüências dos fagos através da avaliação do grau de homologia em banco de dados serão testados em ensaios de proliferação celular e produção de citocinas na presença de células apresentadoras de antígeno.

A identificação de epitopos T, pela metodologia do *Phage Display* apresentada neste trabalho é original e desafiante uma vez que buscamos uma ligação específica ao linfócito T sem considerar o complexo peptídeo-moléculas HLA de classe I e II pelo RCT, fundamental para o reconhecimento e desencadeamento da resposta imune.

Em conclusão, os dados obtidos com a utilização do *Phage Display* apontaram inúmeros e novos epitopos de reação cruzada, bem como o

envolvimento de outras moléculas como citocinas e integrinas que certamente compõem o quadro inflamatório e permeiam o desencadeamento das lesões cardíacas na febre reumática.

7. Conclusões

Em resumo, nossos resultados mostraram a complexidade na identificação de epitopos T devido ao reconhecimento degenerado do receptor da célula T (RCT). O emprego da biblioteca peptídica de *Phage Display* neste trabalho, apontou novos epitopos de auto-antígenos cardíacos como miosina e laminina, bem como outras moléculas com papel no processo inflamatório, como por exemplo ligantes do receptor da IL-1 e integrinas. Estes achados sugerem o envolvimento destas moléculas na patogênese auto-imune da doença reumática cardíaca. No entanto, estudos futuros direcionados a questões específicas são necessários de modo a responder as perguntas aqui geradas.

Referências Bibliográficas

Abergel C, Claverie JM. A strong propensity toward loop formation characterises the expressed reading frames of the D segments at the Ig H and T cell receptor loci. *Eur J Immunol.*1991;21(12):3021-5.

Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science.* 2005;308(5719):227-31.

Agarwal BL, Agrawal R. Rheumatic fever: clinical profile of the initial attack in India. *Bull World Health Organ.* 1986;64(4):573-8.

Arap W, Pasqualini R. The human vascular mapping project. Selection and utilization of molecules for tumor endothelial targeting. *Haemostasis.* 2001;31 Suppl 1:30-1.

Akeson AL, Woods CW, Hsieh LC, Bohnke RA, Ackermann BL, Chan KY, et al. AF12198, a novel low molecular weight antagonist, selectively binds the human type I interleukin (IL)-1 receptor and blocks in vivo responses to IL-1. *J Biol Chem.*1996; 271(48):30517-23.

Ayoub EM, Barrett DJ, Maclaren NK, Krischer JP. Association of class II human histocompatibility leukocyte antigens with rheumatic fever. *J Clin Invest.* 1986;77(6):2019-26.

Baird RW, Bronze MS, Kraus W, Hill HR, Veasey LG, Dale JB. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium. *J Immunol.*1991; 146(9):3132-7.

Bhatia R, Narula J, Reddy KS, Koicha M, Malaviya AN, Pothineni RB, et al. Lymphocyte subsets in acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Cardiol.* 1989;12(1):34-8.

- Bisno AL. Rheumatic fever. In: Wyngaarden JB, Smith LH, editors. Cecil's Textbook of Medicine. 18. ed. Philadelphia: WB Saunders; 1988. P. 1572-80.
- Bisno AL. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. N England J Med. 1991;325(11):783-93.
- Bisno AL. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. Pediatrics. 1996;97(6 Pt 2):949-54.
- Braunschweiler L, Ernst RR. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. J Magn Reson. 1983;53:521-28.
- Brown KC. New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. Curr Opin Chem Biol. 2000;4(1):16-21.
- Cardo-Vila M, Arap W, Pasqualini R. Alpha v beta 5 integrin-dependent programmed cell death triggered by a peptide mimic of annexin V. Mol Cell. 2003;11(5):1151-62.
- Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J et al. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. Nat Genet. 1993;4(3):311-3.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9.
- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev 2000;13(3):470-511.
- Cunningham MW, Swerlick RA. Polyspecificity of antistreptococcal murine monoclonal antibodies and their implications in autoimmunity. J Exp Med. 1986;164(4):998-1012.

- Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Scie USA*.1992;89(4):1320-4.
- Cunningham MW, McCormack JM, Fenderson PG, Ho MK, Beachey EH, Dale JB. Human and murine antibodies cross-reactive with streptococcal M protein and myosin recognize the sequence GLN-LYS-SER-LYS-GLN in M protein. *J Immunol*. 1989;143(8):2677-83.
- Cunningham MW, Antone SM, Smart M, Liu R, Kosarke S. Molecular analysis of human cardiac myosin-cross-reactive B and T-cell epitopes of the group A streptococcal M5 protein. *Infect Immun*. 1997;65(9):3913-23.
- Cunningham MW. Autoimmunity and molecular mimicry in the pathogenesis of post-streptococcal heart disease. *Front Biosci*. 2003;8:s533-43.
- Dajani AS, Ayoub E, Bierman FZ, Bisno AL, Deny FW, Durack DT et al. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever: Jones criteria, update. *Circulation*. 1993;87:302-7.
- Dale JB. Multivalent group A streptococcal vaccines. In: Stevens DL, Kaplan EL, editores. *Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. New York: Oxford University Press; 2000. P.390-401.
- Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels MR. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun*. 1996;64 (5):1495-501.
- Dale JB, Simpson WA, Ofek I, Beachey EH. Blastogenic responses of human lymphocytes to structurally defined polypeptide fragments of streptococcal M protein. *J Immunol*. 1981;126(4):1499-505.
- Dale JB, Beachey EH. Multiple, heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins. *J Exp Med*. 1985a;161(1):113-22.

Dale JB, Beachey EH. Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin. *J Exp Med*. 1985b;162(2):583-91.

Dale JB, Beachey EH. Sequence of myosin-crossreactive epitopes of streptococcal M protein. *J Exp Med*. 1986;164(5):1785-90.

Décourt LV. Doença Reumática. 2 ed. São Paulo: Sarvier; 1972.

Diefenbach Da Silva D. Reconhecimento humoral e celular de proteínas do tecido cardíaco identificadas por eletroforese bidimensional na doença reumática. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia, São Paulo; 2001.

Ebaid M, Atik E, Ikari NM, Afiune JY. In: *Cardiologia em Pediatria. Temas Fundamentais*. 1 ed. São Paulo: Roca; 2000. P.347-88.

Faé KC. Estudo do receptor da célula t (RCT) em clones de linfócitos t infiltrantes do tecidocardiaco em pacientes com doença reumática cardíaca. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia, São Paulo; 2003.

Faé KC, Kalil J, Toubert A, Guilherme L. Heart infiltrating T cell clones from a rheumatic heart disease patient display a common TCR usage and a degenerate antigen recognition pattern. *Mol Immunol*. 2004;40(14-15):1129-35.

Faé KC, Oshiro SE, Toubert A, Charron D, Kalil J, Guilherme L. How an autoimmune reaction triggered by molecular mimicry between streptococcal M protein and cardiac proteins leads to heart lesions in Rheumatic Heart Disease. *J. Autoimmun*. 2005;24(2):101-9.

Feinstein AR, Spagnuolo M. The Clinical Pattern Of Acute Rheumatic Fever: A Reappraisal. 1962. *Medicine (Baltimore)*. 1993;72(4):272-83, 262-3.

Feldman T. Rheumatic heart disease. *Curr Op Cardiol*. 1996;11(2):126-30.

Fenderson PG, Fischetti VA, Cunningham MW. Tropomyosin shares immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins. *J Immunol*. 1989;143(8):2677-83.

Fischetti VA. Streptococcal M protein. *Sci Am*. 1991;264(6):58-65.

Fraser WJ, Haffejee Z, Jankelow D, Wade A, Cooper K. Rheumatic Aschoff nodules revisited. II. Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. *Histopathology*. 1997;31(5):460-4.

Frithz E, Heden LO, Lindahl G. Extensive sequence homology between IgA receptor and M proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol*. 1989;3(8):1111-9.

Galvin JE, Hemric ME, Ward K, Cunningham MW. Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J Clin Invest*. 2000;106(2):217-24.

Garcia KC, Adams EJ. How the T cell receptor sees antigen – a structural view. *Cell*. 2005;122(3):333-6.

Gerbase-Delima M, Scala LC, Temin J, Santos DV, Otto PA. Rheumatic fever and HLA complex. A cosegregation study. *Circulation*. 1994;89(1):138-41.

Giordano RJ, Cardo-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med*. 2001;7 (11):1249-53.

Glynn LE, Holborow EJ. Relation between blood groups, secretor status and susceptibility to rheumatic fever. *Arthritis Rheum*. 1961;4:203-7.

- Gray ED, Wannamaker LW, Ayoub EM, el Kholy A, Abdin ZH. Cellular immune response to extracellular streptococcal products in rheumatic heart disease. *J Clin Invest.* 1981;68(3):665-71.
- Gross WL, SCHLAAK M. Modulation of Human lymphocyte functions by group A streptococci. *Clin Immunol Immunopathol.* 1984;32(2):234-47.
- Guédez Y, Kotby A, El-Demellawy M, Galal A, Thomson G, Zaher S, et al. HLA Class II associations with Rheumatic Heart Disease are more evident and consistent among clinically homogeneous patients. *Circulation.* 1999;(21):2784-90.
- Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowisky R, Kalil J. Association of human leucocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation.* 1991;83(6):1995-8.
- Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowisky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, et al. Human heart-infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation.* 1995;92(3):415-20.
- Guilherme L, Dulphy N, Douay C, Coelho V, Cunha-Neto E, Oshiro SE, et al. Molecular Evidence for Antigen-driven Immune Responses in Cardiac Lesions of Rheumatic Heart Disease Patients. *Int Immunol.* 2000.12(7):1063-74.
- Guilherme L, Oshiro SE, Fae KC, Cunha-Neto E, Renesto G, Goldberg AC, et al. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. *Infect Immun.* 2001a;69(9):5345-51.
- Guilherme L, Cunha-Neto E, Tanaka AC, Dulphy N, Toubert A, Kalil J. Heart-directed autoimmunity: the case of Rheumatic Fever. *J Autoimmun.* 2001b;16(3):363-7.

- Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, et al. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1583-91.
- Husman LK, Scott JR, Lindahl G, Stenberg L. Expression of the Arp protein, a member of the M protein family, is not sufficient to inhibit phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 1995;63(1):345-8.
- Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto E. T cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J. Autoimmun.* 2005;24(2):111-7.
- Jhinghan B, Mehra NK, Reddy KS, Taneja V, Vaidya MC, Bhatia ML. HLA, blood groups and secretor status in patients with established rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Tissue Antigens.* 1986;27(3):172-8.
- Kaplan E. Recent epidemiology of Group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics.* 1996;97(6 Pt 2):945-8.
- Kaplan MH, Bolande R, Rakita R, Blair J. Presence of bound immunoglobulins and complement in the myocardium in acute rheumatic fever: association with cardiac failure. *N Engl J Med.* 1964;271:637-45.
- Kaplan MH. Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. Properties of an antigen in certain strains of group A streptococci exhibiting an immunologic cross reaction with human heart tissue. *J Immunol.* 1963;90:595-606.
- Kaplan MH, Frengley JD. Autoimmunity to the heart in cardiac disease. Current concepts of the relation of autoimmunity to rheumatic fever

postcardiopathy and posinfarction syndromes and cardiomyopathies.
Am J Cardiol. 1969;24(4):459-73.

Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. J. Biol. Chem. 1993;268(27):20205-10.

Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands by using *phage display* peptide libraries. J Nucl Med. 1999a;40(5):883-8.

Koivunen E, Restel BH, Rajotte D, Lahdenranta J, Hagedorn M, Arap W, et al. Integrin-binding peptides derived from *phage display* libraries. Methods Mol Biol. 1999b;129:3-17.

Kotb M, Courtney HS, Dale JB, Beachey EH. Cellular and biochemical responses of human T lymphocytes stimulated with streptococcal M proteins. J. Immunol. 1989;142(3):966-70.

Kraus W, Seyer JM, Beachey EH. Vimentin-cross-reactive epitope of type 12 streptococcal M protein. Infect Immun. 1989;57(8):2457-61.

Krisner K, Cunningham MW.: Myosin: a link between streptococci and heart. Science. 1985;227(4685):413-5.

Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. J Immunol. 1962;89:307-13.

Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. Nature. 1992;358(6382):155-7.

Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. Immunol Today. 1998;19(9):395-404.

- Mertens NM, Galvin JE, Adderson EE, Cunningham MW. Molecular analysis of cross-reactive anti-myosin/anti-streptococcal mouse monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2000;37(15):901-13.
- Narula J, Virmani R, Reddy KS, Tandon R. Rheumatic Fever. 1 ed. Washington: American Registry of Pathology; 1999. P.504.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens*. 1992;39(5):225-35.
- Olmez U, Turgay M, Ozenirler S, Tutkak H, Duzgun N, Duman M, Tokgoz G. Association of HLA class I and class II antigens with rheumatic fever in a Turkish population. *Rheumatol*. 1992;22(2):49-52.
- Organização Mundial da Saúde. Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Report of WHO Study Group. Geneva. World Health Organization, 2001 (Technical Report Series, N° 923).
- Patarroyo ME, Winchester RJ, Vejerano A, Gibofsky A, Chalem F, Zabriskie JB, et al. Association of a B-cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. *Nature*. 1979;278(5700):173-4.
- Rajapakse CN, Halim K, Al-Orainey I, Al-Nozha M, Al-Aska AK. A genetic marker for rheumatic heart disease. *Br Heart J*. 1987;58(6):659-62.
- Read SE, Fischetti VA, Utermohlen V, Falk RE, Zabriskie JB. Cellular reactivity studies to streptococcal antigens. Migration inhibition studies in patients with streptococcal infections and rheumatic fever. *J Clin Invest*. 1974;54(2):439-50.
- Sanyal SK, Thapar MK, Ahmed SH, Hooja V, Tewari P. The initial attack of acute rheumatic fever during child-hood in North India: a prospective study of the clinical profile. *Circulation* 1974;49(1):7-12.

- Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315-7.
- Smith G, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*. 1993;217:228-57.
- Roberts S, Kosanke S, Terrence DS, Jankelow D, Duran CM, Cunningham MW. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endothelium. *J Infect Dis*. 2001;183(3):507-11.
- Shulman ST, 2000. Streptococcal infections. In: Stevens D, Kaplan E, editores. *Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. New York: Oxford University Press; 2000. P. 76-101.
- Simpson WA, Beachey EH. Adherence of group A streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. *Infect Immun*. 1983;39(1):275-9.
- Snitcowsky R. Rheumatic fever prevention in industrializing countries: problems and approaches. *Pediatrics*. 1996;67(3):996-98.
- Starr R, Offer G. The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem J*. 1978;171(3):813-6.
- Stollerman GH. Rheumatic fever. *Lancet*. 1997;349(9056):935-42.
- Stollerman GH. Rheumatogenic streptococci and autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;61(2 Pt 1):131-42.
- Swedo SE, Leonard HL, Mittleman BB, Allen AJ, Rapoport JL, Dow SP, et al. Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. *Am J Psychiatry*. 1997;154(1):110-2.
- Taranta A, Torosdag S, Metrakos JD, Jegier W, Uchida I. Rheumatic fever in monozygotic and dizygotic twins. *Circulation*. 1959;20:788.

- Terreri MT, Ferraz MB, Goldenberg J, Len C, Hilario MO. Resource utilization and cost of rheumatic fever. *J Rheumatol.* 2001;28(6):1394-7.
- Visentainer JE, Pereira FC, Dalalio MM, Tsuneto LT, Donadio PR, Moliterno RA. Association of HLA-DR7 with rheumatic fever in the Brazilian population. *J Rheumatol.* 2000;27(6):1518-20.
- Vigers GP, Dripps DJ, Edwards CK 3rd, Brandhuber BJ. X-ray crystal structure of a small antagonist peptide bound to interleukin-1 receptor type 1. *J Biol Chem.* 2000;275(47):36927-33.
- Weidebach W, Goldberg AC, Chiarella J, Guilherme L, Snitcowski R, Pileggi F, Kalil J. HLA Class II Antigens In Rheumatic Fever: Analysis Of The DR Locus By RFLP Oligotyping. *Human Immunol.* 1994;40(4):253-8.
- Wu LC, Tuot DS, Lyons DS, Garcia KC, Davis MM. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature.* 2002;418(6897):552-6.
- Zabriskie JB, Lavenchy D, Williams RC Jr, Fu SM, Yeadon CA, Fotino M, Braun DG. Rheumatic fever-associated B cell alloantigens as identified by monoclonal antibodies. *Arthritis Rheum.* 1985;28(9):1047-51.

CÓDIGO GENÉTICO

Segunda base do códon

		U	C	A	G		
Primeira base do códon	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } SER UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } UGG } Trp	U C A G	Terceira base do códon
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thy ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu CAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G	

O código genético, escrito por convenção na forma na qual os códon aparecem no mRNA. Os três códon de terminação, UAA, UAG e UGA, estão no quadro em vermelho; o códon iniciador, AUG, está mostrado em verde.

ESTRUTURA QUÍMICA DOS AMINOÁCIDOS

SIGLA DE AMINOÁCIDOS

A	ALANINA
R	ARGININA
N	ASPARAGINA
D	ÁCIDO ASPÁRTICO
E	ÁCIDO GLUTÂMICO
C	CISTEÍNA
G	GLICINA
Q	GLUTAMINA
H	HISTIDINA
I	ISOLEUCINA
L	LEUCINA
K	LISINA
M	METIONINA
F	FENILALANINA
P	PROLINA
S	SERINA
Y	TIROSINA
T	TREONINA
W	TRIPTOFANO
V	VALINA