Nathália Moreira Santos

**Febre reumática: quantificação de fragmentos circulares
excisados pelo rearranjo do receptor da célula T
em linfócitos T de sangue periférico**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Guilherme Guglielmi

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Nathália Moreira

Febre reumática : quantificação de fragmentos circulares excisados pelo rearranjo do receptor da célula T em linfócitos T de sangue periférico / Nathália Moreira Santos. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia Immunopatologia.

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Descritores: 1.Febre reumática/imunologia 2.Cardiopatia reumática/imunologia
3.Linfócitos T 4.Genes codificadores da cadeia beta de receptores de linfócitos T
5.Timo/imunologia 6.Timo/fisiologia 7.Autoimunidade 8.*Streptococcus pyogenes*

USP/FM/DBD-309/13

Dedico este trabalho aos pacientes portadores de Febre Reumática e suas famílias, sem os quais definitivamente este trabalho não seria possível.

Deixo aqui toda a minha gratidão.

Aos meus pais, Francisco e Isabel e à minha irmã Lethícia.

Agradecimentos

À Dra. Luiza Guilherme, que desde o primeiro momento me acolheu como sua aluna e me ensinou muitas coisas, não só científicas, mas também lições para a vida. O conhecimento é o maior bem que alguém pode ter na vida, muito obrigada por dividir os teus comigo!

Ao Professor Jorge Kalil pelas discussões enriquecedoras, ensinamentos, por me apoiar e principalmente por me proporcionar estrutura para a realização deste projeto.

À Dra. Kelen Farias e Júlia Teixeira da FMRP-USP, pela ajuda substancial para que este projeto fosse realizado.

Aos amigos do grupo de Febre Reumática, Fernanda Alegria, Edilberto Postol, Raquel Alencar, Simone Santos, Samar Freschi, Frederico Ferreira, Washington da Silva e Claudio Puschel.

Aos amigos que além de pertencerem ao grupo de Febre Reumática estiveram sempre por perto dando apoio nas boas e não tão boas horas, dividindo as alegrias e agonias da pós graduação, emprestando o ombro amigo e dando a palavra para que a jornada seguisse adiante: Karen Köhler, Karine De Amicis e Carlo Martins. Muito obrigada!

Ao clã das “Marias”, Aline Bossa, Taciana Mikulski Ali, Monique Baron, Ana Paula Pacanaro e Isabela Navarro, meus dias se tornavam muito mais felizes na presença de vocês meninas!

À Dra. Rosemeire Silva, grande amiga, sempre disposta a ajudar e sempre disposta a me escutar.

Agradeço aos pós-docs e demais pós-graduandos, funcionários e aprimorandos pelo apoio e discussões, em especial à Dra. Amanda Frade, Dra. Yordanka, Dra. Maristela

Hernandez, Dra. Carolina Luque, Priscila Carmona, Janaina Baptista, Sandra Maria e Fernanda Magalhães pela amizade.

Aos amigos do coração Carolina Lavini Ramos, Anna Paula Guembes e Alessandra Schanoski, José Manuel C'ondor e William Roldan pela amizade verdadeira e adição de alegria aos meus dias.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação Bruno Sini e Wesley Brandão, muito obrigada pelas dicas e discussões, sejam elas de cunho científico ou não e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Tumoral do ICHC-HCFMUSP, Ariel Lima Costa, Alline Didone, Adriana Attie, Claudia Santos, Ismael Lima, Luciana Nardinelli Mariana Marchiani, Tadeu Menezes, Rafael Valente, Roseli, que me acolheram e me ajudaram muito, em especial agradeço ao Dr. Israel Bendit, que me proporciona diariamente o crescimento profissional e permitiu que eu pudesse concluir com êxito os compromissos assumidos na pós-graduação. Muito Obrigada!

Às minhas amigas-irmãs Susana Lessa e Vanessa Nascimento, que certamente fizeram e fazem toda a diferença nesta empreitada. Sem vocês, com certeza tudo isso teria sido muito mais difícil. Palavras são pequenas perto da minha gratidão por vocês.

Ao meu companheiro e amigo Eduardo Yasumura, sempre presente e muito compreensivo em todos os momentos.

À minha família, meus pais Francisco e Isabel e minha irmã Lethícia. Meus exemplos, meus espelhos, minha base sólida. Se sou o que sou é porque vocês me deram de presente os valores e bem maior que este não há!

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro dado a este projeto.

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE REUMÁTICA E DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA	1
1.2 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA	3
1.3 PATOGÊNESE DA FEBRE REUMÁTICA/DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA	5
1.4 CÍRCULOS EXCISADOS PELO REARRANJO DOS GENES DO RECEPTOR DE LINFÓCITOS T (TREC)	9
2. OBJETIVO	15
3. MÉTODOS	16
3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO	16
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	16
3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA, EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E PREPARO DA CURVA PADRÃO	17
3.4 PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE TRECs	21
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TRECs	23
3.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	24
3.7 MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T NAÍVE E DE MEMÓRIA CD3 (PE.CY5), CD4 (PE), CD8 (APC), CD45RA (FITC), CD45RO (FITC) E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	25
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO: PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA E DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	27
4.2 PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO TREC E DA ALBUMINA	31
4.3 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO TREC	33
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , CD8 ⁺ CD45RA ⁺ , CD4 ⁺ CD45RO ⁺ E CD8 ⁺ CD45RO ⁺	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES PONTUAIS	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Ao – Aórtica

CDR3 – do inglês “*complementarity determining region 3*”

Ct – do inglês “*Threshold cycle*”

DNA – do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”

DRC – Doença Reumática Cardíaca

FAM – 5-Carboxifluorescein

FR- Febre Reumática

GAS – Streptococcus beta-hemolítico do grupo A

HLA – do inglês “*human leukocyte antigen*”

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL – interleucina

LB – do inglês “*Lysogeny broth*”

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

MBL- do inglês “*manose binding lectin*”

MHC – do inglês “*major histocompatibility complex*”

Mi – mitral

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – do inglês “*polimerase chain reaction*”

ROX – 5-Carboxi-X-rhodamine

SNP – do inglês “*single nucleotide polymorphism*”

SUS – Sistema Único de Saúde

Th – célula T *helper*

TNF – do inglês “*tumor necrosis factor*”

TREC – do inglês “*T cell receptor excision circles*”

V. – Valva

VB – cadeia variável beta do receptor de célula T

VCAM-1 – do inglês “*Vascular cell adhesion protein-1*”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alelos do sistema HLA de classe II associados ao desenvolvimento da Febre Reumática/Doença Reumática Cardíaca-----	5
Figura 2. Rearranjo do TCR-----	11
Figura 3. Formação do TREC durante a recombinação do receptor de células T-----	12
Figura 4. Esquema de diluição dos pontos da curva padrão utilizada nas reações de PCR em Tempo Real-----	19
Figura 5. Curva de amplificação do TREC por PCR em tempo real-----	20
Figura 6. Amplificação do gene Albumina por PCR em tempo real-----	20
Figura 7. Curva Padrão do TREC gerada no 7500 <i>Software</i> v2.0-----	32
Figura 8. Curva Padrão do gene da Albumina gerada no 7500 <i>Software</i> v2.0-----	32
Figura 9. Número absoluto de moléculas de TREC/ μ g de DNA pacientes com FR/ DRC e de indivíduos saudáveis -----	34
Figura 10. Correlação entre a quantidade de TREC e a idade dos pacientes com FR e DRC-----	35
Figura 11. Correlação entre a quantidade de TREC e a idade dos indivíduos saudáveis-----	35
Figura 12. Número absoluto de moléculas de TREC/ μ g de DNA pacientes com FR/ DRC e de indivíduos saudáveis agrupados por faixa etária-----	36
Figura 13. Análise de citometria de fluxo de uma amostra representativa utilizando o software FlowJo versão 9.6.4.-----	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos plasmídeos contendo a sequência do TREC e da Albumina-----	17
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda do TREC-----	21
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda da Albumina---	22
Tabela 4. Idade, dados clínicos e tempo de acompanhamento dos pacientes-----	28
Tabela 5. Idade e gênero do grupo controle-----	30
Tabela 6. Quantificação absoluta do TREC em sangue periférico de pacientes com FR, DRC e indivíduos saudáveis-----	33
Tabela 7. Média e desvio padrão da frequência total de células T <i>naïve</i> e de memória em cada grupo estudado-----	37

RESUMO

Santos NM. *Febre reumática: quantificação de fragmentos circulares excisados pelo rearranjo do receptor da célula T em linfócitos T de sangue periférico* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Há um amplo espectro de doenças causadas por estreptococos do grupo A (GAS), e são consideradas um problema de saúde pública em vários países, principalmente os em desenvolvimento, com aproximadamente 600 milhões de casos/ano. As infecções causadas por GAS podem ocasionar doenças invasivas como faringite e pioderma com seqüelas auto-imunes graves como a febre reumática (FR) e glomerulonefrite. A FR acomete principalmente crianças e jovens adultos. A FR apresenta diversas manifestações, sendo a doença reumática cardíaca (DRC) a seqüela mais grave, caracterizada por lesões cardíacas valvares progressivas e permanentes. O tratamento, frequentemente envolve cirurgia cardíaca para a correção de lesões valvulares, o que acarreta alto custo para o Sistema Único de Saúde no Brasil e em vários países. Em trabalhos anteriores sobre os mecanismos desencadeadores das lesões reumáticas no coração, foi possível identificar o papel do linfócito T como mediador principal da autoimunidade, através da análise do receptor de células T infiltrantes de lesão cardíaca de indivíduos com DRC. Várias expansões oligoclonais com diferentes tamanhos da região que reconhece o antígeno, CDR3 foram encontradas. No presente trabalho, analisou-se a atividade tímica através da quantificação de fragmentos circulares excisados pelo rearranjo do gene do receptor do linfócito T (TREC) em linfócitos T de sangue periférico de indivíduos com FR e DRC. Também foi avaliada a presença de células T *naïve* e de memória através de citometria de fluxo. Os resultados do presente trabalho mostraram que a quantidade de TREC em amostras de sangue periférico do grupo de pacientes com FR/DRC foi significativamente menor quando comparada a observada em indivíduos saudáveis. Interessantemente, em ambos os grupos a quantidade de TREC apresentou correlação negativa com a idade dos indivíduos estudados. Os resultados indicaram diferenças na atividade tímica em pacientes com FR/DRC, provavelmente decorrente do processo autoimune que envolve linfócitos T.

Descritores: Febre reumática/imunologia; Cardiopatia reumática/imunologia; Linfócitos T; Genes codificadores da cadeia beta de receptores de linfócitos T; Timo/imunologia; Timo/fisiologia; Autoimunidade; *Streptococcus pyogenes*

ABSTRACT

Santos NM. *Quantification of T cell receptor excision circles in peripheral blood of rheumatic fever patients* [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

There is a wide spectrum of diseases caused by group A streptococci (GAS), that still being considered a public health problem in developing countries, with about 600 million cases per year. Infections by GAS can cause invasive diseases such as pharyngitis and pyoderma leading to serious autoimmune complications such as rheumatic fever (RF) and glomerulonephritis. RF mainly affects children and young adults, and presents different manifestations. Rheumatic heart disease (RHD) is considered the most serious complication leading to valvular lesions that are characterized by progressive and permanent heart damage, which entails high cost to the Public Health System in Brazil and worldwide. In previous works that focused on the mechanisms leading to rheumatic heart lesions, we identified the role of T lymphocytes as principal mediator of autoimmune reactions. Through the in deep analysis of infiltrating T-cell receptor repertoire of patients with RHD, we identified oligoclonal expansions with different sizes of CDR3 that is the region of antigen recognition. In the present study we analyzed the thymic activity through T cell receptor excision circles (TREC) quantification in T cells from peripheral blood of RF/RHD patients. We also evaluated naïve and memory T cells from peripheral blood by flow cytometry. Our results showed that the amount of TREC in the peripheral blood of patients was significantly lower when compared to the healthy individuals. In addition, both groups showed that the amount of TREC is negatively correlated with age. These results indicated that the thymic activity in RF/RHD patients is altered probably due to the autoimmune process that involves T lymphocytes.

Descriptors: Rheumatic fever/immunology; Rheumatic heart disease/immunology; T-Lymphocytes; Genes, T-cell receptor beta; Thymus gland/immunology; Thymus gland/physiology; Autoimmunity; *Streptococcus pyogenes*.

1. INTRODUÇÃO

O *Streptococcus pyogenes* é uma bactéria Gram positiva, primeiramente caracterizada por Rebecca Lancefield como estreptococo beta-hemolítico do grupo A (“GAS” do inglês *Group A Streptococcus*) por possuir em sua parede o carboidrato C, um polímero de N-acetilglicosamina e ramnose (Lancefield, 1933). É responsável por causar um amplo espectro de doenças que vão desde infecções superficiais, como a faringite e pioderma, até doenças invasivas graves, como a celulite e a fascíte necrotizante. Podem desencadear doenças mediadas por toxinas, como a escarlatina e a síndrome do choque tóxico estreptocócico, ou ainda sequelas autoimunes pós-estreptocócicas como a febre reumática (FR) aguda e glomerulonefrite pós-estreptocócica aguda que acometem indivíduos geneticamente suscetíveis (Narula *et al*, 1999b).

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE REUMÁTICA E DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA

Estima-se que aproximadamente 18 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por doenças graves ocasionadas por GAS, e que a cada ano surjam 1,7 milhões de novos casos e que ocorram 500 mil mortes decorrentes de estreptococcia (Carapetis *et al*, 2005).

A FR é uma doença que se manifesta clinicamente por episódios de poliartrite migratória (90% dos indivíduos acometidos) e pode evoluir para a doença reumática cardíaca (DRC), a sequela mais grave da doença. Acomete entre 30% e 45% dos indivíduos com FR. Outras manifestações da FR são a coréia de Sydenham, que

acomete o sistema nervoso central, porém é reversível; o eritema *marginatum* e nódulos subcutâneos, em acordo com os critérios de Jones (Dajani AS, 1992).

A FR possui uma distribuição universal, mas com marcada diferença nas taxas de incidência e prevalência entre os diversos países, constituindo a principal causa de cardiopatia adquirida em crianças e adultos jovens nos países em desenvolvimento (Kaplan, 1996). Em países desenvolvidos, a FR é atualmente uma doença pouco frequente. Já em países em desenvolvimento, como o Brasil, a FR ainda representa a maior causa de doença cardíaca entre crianças e adultos jovens (Costa *et al*, 2009). Segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que a prevalência da FR em crianças e adolescentes seja de aproximadamente 3%. A DRC pode afetar o pericárdio, o miocárdio e o endocárdio. A pericardite e a miocardite apresentam bom prognóstico com resolução em até 30 dias após a infecção. Já a endocardite, promove lesões de válvulas, principalmente mitral e aórtica, que pode levar ao quadro de insuficiência cardíaca (Narula *et al*, 1999a).

A DRC é debilitante e representa alto impacto social e econômico, pois é responsável por 30% das cirurgias cardíacas em adultos e 90% das cirurgias cardíacas infantis.

Seguindo a projeção do modelo epidemiológico da Organização Mundial da Saúde (OMS) e de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que anualmente no Brasil ocorram cerca de 10 milhões de faringoamigdalites estreptocócicas, perfazendo o total de 30.000 novos casos de FR, dos quais aproximadamente 15.000 podem apresentar acometimento cardíaco (Barbosa PJB, 2009).

A frequência da FR aguda no Brasil difere de acordo com a região geográfica, porém em todas as regiões observa-se uma redução progressiva do total de internações

por esta doença. A taxa de mortalidade por DRC em pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) foi de 6,8% em 2005 e de 7,5% em 2007, com gasto aproximado no tratamento clínico de 52 milhões de reais em 2005 e de 55 milhões em 2007. Gastos de cerca de 94 milhões de reais em 2005 e mais de 100 milhões em 2007 em procedimentos intervencionistas, cirurgias e valvotomias percutâneas também foram direcionados ao tratamento das sequelas cardíacas da FR/DRC (Barbosa PJB, 2009).

1.2 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA

O complexo principal de histocompatibilidade - MHC (do inglês – *Major Histocompatibility Complex*) desempenha um papel central no desenvolvimento da resposta imune humoral e mediada por células. Enquanto os anticorpos são capazes de reagir contra antígenos, as células T em sua maioria reconhecem o antígeno somente quando este está combinado com uma molécula do MHC que têm, portanto, um papel fundamental no reconhecimento do antígeno pelas células T. Estas moléculas atuam como estruturas apresentadoras de antígenos, de forma que um grupo específico de moléculas do MHC expressas por um indivíduo influencia o repertório dos antígenos que serão reconhecidos pelas células T, seguido de ativação celular. Por esta razão, o MHC determina a resposta imune de um indivíduo aos antígenos de organismos infecciosos, e tem sido relacionado com a suscetibilidade a doenças e com o desenvolvimento da autoimunidade (Goldsby *et al*, 2002).

A suscetibilidade ao desenvolvimento da FR e DRC foi primeiramente associada com a presença de alelos do sistema HLA (do inglês – *Human Leucocyte Antigen*) de classe II dos *loci* DRB1 e DRB3 localizados no braço curto do cromossomo 6 (revisto por (Bryant *et al*, 2009; Guilherme *et al*, 2011a).

Os alelos HLA- DR7 e -DR53 estão associados ao desenvolvimento da FR e DRC em algumas populações no Brasil, Egito e Turquia (Guilherme *et al*, 2011b), tendo sido inicialmente descrito, em pacientes do Brasil (Guilherme *et al*, 1991). Outros alelos HLA-DR e -DQ de suscetibilidade foram posteriormente descritos em diferentes países (Bryant *et al*, 2009; Guilherme *et al*, 2011b). A **Figura 1**, localiza a distribuição mundial dos alelos HLA associados com a FR/DRC. Mais recentemente, foram descritos polimorfismos em alguns genes não relacionados com o sistema HLA, porém envolvidos com a resposta inflamatória e defesa do hospedeiro (resposta inata e adaptativa) contra o *S. pyogenes*.

Estudos na população brasileira acometida por FR/DRC mostraram o polimorfismo de SNP no promotor do gene TNF- α (do inglês – *tumor necrosis factor alpha*) -308 G/A e TNF- α -238 G/A, sendo este associado ao desenvolvimento de lesões de valva aórtica (Ramasawmy *et al*, 2007). Posteriormente, em estudo com genes do sistema complemento, (Ramasawmy *et al*, 2008) foi mostrado que a presença do alelo O (52D, 54B and 57D) do gene MBL-2 (do inglês – *manose binding lectin 2*), está associado à regurgitação de valva aórtica de origem reumática. Também é associado à gravidade da FR/DRC, a presença do alelo A1 do gene do receptor da IL-1 (Azevedo *et al*, 2010).

Todos os estudos descritos são importantes, uma vez que os polimorfismos dos genes envolvidos com a resposta imunológica podem fornecer informações preciosas, tais como a progressão da doença, bem como, um possível alvo terapêutico.

Figura 1. Alelos do sistema HLA de classe II associados ao desenvolvimento da Febre Reumática / Doença Reumática Cardíaca

1.3 PATOGÊNESE DA FEBRE REUMÁTICA/DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA

A patogênese da FR/DRC tem como ponto central a resposta autoimune mediada por anticorpos (linfócitos B) e por células (linfócitos T) desencadeadas por mimetismo molecular entre antígenos do *S. pyogenes*, principalmente a proteína M e proteínas humanas. Essa resposta induz principalmente a produção de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos e resposta mediada por linfócito T contra antígenos estreptocócicos e próprios (Guilherme *et al.*, 2005; Guilherme *et al.*, 2011a).

No início da infecção ocorre a colonização do epitélio da orofaringe pelo patógeno e como consequência há a ativação da resposta imune inata. Macrófagos migram até o local de infecção e fagocitam o patógeno, gerando um microambiente com predomínio de citocinas pró-inflamatórias com consequente ativação da resposta imune.

Citocinas são mediadores solúveis que têm papel importante durante a infecção, pois desencadeiam resposta imune efetiva, que, entretanto podem ser deletérias em doenças autoimunes, entre elas a FR/DRC. As células T CD4⁺ ativadas dependem diretamente das citocinas para polarizarem diferentes subtipos de resposta como Th1, Th2 e Th17, que envolvem diversas moléculas solúveis com atividades inflamatória, reguladora da inflamação e mediadoras de reações alérgicas.

A infecção por *S. pyogenes* no estágio inicial, induz a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α , como observado em amostras de sangue periférico de pacientes com FR/DRC estimuladas com antígenos do estreptococo. Essas células apresentaram grandes quantidades destas citocinas pró-inflamatórias após o estímulo (Miller et al., 1989). Além disso, há um aumento na produção de IL-2 em pacientes com febre reumática aguda e em pacientes com doença reumática cardíaca aumento no número de células T CD4⁺ e CD25⁺, o que sugere a expansão de células T ativadas no sangue periférico destes pacientes durante a fase ativa da doença (Morris et al. 1993).

As células B ativadas produzem anticorpos autorreativos que se ligam ao endotélio do miocárdio e ao endotélio valvular facilitando a chegada de outras células até o local. Há um aumento da expressão da molécula de adesão VCAM1 que favorece a migração de células T autorreativas principalmente para as válvulas (Cunningham, 2004).

A partir da descoberta dos anticorpos monoclonais ao final da década de 70 foi possível verificar a presença de linfócitos T no tecido valvular de pacientes com DRC, documentada no início da década de 80 (Kemeny *et al*, 1989; Raizada *et al*, 1983).

Recentemente mostramos aumento na expressão gênica de CCL3 e MIP1 α em fragmento de tecido do miocárdio de pacientes com DRC submetidos à correção valvular, e de CCL1/I309 e CXCL9/Mig no tecido valvular. Através de ensaio de migração celular frente a diversas quimiocinas foi mostrado que o perfil dos linfócitos T que migravam para o coração apresentava fenótipo de memória (CD4⁺CD45RO⁺) em resposta principalmente a CXCL9/Mig (Faé *et al*, 2013).

O papel funcional de linfócitos T infiltrantes do tecido cardíaco foi descrito de forma pioneira através do reconhecimento cruzado de peptídeos sintéticos da região N-terminal da proteína M do patógeno e proteínas do tecido cardíaco (miocárdio e válvulas) (Guilherme *et al*, 1995). Além disto, mostramos que o reconhecimento de antígenos do *S. pyogenes* por linfócitos T desencadeia uma cascata de reações cruzadas por mecanismo de espalhamento de epítomos e pela capacidade de degeneração do reconhecimento antigênico (Faé *et al*, 2006; Guilherme *et al*, 1995; Guilherme *et al*, 2000).

O mecanismo de espalhamento de epítomos (“*epitope spreading*”) é bem estabelecido e sabe-se que durante a resposta imune, a reatividade é induzida também a epítomos diferentes daqueles que deram origem a reação contra o patógeno (Sercarz *et al*, 1993). No caso da FR/DRC, este mecanismo é gerado a partir do reconhecimento cruzado de antígenos do *S. pyogenes* e de auto-antígenos. Desta forma, a importância dessas células na patogênese da doença foi verificada através da observação de que clones de células T derivados tanto de lesões cardíacas como de sangue periférico de pacientes com DRC possuíam capacidade de reconhecer de forma cruzada epítomos da

proteína M5 do *S. pyogenes* e proteínas derivadas de tecido cardíaco (miocárdio e válvulas) (Guilherme *et al*, 1995). A análise do repertório de células T intralesionais, mostrou expansões oligoclonais de linfócitos T no tecido cardíaco capazes de reconhecer simultaneamente proteínas do *S. pyogenes* e proteínas cardíacas por mimetismo molecular (Guilherme *et al*, 2000). Além disso, conforme mencionado acima, foi possível identificar clones capazes de reconhecer vários peptídeos derivados da proteína M do *S. pyogenes* e proteínas da miosina cardíaca que apresentavam similaridade de sequência e estrutura, fato que ressalta que o reconhecimento por estes linfócitos T é degenerado e que estes apresentam modificações significantes durante o curso da doença (Fae *et al*, 2006).

Células T derivadas de lesão cardíaca de pacientes com DRC secretam predominantemente IFN- γ e TNF- α , o que indica que mesmo durante a fase crônica da doença há o predomínio de resposta inflamatória (Guilherme *et al*, 2004). Além disto, observou-se também que as citocinas IL-10 e IL-4 (Th2), reguladoras da resposta inflamatória, eram produzidas por células T infiltrantes do miocárdio de pacientes com DRC grave, enquanto que poucas células T infiltrantes de lesão de válvulas mitral e aórtica eram capazes de produzir IL-4. Estes dados são indicadores de que a baixa produção de IL-4 por estas células provavelmente contribui para a manutenção e progressão das lesões, enquanto no miocárdio, o maior número de células produtoras de IL-4 contribui para a cura da miocardite que ocorre após algumas semanas (Guilherme *et al*, 2004). Estes achados ressaltam a importância do equilíbrio entre respostas Th1/Th2 que influenciam diretamente o grau das lesões reumáticas cardíacas (Guilherme & Kalil, 2010).

1.4 CÍRCULOS EXCISADOS PELO REARRANJO DOS GENES DO RECEPTOR DE LINFÓCITOS T (TREC)

Embora o timo seja o principal local da maturação dos linfócitos T na vida fetal, nos adultos essa função encontra-se diminuída (Douek *et al*, 2000). Citocinas, fatores de crescimento e hormônios também influenciam diretamente na atividade tímica. A interleucina-7 (IL-7) é um fator de sobrevivência produzido pelas células epiteliais tímicas e de grande importância para o desenvolvimento dos timócitos (Williams *et al*, 2007).

Durante o desenvolvimento das células T no timo, ocorre o rearranjo gênico do TCR (do inglês – *T cell receptor*), o qual pode ser classificado em dois tipos: TRC $\alpha\beta$ e TRC $\gamma\delta$. Os genes que codificam as cadeias α , β e γ do TCR estão em três *loci* diferentes, enquanto o *locus* da cadeia δ do TCR encontra-se no *locus* da cadeia α . Na linhagem germinativa, cada *locus* do TCR possui segmentos V, J e C (variável, junção e constante), sendo que os *loci* TCR β e TCR δ também possuem os segmentos **D** (diversidade). Na porção terminal 5' de cada um dos loci do TCR existem diversos genes **V** e nas distâncias variadas destes genes, no sentido 3', estão os genes da região **C**. Os genes **J** estão localizados antes dos genes **C** e os genes **D** estão presentes somente nas cadeias β e δ do receptor (Abbas *et al*, 2008; Snustad & Simmons, 2008). **A Figura 2** ilustra o rearranjo.

O processo de recombinação **V(D)J** em qualquer loci de TCR envolve a seleção de um gene **V**, um gene **J** e um gene **D** (quando presente) em cada linfócito, e a união desses genes formando um único éxon que irá codificar a cadeia **V** (Variável) do receptor, enquanto os genes da região **C**, adjacentes ao éxon **V(D)J** e separadas pelo íntron **J-C**, codificará a cadeia **C** (Constante) (ABBAS *et al*, 2008).

A recombinação **V(D)J** inicia-se quando as enzimas RAG-1 e RAG-2, denominadas recombinases, reconhecem as sequências de sinal de recombinação (RSSs). As RSSs estão localizadas no sentido 3' de cada gene **V** e 5' da cada gene **J**, flanqueando cada gene **D** (quando presente) nos dois lados. Elas consistem em sequências conservadas de 7 e 9 pares de bases (CACAGTG) e (ACAAAAACC), respectivamente separadas por espaçadores de tamanhos diferentes (12 ou 23 pares de bases), porém também conservados (ABBAS *et al*, 2008; Geenen *et al*, 2003; SNUSTAD & SIMMONS, 2008).

Ao reconhecer as RSSs, as recombinases aproximam os éxons **V** e **J** (ou **V**, **D** e **J**) e clivam a fita simples de DNA entre a sequência sinal e o segmento gênico que será rearranjado, formando uma extremidade com hidroxila (3'-OH) livre. Essa extremidade se liga a hélice oposta do DNA formando uma estrutura covalente em forma de grampo. A extremidade sinal (incluindo o heptamêro e o restante das RSS) não forma um grampo, gerando uma terminação abrupta na dupla hélice do DNA. A quebra da dupla hélice do DNA permite que um grampo fechado de um segmento codificador seja apostado ao grampo fechado da outra extremidade codificadora. As alças em grampo, então, se abrem nas junções de codificação e bases são adicionadas ou removidas, o que contribui para o aumento da diversidade do TCR. Após esse processo, proteínas de ligação são recrutadas e a dupla hélice do DNA reparada (ABBAS *et al*, 2008).

Figura 2. Rearranjo do TCR (Adaptado de Goldsby *et al*, 2002).

Durante alguns eventos de recombinação, a extremidade sinal pode sofrer um processo de circularização, formando um produto de excisão circular extra-cromossômico contendo duas RSSs ligadas (Geenen *et al*, 2003). O DNA circular formado durante a recombinação **V(D)J** é denominado TREC (do inglês - *T cell receptor excision circles* (Douek *et al*, 2000).

Um evento comum durante a recombinação da cadeia α do TCR é a deleção do locus δ da cadeia do TRC, o qual está inserido no locus da cadeia α . Essa deleção ocorre através do rearranjo específico entre δ Rec e ψ J α , e leva à geração de um TREC específico chamado de “signal joint”, presente em aproximadamente 70% das células T $\alpha\beta$ (Geenen *et al*, 2003; Madhok *et al*, 2005; Williams *et al*, 2007).

Figura 3. Formação do TREC durante a recombinação do receptor de células T (Hazenberg *et al*, 2001).

TRECs podem ser encontrados em timócitos e em células T maduras. Esses produtos não são duplicados durante a mitose da célula e consequentemente são diluídos durante a divisão celular (Livak & Schatz, 1996). Estudos anteriores sugerem que TRECs podem persistir por um longo período de tempo em células T maduras (Kong *et al*, 1999; Livak & Schatz, 1996) tornando sua detecção importante ferramenta para análise da atividade tímica. No entanto, vários fatores determinam a quantidade de TREC numa população de células T, tais como a divisão e morte celular, além da longevidade de células T *naïve* (Hazenberg *et al*, 2001).

Considerando-se as características acima mencionadas, a análise de TREC é uma ferramenta bastante utilizada na avaliação da reconstituição imunológica pós transplante de medula óssea e também serve como marcador de atividade tímica em doenças autoimunes como, por exemplo, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (LES).

O aumento de níveis de TREC ao longo do tempo foi observado em trabalhos que avaliaram a reconstituição imunológica pós transplante de medula óssea, os quais podem atingir os níveis encontrados em indivíduos saudáveis (Clave *et al*, 2009; Douek

et al, 2000; Talvensaari *et al*, 2002). Essa observação reforça a vantagem de utilizar esta técnica na avaliação da atividade tímica e também reconstituição imunológica.

Indivíduos que apresentam doenças autoimunes, como artrite reumatóide e esclerose múltipla apresentam menor quantidade de TREC no sangue periférico comparado a indivíduos saudáveis, porém esta quantidade não apresenta modificações significantes durante o curso de ambas as doenças, indicando imunossenescência precoce e relação com o desenvolvimento de autoimunidade (Thewissen *et al*, 2007).

Kayser *et al*, (2004) observaram que a quantidade de TRECs era menor em indivíduos com LES ativo quando comparada a indivíduos saudáveis. Especula-se que este fenômeno possa ser decorrente de atividade tímica reduzida ou devido à alta proliferação de células T na periferia desses pacientes.

Pacientes portadores de artrite juvenil idiopática apresentaram um menor número de células T CD4⁺ naïve (CD45RA⁺, CD62L⁺) e um aumento compensatório na quantidade de células T de memória (CD4⁺ CD45RO⁺). O número de TRECs nesses pacientes também estava diminuído em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo que essas células sofrem maturação precoce que provavelmente desequilibra a homeostase e contribui para o desenvolvimento da doença (Prelog *et al*, 2008).

Posteriormente mostrou-se que em indivíduos com esclerose múltipla células T CD4⁺ naïve (CD4⁺ CD45RA⁺) apresentaram níveis de TREC significativamente menores em comparação a indivíduos saudáveis e que estes níveis diminuía proporcionalmente o avanço da idade dos indivíduos. Estes achados indicam que pacientes com esclerose múltipla apresentam involução tímica precoce e, conseqüentemente, proliferação de células T periféricas por mecanismo homeostático compensatório, como principal fator de predisposição à auto-reatividade celular nesses pacientes (Duszczyszyn *et al*, 2010)

Em revisão recente (Zhang & Bhandoola, 2012), mostrou-se que a diminuição da quantidade de TRECs no sangue periférico de indivíduos saudáveis estava diretamente relacionada à senescência do sistema imunológico, sendo sua quantidade inversamente proporcional à idade.

Considerando-se que os achados relacionados à quantidade de TREC são importantes em doenças autoimunes, o presente trabalho, através da quantificação de TRECs no sangue periférico, visa trazer nova informação em relação à atividade tímica e patogênese na FR/DRC.

2. OBJETIVO

Avaliar a atividade tímica em pacientes com Febre Reumática / Doença Reumática Cardíaca através da quantificação dos círculos excisados pelo rearranjo dos genes do receptor de linfócitos T (TREC) em linfócitos T de sangue periférico.

3. MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

Foram analisadas amostras de sangue periférico de 35 pacientes com DRC e 8 pacientes com FR atendidos no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e avaliados por cardiologistas especializados com o acompanhamento clínico de no mínimo 1 ano.

Os dados clínicos dos pacientes estudados foram fornecidos pelos cardiologistas especializados em doenças valvulares e consultados através dos prontuários de cada um dos pacientes.

Como controles, utilizou-se 35 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (doadores de plaquetas voluntários da Fundação Pró-Sangue).

O procedimento de coleta de amostras de sangue foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração e Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob o número 0322/10 SDC 3453/10/042. O consentimento informado para participação no estudo foi assinado pelos pacientes e indivíduos saudáveis.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL

A extração de DNA genômico foi realizada pelo QIAamp DNA Blood maxi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) a partir de amostras de sangue total coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA, EXTRAÇÃO DE DNA

PLASMIDIAL E PREPARO DA CURVA PADRÃO

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP. Amostras do DNA plasmidial extraído foram aliquotadas, congeladas e enviadas para o Laboratório de Imunologia do InCor do HCFMUSP.

Os segmentos gênicos do TREC e da Albumina (gene utilizado como controle endógeno da reação) foram clonados em plasmídeos segundo o protocolo descrito por Douek *et al.* (1998). A cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa foi utilizada como receptora para a transformação e propagação dos plasmídeos. O vetor plasmidial contendo a sequência TREC possui 3888 pares de base, além do gene de resistência ao antibiótico kanamicina. O vetor plasmidial contendo o gene da albumina possui 3102 pares de base e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos plasmídeos contendo a sequência do TREC e da Albumina

	Tamanho do plasmídeo (pb)	Tamanho do inserto (pb)	Tamanho do genoma (pb)
TREC	3513	375	3888
ALBUMINA	3015	87	3102

Legenda: pb: pares de base

Os vetores foram misturados com as bactérias *E. coli* competentes e após 30 minutos de incubação em gelo, a mistura (vetor/bactéria) foi submetida à transformação por choque térmico a 42°C durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 300µL de meio de cultura SOC à mistura, seguido da incubação a 37°C durante 1 hora. As

bactérias foram então semeadas com a utilização de alças de vidro em placas de Petri contendo 35mL de meio de cultura LB Agar e o antibiótico ampicilina (na concentração de 1μL/mL de meio) ou kanamicina (na concentração de 0,5μL/mL de meio) previamente preparadas. Após a secagem, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e o antibiótico possibilitou a seleção das colônias transformadas (Figura 2). Colônias isoladas no meio sólido foram coletadas e cultivadas em 5mL de meio de cultura LB líquido com ampicilina ou kanamicina sob agitação constante a 37°C por 12-16 horas.

A extração do DNA plasmidial (TREC ou Albumina) das bactérias transformadas foi realizada com a utilização do reagente “QIAFilter Plasmid midi kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante.

Após extração do DNA, para avaliação da integridade e qualidade das amostras de DNA plasmidial, estas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de brometo de etídeo e quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000.

O marcador de peso molecular utilizado na eletroforese em gel de agarose foi o Phi-X174 (øX 174) digerido com Hae III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), o qual possui os seguintes fragmentos: 1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 281pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb e 72 pb.

Após a quantificação do DNA plasmidial extraído, a equação abaixo foi utilizada para se obter a massa da molécula de DNA plasmidial (tanto da Albumina como do TREC):

$$M = n \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/pb}$$

M = massa; **n** = tamanho do genoma (plasmídeo + inserto)

A partir da massa de cada molécula e da quantificação do DNA plasmidial, foi possível estabelecer o número de moléculas de DNA plasmidial por microlitro: $2,5 \times 10^{11}$ moléculas de TREC/ μL e $4,35 \times 10^{11}$ moléculas de Albumina/ μL .

O DNA plasmidial foi diluído em água de injeção para a concentração final de 2×10^9 moléculas de DNA plasmidial/ μL . A partir desta concentração “estoque”, diluições seriadas num fator de 1:10 foram feitas antes de cada reação de PCR em tempo real a fim de se obter o DNA plasmidial do TREC e da Albumina em diversas concentrações conhecidas (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 e 2×10^2 moléculas/ μL), as quais constituíram os pontos da curva padrão.

Para a construção dos pontos da curva foram utilizados 7 tubos de 1,5mL e em cada um foram adicionados 45 μL de água para injeção. Primeiramente, 5 μL do DNA na concentração estoque de 2×10^9 moléculas foram colocados no tubo número 1. Após 10 minutos de repouso, o tubo 1 foi submetido a uma centrifugação rápida em microcentrifuga e então 5 μL do DNA do tubo número 1 foi colocado no tubo número 2, e após 10 minutos de repouso e nova centrifugação rápida em microcentrifuga, 5 μL do DNA do tubo número 2 foi passado para o tubo número 3 e assim sucessivamente até se obter a concentração de 2×10^2 moléculas de DNA/ μL (Figura 1).

Figura 4. Esquema da diluição dos pontos da curva padrão utilizada nas reações de PCR em Tempo Real.

Após a eletroforese, uma reação de PCR em tempo real foi feita com os DNAs dos plasmídeos contendo os segmentos gênicos do TREC ou da Albumina, indicando que esses foram amplificados (Figura 5; Figura 6).

Figura 5. Curva de amplificação do gene TREC por PCR em tempo real.

Legenda: DNA extraído de plasmídeos contendo o gene TREC foi submetido à reação de PCR com sonda e oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene TREC.

Figura 6. Amplificação do gene Albumina por PCR em tempo real.

Legenda: DNA extraído de plasmídeos contendo o gene Albumina foi submetido à reação de PCR com sonda e oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene Albumina.

3.4 PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE TRECs

A quantificação absoluta do fragmento do TREC e do gene da Albumina (controle endógeno) nas amostras de DNA genômico extraído de sangue total dos pacientes com DRC/FR e dos indivíduos saudáveis foram analisados por PCR em Tempo Real, utilizando-se reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento utilizado para a reação foi 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores e das sondas TaqMan® foram previamente padronizadas, sendo a concentração de 200nM estabelecida tanto para os oligonucleotídeos iniciadores *forward* como para os *reverse* de ambos os genes, e a concentração de 120nM foi estabelecida para as sondas do TREC e da Albumina. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e das sondas são específicos para cada gene e estão mostradas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda do TREC

TREC	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: 5'CACATCCCTTTCAACCATGCT 3' R: 5'GCCAGCTGCAGGGTTTAGG 3'
Sonda:	FAM – ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT - MGB

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda da ALBUMINA

ALBUMINA	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: 5' TGCATGAGAAAACGCCAGTAA 3' R: 5' ATGGTCGCCTGTTACACAA 3'
Sonda:	FAM – TGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAA - MGB

Tanto para o gene alvo como para o gene endógeno, as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços próprias para a Reação de PCR em Tempo Real e as amostras foram preparadas em duplicata, utilizando-se para cada reação 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 0,6µL da sonda [5µM], 1µL do oligonucleotídeo iniciador *forward* [5µM], 1µL do oligonucleotídeo iniciador *reverse* [5µM], 1µL do DNA alvo [300ng/µL] e água de injeção q.s.p para 25 µL.

A ciclagem utilizada nas reações foi de 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto.

Para cada reação de PCR em Tempo Real foram preparadas as curvas padrões para o alvo (TREC) e para o controle endógeno (Albumina) utilizando-se diluições seriadas 1:10 obtidas a partir da concentração inicial de 2×10^9 cópias de moléculas de DNA/µL (conforme explicado anteriormente no item 3.3). As amostras das curvas padrões foram preparadas em triplicatas e as concentrações utilizadas foram de 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 e 2×10^2 moléculas de DNA (para o gene da Albumina) e de 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 e 1×10^2 (para o TREC).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TRECS

A determinação da intensidade de fluorescência das reações foi feita através do cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ = intensidade de emissão do FAM (5-Carboxifluorescein) maior que intensidade de emissão da fluorescência ROX (5-Carboxi-X-rhodamine) em um dado momento da reação, e Rn^- = intensidade de emissão do FAM menor que intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência é emitida pelo FAM conforme o componente repórter das sondas (específicas para o TREC e Albumina) é liberado durante cada ciclo de amplificação.

Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência de ROX maior que FAM). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base (*threshold*). O *threshold* deve ser posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação, em um ponto acima do ruído basal e abaixo da fase linear (platô final) da amplificação. O ciclo em que a amostra excede a fluorescência basal é chamado de **Ct** ou *Threshold Cycle* e estabelece a quantidade de DNA alvo presente na amostra. Para o TREC o *threshold* estabelecido foi de 0,098286, enquanto que para o gene da Albumina foi de 0,065693. Para a análise dos resultados foi utilizado o 7500 Software v 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que a partir do posicionamento escolhido para o *threshold* faz os cálculos referidos acima.

Após cada reação de PCR em Tempo Real e análise dos resultados, a quantidade de cópias do TREC obtida de uma determinada amostra, teve o resultado expresso em número de moléculas de TREC/ μ g de DNA genômico. A quantidade de DNA utilizada de todas as amostras dos pacientes e indivíduos saudáveis para as reações foi de 300ng e após a obtenção do resultado foi calculada a quantidade de cópias equivalentes a 1 μ g de DNA genômico. A albumina, utilizada como controle endógeno, é um gene constitutivamente expresso em todos os tipos celulares, utilizado para eliminar as diferenças na amplificação causadas por possíveis diferenças na quantificação de DNA.

3.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes diagnosticados com FR/DRC e de filtros de retenção de células utilizados em procedimento de aférese de plaquetas proveniente de doadores saudáveis. A coleta de amostras foi realizada por punção venosa, e o sangue colhido em tubos contendo heparina sódica. As amostras foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade, técnica descrita por Boyum (1974). Em resumo, após diluição 1:2 em solução salina (0,9% NaCl), as amostras foram centrifugadas sob gradiente de “Ficoll Hypaque” ($d=1,077$, Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia), a 1800rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. A nuvem de células na interface plasma – “ficoll-hypaque” foi então coletada com uma pipeta Pasteur, lavadas duas vezes com solução salina, ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, New York, USA) e contadas em câmara de Neubauer.

3.7 MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T NAÏVE E DE MEMÓRIA CD3 (PE.CY5), CD4 (PE), CD8 (APC), CD45RA (FITC), CD45RO (FITC) E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para o painel simples de subpopulações de células T *naïve* e de memória foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3 (PE.Cy5 – Becton Dickinson), CD4 (PE – Becton Dickinson), CD8 (APC – Dako), CD45RA (FITC – Becton Dickinson), CD45RO (FITC – Becton Dickinson).

A marcação das células foi realizada em placas de 96 poços com fundo “U”. Foram utilizadas aproximadamente 5×10^5 células por amostra. Foram transferidos 100µL da suspensão celular para cada poço da placa (o número de poços a ser preenchido depende do número de condições estabelecidas por amostra).

A placa foi centrifugada a 1500 rpm, 4°C durante 8 minutos para a formação do botão celular. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 170 µL de tampão MACS (0,5% de albumina bovina sérica e EDTA a 2mM), as células foram homogeneizadas brevemente em agitador do tipo Vortex para placas e em seguida foram submetidas a nova centrifugação para formação do botão de células.

Os anticorpos monoclonais foram utilizados em quantidades previamente padronizadas após a titulação dos mesmos. Foi feita uma mistura com os anticorpos utilizados (CD3, CD4, CD8 e CD45RA ou CD45RO). Foi pipetada a quantidade 2µL de cada um dos anticorpos e o volume final ajustado para 50µL adicionando-se tampão MACS (do inglês – *Magnetic Cell Sorting Buffer*). Após a adição da mistura de anticorpos, a placa foi mantida em ambiente refrigerado a 4°C e ao abrigo de luz durante 30 minutos.

Passados os 30 minutos de incubação foi realizada nova centrifugação a 1500 rpm, 4°C durante 15 minutos para a formação do botão celular. Após a centrifugação foram adicionados 170 µL de tampão MACS em cada uma das cavidades e homogeneizou-se manualmente com o auxílio de micropipetas. Foram realizadas mais duas centrifugações para lavar o botão celular sob as mesmas condições anteriores. Após a última lavagem, as células foram fixadas com 150 µL de paraformaldeído a 1%.

As células foram transferidas das cavidades para microtubos específicos para citometria e mantidas em ambiente refrigerado a 4°C ao abrigo de luz até o momento da aquisição. Foram adquiridos 10 mil eventos por condição do ensaio no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD). As análises foram realizadas pelo programa “FlowJo” versão 9.6.4 (Tree Star, USA).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados da quantificação absoluta do TREC e da citometria de fluxo dos pacientes com DRC em relação aos indivíduos saudáveis foi realizada através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney. O programa utilizado para as análises foi GraphPad®Prism versão 5.0

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO: PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA E DOENÇA REUMÁTICA CARDÍACA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As características fenotípicas dos pacientes foram analisadas através do gênero, idade e dados clínicos, fornecidos pelos cardiologistas colaboradores deste estudo (Tabela 5).

A média de idade dos pacientes com FR/DRC foi de $32,9 \pm 8,9$ anos, sendo 27 pacientes do sexo feminino e 16 do sexo masculino. Estes pacientes (n=43) foram diagnosticados com febre reumática, dos quais 35 apresentavam doença reumática cardíaca crônica. Dos pacientes que foram diagnosticados com doença reumática cardíaca, todos apresentavam insuficiência e estenose de válvula mitral (v.Mi) e os pacientes 1 e 3 também apresentavam insuficiência de válvula aórtica (v. Ao) e os pacientes 2 e 32 insuficiência de válvula tricúspide (v.Tr) (Tabela 5).

Todos os pacientes estudados não apresentavam outras doenças autoimunes ou processos que poderiam eventualmente influenciar de maneira direta nos resultados obtidos no presente trabalho.

Os indivíduos saudáveis foram caracterizados de acordo com o gênero e idade (Tabela 6). A média de idade dos indivíduos saudáveis foi de $38,2 \pm 13,2$ anos, sendo 15 do sexo feminino e 19 do sexo masculino. A média de idade foi semelhante entre os grupos comparados.

Tabela 4. Idade, dados clínicos e tempo de acompanhamento dos pacientes.

Identificação paciente	Gênero / Idade	Dados Clínicos	Acompanhamento (anos)
#1	M/27	DRC crônica; insuficiência v. Ao; dupla lesão * v.Mi	5
#2	F/37	DRC crônica; insuficiência de v.Mi e v. tricúspide	17
#3	M/40	DRC crônica; insuficiência v.Ao e v. Mi	16
#4	F/45	DRC crônica; dupla lesão v.Mi	16
#5	F/53	DRC crônica; estenose de v. Mi	≥ 1
#6	F/23	DRC crônica; dupla lesão de v. Mi	2
#7	F/25	DRC crônica; dupla lesão de v. Mi	3
#8	F/18	DRC crônica; dupla lesão de v. Mi	6
#9	F/28	DRC crônica, dupla lesão de v. Mi	≥ 1
#10	F/38	DRC crônica; insuficiência v. Mi	≥ 1
#11	M/20	DRC crônica; insuficiência de v. Ao e dupla lesão v. Mi	7
#12	M/40	DRC crônica; dupla lesão de v. Mi	≥ 1
#13	M/40	DRC crônica; insuficiência v. Ao e v. Mi	≥ 1
#14	M/46	DRC crônica, dupla lesão v. Mi	6
#15	M/28	DRC crônica, insuficiência v. Ao	≥ 1
#16	F/35	DRC crônica;dupla lesão v. Mi	≥ 1
#17	F/28	DRC crônica; insuficiência v. Ao; estenose de v. Mi	≥ 1
#18	F/57	DRC crônica; insuficiência v. Ao e Mi com dupla lesão	10
#19	M/41	DRC crônica; estenose de v. Mi	≥ 1
#20	F/23	DRC crônica; insuficiência moderada de v. Ao e. estenose v. Mi	4
#21	M/47	DRC crônica; insuficiência de v. Ao e dupla lesão v. Mi	18
#22	F/32	DRC crônica; dupla lesão v. Ao	≥ 1
#23	F/25	DRC crônica; insuficiência v. Ao e estenose v. Mi	16
#24	F/33	DRC crônica; insuficiência v. Mi	10

Identificação paciente	Gênero / Idade	Dados Clínicos	Acompanhamento (anos)
#25	F/29	DRC crônica; insuficiência v. Mi	≥ 1
#26	F/39	DRC crônica; insuficiência v. Ao e dupla lesão v. Mi	8
#27	F/32	DRC crônica; insuficiência v. Mi	23
#28	M/28	DRC crônica; insuficiência v. Ao e v. Mi, dupla lesão	15
#29	M/25	DRC crônica; insuficiência v. Ao e v. Mi, dupla lesão	14
#30	M/33	DRC crônica; insuficiência v. Ao e v. Mi, dupla lesão	7
#31	F/37	DRC crônica; insuficiência de v. Ao e v. Mi com dupla lesão	27
#32	F/41	DRC crônica; insuficiência v. Ao e dupla lesão de v. Mi,	33
#33	F/29	DRC crônica; insuficiência moderada v. Ao	21
#34	F/25	DRC crônica; insuficiência v. Ao e dupla lesão v. Mi,	17
#35	M/45	DRC crônica; estenose de v. Mi	≥ 1
#36	F/27	FR poliartrite	5
#37	M/27	FR	19
#38	F/36	FR	23
#39	M/27	FR	20
#40	M/24	FR	10
#41	F/21	FR	13
#42	F/31	FR	23
#43	F/29	FR	18

Legenda: M- masculino; F- feminino; **DRC** - Doença Reumática Cardíaca; **FR** - Febre Reumática; **v. Ao** - valva Aórtica; **v. Mi** - valva Mitral; * Dupla lesão - insuficiência e estenose valvular.

Tabela 5. Idade e gênero do grupo controle

Identificação	Gênero	Idade (anos)
#1	F	20
#2	F	22
#3	F	22
#4	F	26
#5	F	26
#6	F	27
#7	F	29
#8	F	38
#9	F	38
#10	F	39
# 11	F	42
#12	F	44
#13	F	55
#14	F	56
#15	F	60
#16	M	21
#17	M	24
#18	M	25
#19	M	27
#20	M	28
#21	M	29
#22	M	33
#23	M	33
#24	M	36
#25	M	36
#26	M	40
#27	M	43
#28	M	45
#29	M	48
#30	M	54
#31	M	55
#32	M	56
#33	M	59
#34	M	66

Legenda: M= masculino; F= feminino

4.2 PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO TREC E DA ALBUMINA

Para a padronização da curva padrão do TREC e do gene Albumina (controle endógeno), a amplificação de diferentes concentrações foi testada a partir da diluição (1:10) da concentração inicial de 1×10^9 moléculas de TREC ou 2×10^9 moléculas de Albumina. Foram selecionados cinco pontos, cujas concentrações variaram de 2×10^2 a 2×10^6 moléculas de DNA para o gene da Albumina e 1×10^2 a 1×10^6 para o TREC. As Figuras 6 e 7 mostram as curvas padrão do TREC e da Albumina respectivamente.

Além das concentrações da curva padrão, a eficiência e o *slope* (distância entre os pontos) da curva também foram padronizados, sendo utilizadas somente as curvas que apresentaram eficiência de 85 a 99 % e com *slope* de aproximadamente -3,5. O *threshold* também foi padronizado, sendo estabelecido o valor de 0,098286 para todas as curvas padrão do TREC e de 0,065693 para todas as curvas padrão da Albumina conforme mencionado anteriormente.

Figura 7. Curva Padrão do TREC gerada no 7500 Software v2.0.

Legenda: As letras indicam os pontos com a quantidade absoluta de cópias do TREC. (A) 1×10^6 moléculas (B) 1×10^5 moléculas (C) 1×10^4 moléculas (D) 1×10^3 moléculas (E) 1×10^2 moléculas. A linha azul indica o threshold assumido para as análises. Nesta curva padrão $Slope = -3,426$; $R^2 = 0,999$; Eficiência = 95,84%.

Figura 8. Curva Padrão do gene da Albumina gerada no 7500 Software v2.0.

Legenda: As letras indicam os pontos com a quantidade absoluta de cópias do gene da Albumina. (A) 2×10^6 moléculas (B) 2×10^5 moléculas (C) 2×10^4 moléculas (D) 2×10^3 moléculas (E) 2×10^2 moléculas. A linha verde indica o threshold assumido para as análises. Nesta curva padrão $Slope = -3,477$; $R^2 = 0,999$; Eficiência = 93,92%.

4.3 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO TREC

As amostras de DNA genômico foram extraídas a partir de amostras de sangue total dos pacientes e dos indivíduos saudáveis e a quantificação absoluta do TREC (número de moléculas/ μ g de DNA) foi realizada através da reação de PCR em Tempo Real.

A variável TREC nos grupos estudados foi considerada como distribuição anormal (teste de Shapiro-Wilk). A Tabela 7 apresenta o número de moléculas de TREC/ μ g de DNA (média $\pm$ desvio padrão) dos pacientes e dos indivíduos saudáveis analisados como grupo.

Tabela 6. Quantificação absoluta do TREC em sangue periférico de pacientes com FR, DRC e indivíduos saudáveis.

	Número de moléculas TREC/ μ g de DNA (mediana $\pm$ desvio padrão)	Menor e maior quantidade de moléculas de TREC no grupo
Pacientes FR/DRC	578,0 $\pm$ 654,4 *	49,3 / 2620,0
Indivíduos Saudáveis	1537 $\pm$ 1669	135,5 / 4913,9

FR= Febre Reumática; DRC = Doença Reumática Cardíaca; * ($p < 0.0001$) comparado com indivíduos saudáveis. Teste estatístico de Mann Whitney

Observamos que a mediana da quantidade absoluta de TREC/ μ g de DNA foi significativamente menor nos pacientes com DRC em relação aos indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$). Quando analisamos a mediana da quantidade de TREC/ μ g de DNA presente nos grupos estudados observamos que o grupo de pacientes com FR/DRC apresentou a mediana da quantidade de TREC de até aproximadamente três vezes menor, quando comparada com o grupo de indivíduos saudáveis.

Figura 9. Número absoluto de moléculas de TREC/ μg de DNA pacientes com FR/ DRC e de indivíduos saudáveis.

A correlação da quantidade de TREC com a idade nos pacientes com FR e com DRC foi efetuada pelo fato da quantidade de TREC em indivíduos saudáveis estar diretamente relacionada à idade dos mesmos, sendo esta relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a idade, menor a quantidade de TREC no sangue periférico.

Conforme esperado, os pacientes com FR e com DRC apresentaram a quantidade de TREC inversamente proporcional à idade (Figura 9). Observamos que diferentemente do perfil dos indivíduos saudáveis, nos pacientes houve menor dispersão, mostrando que apesar da variação da quantidade de TREC em relação à idade existir, a mesma não é tão evidente como nos indivíduos saudáveis (Figura 10).

Figura 10. Correlação entre a quantidade de TREC e a idade dos pacientes com FR e DRC.

Legenda: A quantidade de TREC mostrou-se inversamente correlacionada com a idade dos pacientes ($r = -0,3324$ com $p = 0,0294$; Correlação de Spearman).

Figura 11. Correlação entre a quantidade de TREC e a idade dos indivíduos saudáveis.

Legenda: A quantidade de TREC mostrou-se inversamente correlacionada com a idade ($r = -0,5160$ com $p < 0,01$; Correlação de Spearman).

Os indivíduos estudados também foram avaliados de acordo com 3 faixas etárias, como segue: **a)** de 18 a 30 anos de idade; **b)** de 31 a 40 anos de idade e **c)** acima de 40 anos de idade.

Observamos que independentemente da distribuição por faixa etária a quantidade de TREC/ μg de DNA encontrada no grupo de pacientes com FR/DRC manteve-se significativamente menor em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (Figura 11). Entretanto, é interessante notar que o número de moléculas de TREC foi dependente da faixa etária, indicativo de diminuição em função do envelhecimento tanto nos pacientes como nos indivíduos saudáveis.

Figura 12. Número absoluto de moléculas de TREC/ μg de DNA pacientes com FR/DRC e de indivíduos saudáveis agrupados por faixa etária.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T CD4+CD45RA+, CD8+CD45RA+, CD4+CD45RO+ E CD8+CD45RO+

Para quantificação do número de células T *naïve* e de memória foram realizadas as análises dos marcadores CD45RA e CD45RO em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico (Figura 12).

A análise da expressão de células T *naïve* e de memória foi realizada em 19 amostras de pacientes com FR/DRC (#1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23) e em 21 amostras de indivíduos saudáveis (# 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 26, 27, 29).

Tabela 7. Média e desvio padrão da frequência total de células T *naïve* e de memória em cada grupo estudado.

	CD4 ⁺ (%)		CD8 ⁺ (%)	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Saudáveis	9,225 ± 5,91	9,44 ± 4,34	3,53 ± 2,85	1,17 ± 1,89
FR/DRC	9,067 ± 6,46	7,38 ± 5,17	3,35 ± 2,54	0,49 ± 0,35

CD45RA⁺, Células T *naïve*; CD45RO⁺, Células T de memória.

Não houve diferença entre a frequência do total de células T CD4⁺ e T CD8⁺ *naïve* e de memória avaliadas por citometria de fluxo entre os grupos estudados.

Figura 13. Análise de citometria de fluxo de uma amostra representativa utilizando o software FlowJo versão 9.6.4.

Legenda: A) Seleção de linfócitos a partir dos parâmetros de tamanho e complexidade; B) Seleção de células T CD3⁺; C) Seleção de células T CD4⁺; C 1) Seleção de células T CD4⁺ CD45RA⁺; C 2) Seleção de células T CD4⁺ CD45RO⁺; D) Seleção de células T CD8⁺; D 1) Seleção de células T CD8⁺ CD45RA⁺; D 2) Seleção de células T CD8⁺ CD45RO⁺.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram de forma pioneira que atividade tímica em pacientes com doença reumática cardíaca está alterada. Observamos que o número de moléculas de TREC no sangue periférico dos pacientes em comparação a indivíduos saudáveis está diminuído. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o processo infeccioso inicial pelo *S. pyogenes* e que desencadeia FR/DRC pode interferir na ontogênese de linfócitos T agindo diretamente sobre eventos que influenciem na modificação da quantidade de TRECs.

A participação principalmente do linfócito T, é efetiva na imunopatogênese da FR/DRC, e estas células são as principais responsáveis pelo reconhecimento cruzado entre a proteína M do *S. pyogenes* e proteínas principalmente do tecido cardíaco (Fae et al, 2005; Guilherme et al, 1995). Estes resultados mostraram alterações no repertório de linfócitos T pelas identificações de expansões oligoclonais (Guilherme et al, 2000)) e perturbações no tamanho da região do CDR3 que é responsável pelo reconhecimento antigênico.

O estudo do repertório de linfócitos T aliado à quantificação de TRECs pode fornecer uma visão geral sobre a homeostase de células T. Anteriormente verificamos que no sangue periférico o repertório de linfócitos T de pacientes com DRC apresentava algumas alterações na clonalidade, porém não consideradas significantes, enquanto que o repertório de linfócitos T de clones derivados de lesões cardíacas mostrou padrão oligoclonal de distribuição de determinadas famílias VB e JB do receptor de linfócitos T e tamanhos de CDR3 alterados (Fae et al, 2006; Guilherme et al, 2000). Observamos que estes clones eram capazes de reconhecer de maneira cruzada antígenos próprios e epítomos da proteína M, do estreptococo do grupo A, região N-terminal e, além disso encontramos alterações na sequência de aminoácidos da região (CDR3) que abriu a

hipótese de que o reconhecimento de antígenos do tecido cardíaco ocorre devido a estas alterações (Fae *et al*, 2005). Conjuntamente, estes dados mostraram que estas alterações estavam relacionadas com o desenvolvimento de autoimunidade órgão-específica. Os achados do presente trabalho são inéditos na FR/DRC e reforçam o papel do timo na seleção do repertório de células T maduras e que as alterações observadas provavelmente influenciam no desencadeamento das lesões reumáticas.

Apesar das alterações encontradas provavelmente exercerem influência sobre o desencadeamento das lesões cardíacas, não observamos alterações no número de moléculas de TREC entre pacientes com e sem lesão, diferentemente do observado em outras doenças autoimunes, como, por exemplo, na artrite idiopática juvenil (AIJ). Nesta patologia foi observado diferença na quantidade de TRECs em pacientes que apresentavam AIJ classificada como pauciarticular, que apresentavam maior número de moléculas TRECs em células do líquido sinovial quando comparados a pacientes com a forma poliarticular da AIJ evidenciando que esta alteração poderia estar diretamente ligada ao fenótipo da doença (Amariglio *et al*, 2011). Em outro estudo com LES Vieira *et al.*, (2008), verificaram diferenças na quantidade de moléculas de TREC entre pacientes que apresentavam a forma ativa e a inativa da doença, sendo os níveis de TREC detectados em linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ significativamente menores nos pacientes com a forma ativa do LES em comparação à aqueles com forma inativa.

Conforme mencionado anteriormente, no presente trabalho, não observamos diferenças na quantidade de TREC entre os pacientes com FR sem cardite reumática em relação aos portadores de DRC, os quais já apresentavam lesões valvulares, indicativo de que as alterações no número de moléculas de TREC independem da evolução clínica da doença.

A atividade tímica em doenças autoimunes é comumente abordada pelo perfil de subpopulações de linfócitos T de memória e *naïve* no sangue periférico e mais recentemente pela quantificação de TRECs. Em pacientes com artrite reumatoide verificou-se menor número de células T CD4⁺ *naïve* (CD45RA⁺ CD62L⁺) em comparação a indivíduos saudáveis. Interessantemente, estes resultados condizem com a quantificação de TRECs que foi baixa no sangue periférico dos pacientes estudados Ponchel *et al*, (2002). Já no trabalho de Prelog *et al*, (2008) em pacientes com artrite idiopática juvenil, além de verificar a quantidade de TRECs em células T *naïve*, também foi avaliada a presença do marcador Ki-67. Este marcador está relacionado ao índice mitótico, e a erosão de telômeros, ambos aumentados, enquanto que a quantidade de TREC estava diminuída em relação a controles sadios. O conjunto destes dados permitiu aos autores concluir que na artrite idiopática juvenil os pacientes eram acometidos por um envelhecimento precoce do sistema imunológico, e que este processo poderia contribuir de maneira direta na patogênese da artrite idiopática juvenil.

No presente trabalho, não observamos diferenças significativas no número de células T *naïve* e de memória entre os pacientes e os indivíduos saudáveis, diferentemente do que comumente se observa em outras patologias autoimunes. Células T que expressam o fenótipo *naïve* não são, necessariamente, marcadores precisos da função tímica, uma vez que depois da emigração, linfócitos T CD45RA⁺ podem permanecer em um longo período quiescente ou podem rapidamente se converter em linfócitos T CD45RO⁺ (efetores e de memória). Além disso, algumas células T de memória podem voltar a expressar marcadores do fenótipo *naïve*. Este fenômeno foi observado no trabalho de (Douek *et al*, 2000) em avaliação de reconstituição imunológica em pacientes que passaram por transplante autólogo de células tronco.

Não analisamos as diferentes subpopulações efetoras e reguladoras linfocitárias nos pacientes estudados, assim não sabemos se outras subpopulações linfocitárias encontram-se alteradas.

Considerando-se os trabalhos mencionados acima, a quantificação de TRECs no sangue periférico representa um método mais eficiente para avaliar a produção tímica em casos de avaliação da reconstituição imunológica e em doenças autoimunes.

Outro aspecto interessante, na variação da quantidade de TREC presente no sangue periférico de indivíduos saudáveis é o fato de correlacionar-se inversamente com a idade, por isso, além de ser considerada uma ótima ferramenta na análise de atividade tímica a quantificação de TRECs é utilizada também como ferramenta para avaliação da imunosenescência.

Nem sempre o envelhecimento biológico caminha de forma pareada ao envelhecimento cronológico, por isso, vários estudos sobre o envelhecimento imunológico vêm sendo realizados. Além de modificações importantes no compartimento de células T, ocorrem várias outras modificações, tais como menor ativação das células apresentadoras de antígenos, maior expressão de moléculas de adesão, diminuição da produção de IL-2 e consequente diminuição de proliferação de linfócitos T, dentre outras modificações importantes (Alonso-Fernandez & De la Fuente, 2011). As modificações observadas no processo de imunosenescência refletem diretamente na maneira como as células T se comportam e desempenham seu papel, por isso, a chance de desencadear doenças autoimunes após determinada idade é muito aumentada.

No entanto, mesmo observando-se queda no número de precursores tímicos e timócitos em indivíduos senis (Aw *et al.*, 2007), é possível detectar a persistência de células T TREC⁺ no sangue periférico destes indivíduos, que representam, de maneira

geral células recentemente emigradas do timo com TCR recém rearranjado. Neste trabalho, as células foram testadas e em resposta a estímulos de moléculas co-estimulatórias como CD3 e CD28 houve o aumento de marcadores de ativação (CD25 e CD69), concluindo que o timo senil fica ativo, podendo contribuir com células T funcionais.

Ressaltamos o fato de que independentemente da faixa etária o grupo de pacientes apresentou a quantidade de moléculas de TREC inversamente proporcional à idade ($r = -0,3324$ com $p = 0,03$) bem como os indivíduos saudáveis, porém esta correlação inversa foi mais forte nos indivíduos saudáveis ($r = -0,5160$ com $p < 0,01$). Este achado reforça a hipótese de que os componentes da patogênese da FR/DRC podem influenciar diretamente na maneira como os linfócitos T se comportam, já que a média de idade entre o grupo de pacientes foi semelhante em relação ao grupo de indivíduos saudáveis o que nos possibilitou analisar de maneira fidedigna os resultados aqui discutidos. Apesar de em ambos os grupos a correlação entre quantidade de TREC e idade serem negativa, ao observarmos a dispersão das amostras notamos que no grupo de pacientes ocorre menor dispersão em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. No entanto, este fato pode indicar que apesar dos pacientes passarem pelo processo de imunosenescência fisiológica decorrente da idade, existe algo a mais que pode acelerar o envelhecimento celular e/ou estas células sofram intensa proliferação no sangue periférico em resposta ao processo inflamatório desencadeado por uma resposta autoimune ao *S. pyogenes* presente na FR/DRC. Esta premissa tem suporte no fato de que os valores brutos de moléculas de TREC/ μg de DNA encontravam-se de 10 a 100 vezes diminuídos nos pacientes quando comparados aos valores encontrados em indivíduos saudáveis.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho indicam que alterações na atividade tímica influenciam no papel do repertório de linfócitos T e, portanto, no reconhecimento antigênico. No caso da FR e DRC, o reduzido número de moléculas de TREC provavelmente está relacionado com as populações de linfócitos T recém-emigradas do timo e que provavelmente desempenham atividade autorreativa e delineiam o perfil autoimune da FR e DRC.

6. CONCLUSÕES PONTUAIS

- A quantificação de TRECs mostrou ser uma boa ferramenta para análise de atividade tímica;
- Indivíduos portadores de FR e DRC apresentaram alterações significativas no número de moléculas de TREC no sangue periférico, sendo o número absoluto de moléculas significativamente menor em comparação a indivíduos saudáveis;
- A presença de cardite reumática não influenciou no número de moléculas de TREC presente nos pacientes;
- Em todos os grupos estudados a quantidade de TREC foi inversamente proporcional à idade, porém, esta correlação mostrou-se mais forte nos indivíduos saudáveis;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S (2008) *Imunologia Celular e Molecular*, Rio de Janeiro: Elsevier.

Alonso-Fernandez P, De la Fuente M (2011) Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci* 4: 78-100

Amariglio N, Klein A, Dagan L, Lev A, Padeh S, Rechavi G, Berkun Y, Somech R (2011) T-cell compartment in synovial fluid of pediatric patients with JIA correlates with disease phenotype. *J Clin Immunol* 31: 1021-1028

Azevedo PM, Bauer R, Caparbo Vde F, Silva CA, Bonfa E, Pereira RM (2010) Interleukin-1 receptor antagonist gene (IL1RN) polymorphism possibly associated to severity of rheumatic carditis in a Brazilian cohort. *Cytokine* 49: 109-113

Barbosa PJB (2009) Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da Sociedade Brasileira de Pediatria e da Sociedade Brasileira de Reumatologia. *Arq Bras Cardiol* 93: 1-18

Bryant PA, Robins-Browne R, Carapetis JR, Curtis N (2009) Some of the people, some of the time: susceptibility to acute rheumatic fever. *Circulation* 119: 742-753

Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 5: 685-694

Clave E, Busson M, Douay C, Peffault de Latour R, Berrou J, Rabian C, Carmagnat M, Rocha V, Charron D, Socie G, Toubert A (2009) Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 113: 6477-6484

Costa LP, Domiciano DS, Pereira RMR (2009) Demographic, clinical, laboratorial, and radiological characteristics of rheumatic fever in Brazil: systematic review. *Rev Bras Reumatol* 49: 617-622

Cunningham MW (2004) T cell mimicry in inflammatory heart disease. *Mol Immunol* 40: 1121-1127

Dajani AS AE, Bierman FZ, Bisno AL, Deny FW, Durack DT (1992) Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association. *JAMA* 268: 2069-2073

Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA (2000) Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355: 1875-1881

Duszczyszyn DA, Williams JL, Mason H, Lapierre Y, Antel J, Haegert DG (2010) Thymic involution and proliferative T-cell responses in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221: 73-80

Fae KC, da Silva DD, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Douay C, Charron D, Toubert A, Cunningham MW, Kalil J, Guilherme L (2006) Mimicry in recognition of cardiac myosin peptides by heart-intralesional T cell clones from rheumatic heart disease. *J Immunol* 176: 5662-5670

Fae KC, Oshiro SE, Toubert A, Charron D, Kalil J, Guilherme L (2005) How an autoimmune reaction triggered by molecular mimicry between streptococcal M protein and cardiac tissue proteins leads to heart lesions in rheumatic heart disease. *J Autoimmun* 24: 101-109

Faé K, Palacios SA, Nogueira LG, Oshiro SE, Demarchi LM, Bilate AM, Pomerantzeff PM, Brandão C, Thomaz PG, dos Reis M, Sampaio R, Tanaka AC, Cunha-Neto E, Kalil J, L G (2013) CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. *Inflammation* 36: 11

Geenen V, Poulin JF, Dion ML, Martens H, Castermans E, I Hansenne, Moutschen M, Sékaly RP, Cheynier R (2003) Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol* 176: 305-311

Goldsby R, Kindt T, Osborne B (2002) *Kuby - Imunologia*.

Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, et al. (1995) Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 92: 415-420

Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, Oshiro SE, Aliotti S, Cunha-Neto E, Pomerantzeff PM, Tanaka AC, Kalil J (2004) Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol* 165: 1583-1591

Guilherme L, Dulphy N, Douay C, Coelho V, Cunha-Neto E, Oshiro SE, Assis RV, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Charron D, Toubert A, Kalil J (2000) Molecular evidence for antigen-driven immune responses in cardiac lesions of rheumatic heart disease patients. *Int Immunol* 12: 1063-1074

Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, Kalil J (2005) Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med* 7: 1-15

Guilherme L, Kalil J (2010) Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol* 30: 17-23

Guilherme L, Kohler KF, Kalil J (2011a) Rheumatic heart disease: mediation by complex immune events. *Adv Clin Chem* 53: 31-50

Guilherme L, Köhler KF, Postol E, Kalil J (2011b) Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. *Ann Pediatr Cardiol* 4: 13-21

Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowsky R, Kalil J (1991) Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation* 83: 1995-1998

Hazenber MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ (2001) T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)* 79: 631-640

Kaplan EL (1996) Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics* 97: 945-948

Kayser C, Alberto FL, da Silva NP, Andrade LE (2004) Decreased number of T cells bearing TCR rearrangement excision circles (TREC) in active recent onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13: 906-911

Kemeny E, Grieve T, Marcus R, Sareli P, Zabriskie JB (1989) Identification of mononuclear cells and T cell subsets in rheumatic valvulitis. *Clin Immunol Immunopathol* 52: 225-237

Kong FK, Chen CL, Six A, Hockett RD, Cooper MD (1999) T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1536-1540

Lancefield RC (1933) A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J Exp Med* 57: 571-595

Livak F, Schatz DG (1996) T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 16: 609-618

Madhok AB, Chandrasekran A, Parnell V, Gandhi M, Chowdhury D, Pahwa S (2005) Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 563-565

Narula J, Chandrasekhar Y, Rahimtoola S (1999a) Diagnosis of active rheumatic carditis. The echoes of change. *Circulation* 100: 1576-1581

Narula J, Virmani R, Reddy K, Tandon R (1999b) Rheumatic Fever. *Washington: american Registry of Pathology* 1 ed

Ponchel F, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch M, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan P, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD (2002) Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood* 100: 4550-4556

Prelog M, Schwarzenbrunner N, Sailer-Hock M, Kern H, Klein-Franke A, Ausserlechner MJ, Koppelstaetter C, Brunner A, Duftner C, Dejaco C, Strasak AM,

Muller T, Zimmerhackl LB, Brunner J (2008) Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2153-2162

Raizada V, Williams RC, Jr., Chopra P, Gopinath N, Prakash K, Sharma KB, Cherian KM, Panday S, Arora R, Nigam M, Zabriskie JB, Husby G (1983) Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cell antibodies. *Am J Med* 74: 90-96

Ramasawmy R, Fae KC, Spina G, Victora GD, Tanaka AC, Palacios SA, Hounie AG, Miguel EC, Oshiro SE, Goldberg AC, Kalil J, Guilherme L (2007) Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever. *Mol Immunol* 44: 1873-1878

Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJ, Grinberg M, Tarasoutchi F, Kalil J, Guilherme L (2008) Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin Vaccine Immunol* 15: 932-936

Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K (1993) Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11: 729-766

SNUSTAD P, SIMMONS MJ (2008) *Fundamentos de Genética*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Talvensaari K, Clave E, Douay C, Rabian C, Garderet L, Busson M, Garnier F, Douek D, Gluckman E, Charron D, Toubert A (2002) A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* 99: 1458-1464

Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, Damoiseaux J, Stinissen P (2007) Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol* 123: 209-218

Williams KM, Hakim FT, Gress RE (2007) T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 19: 318-330

Zhang SL, Bhandoola A (2012) Losing TREC with Age. *Immunity* 36: 163-165

Ref. carta datada de 16.08.10

A

Comissão Científica do InCor

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.10.10, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 0322/10, intitulado: "Vacina contra o *Streptococcus pyogenes*: avaliação da modulação da resposta imune em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis e em pacientes portadores de febre reumática.", contempla o sub-projeto intitulado "Febre Reumática: Quantificação de Fragmentos Circulares Excisados pelo rearranjo do TCR em Linfócitos T de Sangue Periférico", que será Dissertação de Mestrado da Nathália Moreira Santos, tendo como orientadora Profa. Dra. Luiza Guilherme Guglielmi.

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Luiza Guilherme Guglielmi

CAPPesq, 27 de Outubro de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO20/10/10