Flavio Ferraz de Paes e Alcantara

**Febre reumática: um modelo animal
para uma vacina humana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia

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

Co-Orientador: Dr. Jorge Kalil Filho

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alcantara, Flavio Ferraz de Paes e

Febre reumática : um modelo animal para uma vacina humana / Flavio Ferraz de Paes e Alcantara. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Co-orientador: Jorge Kalil Filho.

Descritores: 1.Febre reumática 2.Streptococcus pyogenes 3.Ratos endogâmicos
Lew 4.Nódulo reumático 5.Mimetismo molecular

USP/FM/SBD-186/06

Dedicatória

Só a verdade lhe libertará

Para todos aqueles que estão na ciência
onde a busca da verdade é um fim e um meio.

**O amor é paciente
O amor é gentil
Não é ciumento, não se envaidece, não é rude.
Não busca seu próprio interesse, não se exaspera.
Não se felicita do mal, não se satisfaz com a injustiça,
Mas se alegra com a verdade.
Suporta a tudo, tudo crê, tem esperança em tudo.
O amor nunca falha.**

A todos aqueles que me amaram e acreditaram em mim

Esta tese representa um sonho de dez anos. Um sonho tornado realidade

Um cientista escocês, me disse que em toda os problemas científicos, mesmo os mais difíceis, há sempre uma saída. Se você não vê a saída, não é porque ela não existe, mas sim porque você ainda a procurou o suficiente.

Nunca desista. Boas coisas acontecem, a todos aqueles que esperam.

Agradecimentos

A Deus,

Que sempre me deu oportunidades, e soube perdoar minhas falhas.

Fazendo-me levantar quando eu já havia desistido da caminhada.

A minha família,

A meu primeiro professor, meu pai. Inspirou-me em minha busca.

Sempre esteve a meu lado, apoiando, e se entusiasmando com minhas empolgações científicas e pessoais.

A minha mãe, que com seu amor sempre fez tudo a seu alcance pelos seus filhos.

Afligia-se junto com minhas frustrações, e se felicitava com minhas conquistas.

Ao meu irmão Marcelo, com quem tenho uma ligação muito especial, que esteve sempre ao meu lado mesmo sem sabê-lo.

A minha irmã Estela, que várias vezes me cedeu abrigo e alimento, para o corpo e alma.

A minha irmã Renata, obstinada e talentosa.

A minha sobrinha preferida e amada Sofia.

A minha madrinha Camila Ferraz e a meu padrinho Carlos Ferraz, pelo apoio em todos os momentos.

A meus avós Estela e Francisco, o exemplo de uma vida a dois.

Onde nos momentos mais difíceis, minha alma e pensamentos sempre encontravam conforto.

Amigos e pessoas que contribuíram em minha formação pessoal

A Roberto de Carvalho e família, o amigo de uma vida.

À sua filha, minha afilhada, Amanda

A Emanuela Bonfocco, uma cientista que me ensinou a importância de perseverar em busca dos sonhos.

A Ursula Möhrle, pelo exemplo de um amor.

A amigos fiéis, neste anos de ciência Érika Botelho, Patrick Hassler e Tânia Lohman, Susan She, Gilberto Andrade, Joaquim Junqueira, Andréas Niethamer, Patrik Shami, Mike McMahon, Bernhard Hildebrandt, Kathy Woessner, John Hammel, Hong Tang, e tantos outros...

A uma futura companheira.

Aos meus professores, orientadores, mestres na vida e na ciência.

A minha orientadora, Professora Doutora Luiza Guilherme Guglielmi, que apostou no meu trabalho desde o início. Uma orientadora que sempre me deu a liberdade para escolher os caminhos a trilhar e suporte em minhas escolhas. Revelou-se uma amiga presente nos momentos mais difíceis.

Uma mulher confiante e otimista. Uma mulher admirável.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Jorge Kalil Filho, um líder de visão. Sempre aberto a novos pesquisadores e novas idéias, trafegando com desenvoltura entre a ciência básica e a aplicação clínica. Capaz aglutinar as pessoas das mais variadas em torno de sua visão. Um homem à frente de seu tempo.

Ao meu co-orientador direto, Doutor Edilberto Postol. Trouxe orientação e uma experiência valiosa. Ensinou-me mais que a trabalhar com animais de laboratório. Investiu longas horas e intenso esforço. Presente através de quase todos os aspectos do projeto. Primeiro corretor dos textos e idéias. Um cientista de classe, um ser humano exemplar. Um amigo.

Pessoas que contribuíram diretamente com este trabalho.

A mestre Raquel E. Alencar, presente nas horas mais necessárias, pelo tempo que fosse preciso, sempre com uma boa vontade inabalável.

Fabio Higa, uma aquisição mais tardia ao projeto, mas não menos imprescindível. Um conselheiro em momentos de tensão, com bom senso e bom humor.

Aos patologistas do InCor:

Dra Raimunda Violante de Assis “in memoriam”

Dra. Lea B Demarchi, sempre pronta para auxiliar, e profundamente entusiasmada com o projeto.

Dr. Paulo Gutierrez, não apenas fez análises criteriosas das laminas, mas também acrescentou sua experiência e amizade. Um cavalheiro.

Sandra Emiko Oshiro, a amiga desde a primeira hora. Estabeleceu as condições para o tão difícil crescimento de células de rato. Sempre solícita e dedicada.

Doutor Ernesto Luna, um cientista rico em idéias, sugeriu o uso da miosina, como controle, esteve presente não apenas em discussões que contribuíram nos experimentos, mas um amigo pessoal.

Aos colegas do Biotério do Instituto de Medicina Tropical,
Luís Roberto, e Carlinhos, sem o seu valioso trabalho, o meu não seria possível.

Doutora Samar Freschi, a valiosa companheira de bancada, colaborou no seqüenciamento das cepas de pyogenes.

A Roberta Santana, que ajudou na produção das proteínas recombinantes, uma mão confiável, e uma amiga para todos os dias.

A Rajen, orientou na clonagem em otimização de PCRs, na redação de cartas para pedir reagentes no exterior, em tudo mais ao seu alcance.

A doutora Cristina Caldas, que colaborou na produção e purificação das proteínas recombinantes e nos ensaios de dosagem do LPS, uma cientista de classe.

A Doutora Angelina Bilate, eterna colega, abriu o meu caminho para o uso de um modelo animal, sempre auxiliando com inúmeras sugestões, materiais para uso animal. Uma grande amiga. e uma companhia sempre agradável.

Ao mestrando Gabriel Victora, ajudou nas análises estatísticas, mas também nas conversas, um pensador e futuro grande cientista.

Professor José Krieger, que sempre abriu seu laboratório e facilitou a troca de reagentes e idéias. A todo pessoal de seu laboratório: Claudia Becker, que cedeu inúmeros animais para os trabalhos iniciais, Maria de Lourdes (Maúde) colaborou com o tudo que pedimos, Gustavo, Ayumi, Márcio e outros

Ao colega doutor Guilherme Spina, que me abriu a oportunidade de atender pacientes com febre reumática, instigando questões para o trabalho científico.

A doutora Flavia Rossi, que abriu as portas de sua coleção de *S. pyogenes* e iniciou uma colaboração duradoura.

Professor Doutor Luís Vicente Rizzo, quem me indicou para o Laboratório de Imunologia, e que investiu seu tempo e esforço pessoal me ensinando a realizar testes de hipersensibilidade tardia nos animais. Cientista de respeito, uma referência dentro e fora da bancada.

A Sandra Maria, que além de sempre cooperativa , ajudou nas análises em FACS (dados não mostrado).

CNPq. grande parte do trabalho foi realizado com bolsa.

InCor - HC.FMUSP forneceu auxílio logístico e apoio para um congresso

Pessoas que contribuíram indiretamente com o trabalho.

Professora doutora Ana Carla Goldberg, a primeira pessoa a ler o meu projeto, sempre fazendo sugestões e críticas pertinentes.

Professor doutor Edécio Cunha-Neto por suas palavras amigas e abertura para conversas.

Doutora Verônica Coelho por sua atenção contundente dos trabalhos realizados

Mestre e doutorando Adalberto Socorro Silva, o amigo sempre confiável e confidente. Referência de bom senso e bom comportamento. A ciência brasileira lhe aguarda ansiosa.

Doutor Leo Kei Iwai, um amigo dentro e fora do laboratório, incansável trabalhador, fez pelo bem do grupo, dentro e fora do laboratório.

A doutora Simone Fonseca, que sempre esteve aberta a discussões científicas, se mostrou uma amiga para todos os momentos.

A doutoranda Lin, uma amiga e companheira em discussões científicas e pessoais.

Ao senhor Jair Muro, não apenas prestativo, mas com um humor, que poucos alcançam. Certamente um grande defensor do laboratório e de suas riquezas.

A doutoranda Karen Kohler, que embora recém chegada, já contribuiu na correção da tese.

A doutora Kellen Faé, que tanto se dispôs a colaborar.

A todos outros os membros da família do Laboratório de Imunologia do InCor:

Aos colegas de bancada, doutora Beatriz Stolf, uma voz de paz mesmo em meio a tempestades. Mestre e doutoranda Geórgia Porto, uma cientista inteligente e dedicada. Letícia, que se mostrou sempre colaborativa, e amiga. A doutoranda Rosemeire uma companheira dedicada e perseverante. Também agradeço a Selma Alioti, Iolanda, Simone, Andréia, Natali, Adriana, Evelyn, Carol, Priscila, Susan. A Raimunda, dona Aurora, Sérgio.

A todos outros os membros do Laboratório de Histocompatibilidade e do Laboratorio de Imunologia do InCor e da Alergia

Ao doutor Nicolas, uma das aquisições importadas e importantes, Elcio, Carlos Sergio, Claudia, Germano, entre outros.
Ruthe, Carlos (Alergia), Dona Santinha, Elza,

A todos os membros da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e membros do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP

Ao Professor Doutor Fabio Morato de Castro, em nome de todos os membros do Serviço e Disciplina, um profissional a altura do serviço, e ainda um amigo.
Aos doutores Abílio Motta, Luís Augusto, Kald, Mirthes Barros, Pedro Bianchi, Cristina Kokron, Andrea Cohon, Clóvis, Gustavo, Glacus, Fanny, entre outros.

Pessoas que contribuíram em minha formação científica

Ao Doutor Luís Antonio da Silva, “tio Gigio”, a primeira pessoa a me instigar o gosto pela ciência. Ainda me lembro que me deu uma assinatura da uma revista científica da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência.

Ao Doutor Alberto Augusto Gonçalves, meu primeiro professor em imunologia. A quem ainda ligo com dúvidas na prática diária.

Ao mestre Hélio Caiaffa, a primeira pessoa que me inspirou o desejo em conhecer a Biologia Molecular. Com quem tive o prazer de voltar a trabalhar e conviver. Um líder inteligente e sensato, com um humor ímpar.

Ao doutor Robert Nakamura, que me abriu as portas para a pesquisa, me convidando para ir a Califórnia, no laboratório de seu amigo Eng Tan.

Ao Professor Doutor Eng Tan, pesquisador de respeito e fama conquistada por excelente trabalho, um homem de inspiração científica.

doutor Robert Ochs, meu primeiro orientador nos EUA, e aos doutores Robert Rubin e Michael Pollard, Ed Chan meus orientadores oficiosos no laboratório de Eng Tan.

A Alan McLachlan, um grande orientador, a quem devo a oportunidade de aprender como uma ciência tão apaixonante como a Biologia Molecular.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Febre Reumática e a Cardiopatia Reumática	1
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Anátomo Patologia Cardíaca.....	5
1.4 O Agente	7
1.5 Estrutura da proteína M, do gene emm, família emm, e do locus emm.....	8
1.6 A resposta imune contra a proteína M	11
1.7 Febre reumática: uma doença auto-imune	13
1.8 Modelos Animais em Febre Reumática	16
2. Objetivos	20
3. Material e Métodos	21
3.1. Streptococcus pyogenes	21
3.1.1. Obtenção de Amostras Clínicas de <i>S. pyogenes</i>	21
3.1.2. Extração do DNA de <i>S. pyogenes</i>	21
3.1.3. PCR para gene <i>emm</i>	22
3.1.4. Padronização do Sequenciamento do gene <i>emm</i>	23
3.1.5. Sequenciamento Gênico e Alinhamento	23
3.2. Produção das Proteínas Recombinantes.....	24
3.2.1. Clonagem	25
3.2.2. Expressão e Purificação	27
3.2.3. Concentração e Quantificação das Proteínas Recombinantes.....	29
3.2.4. Preparação de Extratos e Solução de Proteínas para SDS-PAGE.....	29
3.2.5. Remoção e Dosagem de Lipopolissacarídeo (LPS)	30
3.2.6 Teste de endotoxina por LAL (<i>Limulus</i> Amebocyte Lysate) cromogênico QCL1000	31
3.3. Animais	31
3.3.1. Procedência e Manutenção.....	31
3.3.2. Imunizações	32
3.4. Avaliação das Respostas Imunes	33
3.4.1. Ensaio de proliferação celular.....	33
3.4.2. Detecção de Anticorpos	34
3.4.2.1. Amostras de soro.....	34
3.4.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immune Sorbent Assay).....	35
3.4.2.3. Western Blotting	35
3.4.3. Obtenção de linhagens de linfócitos infiltrantes do tecido cardíaco de ratos Lewis	36
3.5. Avaliação Histopatológica	37
3.6. Análise Estatística	39
4. Resultados	40
4.1. Identificação das cepas de <i>S. pyogenes</i>	40
4.2. Produção de Proteínas Recombinantes	42
4.2.1 Amplificação de plasmídeos com o gene M1	42
4.2.2 PCR para amplificação dos segmentos gênicos codificado M1ABC, M1AB e M1C	43
4.2.3. Expressão das proteínas recombinantes.....	46

4.2.4. Remoção do LPS das proteínas recombinantes.	48
4.3. Imunização de Animais com a Proteína M1 recombinante	51
4.4. Análise da Resposta Imune Humoral.....	53
4.5. Resposta Celular.....	55
4.6. Análise Histopatológica	59
Animais imunizados pela via intraperitoneal (i.p.).....	60
4.7. Estabelecimento de linhagens derivadas de linfócitos infiltrantes do miocárdio, experimento E14.	69
5. Discussão	72
6. Conclusão	81
7. Referencias Bibliográficas:.....	82
8. Apêndice	101

Abreviaturas

ACF -	Adjuvante completo de Freund
AHA -	American Heart Association
AIF -	Adjuvante incompleto de Freund
ASLO -	Anticorpos anti-estreptolisina O
B.p. -	<i>B. pertussis</i>
BBL -	Blood Agar Base (ágar sangue base)
BCG -	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
C -	Região carboxi-terminal
CMSP -	Células mononucleares de sangue periférico
ConA -	Concavalina A
cpm -	Contagem por minuto
CRC -	Cardiopatia reumática crônica
D.O. -	Densidade ótica
DRC -	Doença reumática cardíaca
EDTA -	ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA -	Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
Exp -	Experimento
FR -	Febre reumática
FRA -	Febre reumática aguda
GAS -	Estreptococo do grupo A
GlcNAc -	N-acetil-beta-D-glucosamine
³ H -	Trício
HE -	Hematoxilina/Eosina
HLA -	Human Leucocyte Antigens (antígenos leucocitários humano)
HMM -	Heavy meromyosin (cadeia pesada da miosina cardíaca)
I.E. -	Índice de estimulação
i.p. -	Intraperitoneal
Ig -	Imunoglobulina
IPTG -	Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside
kb -	Kilobase

kDa -	Kilo dalton
LAL -	<i>Limulus</i> Amebocyte Lysate
Lew -	Rato Lewis
LMM -	Light meromyosin (corpo principal da miosina)
LPS -	Lipopolissacarídeo
M1AB -	Regiões da porção N-terminal A e B
M1ABC -	Proteína M1 total
M1C -	Região C-terminal
Mio -	Miosina
NM -	Não manipulados
OMS -	Organização mundial da saúde
OPD -	Orto-fenilenodiamina
OVA -	Ovalbumina
pb -	Pares de base
PBS -	Salina tamponada com fosfato
PCR -	Proteína C reativa
PCR -	Polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)
PDGF-C -	Fator de crescimento de plaquetas - C
PEG -	Polietilenoglicol
pI -	Ponto isoelétrico
Pro/Gly -	prolina/glicina
S1 -	Cabeça globular da miosina
S2 -	Região α -hélice da miosina
s.c. -	Subcutâneo
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SDS PAGE -	Sodium dodecyl sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoreses
SPF -	Specific pathogens free (livres de patógenos específicos)
Taq -	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR -	T cell receptor (receptor de célula T)
v/v -	Volume/volume
VHS -	Velocidade de hemossedimentação
WHO -	World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática da proteína M.....	9
Figura 2 -	Localização dos iniciadores e fragmentos amplificados	25
Figura 3 -	Elementos do vetor pAE e inserção do fragmento M1ABC	26
Figura 4 -	Esquema dos protocolos de imunização	33
Figura 5 -	Frequência das diversas cepas analisadas	42
Figura 6 -	Amplificação dos fragmentos do gene <i>emm1</i> codificando M1ABC (A) e M1AB E M1C (B) amplificados por PCR	43
Figura 7 -	Cortes nas construções plasmidiais pAT-M1ABC, com enzimas específicas	45
Figura 8 -	Tempo ideal para indução da expressão da proteína M1ABC	46
Figura 9 -	Purificação da proteína M1ABC recombinante	47
Figura 10 -	Proteínas M1ABC, M1AB e M1C após remoção de LPS	48
Figura 11 -	Espectrofotometria de massa da proteína M1ABC	49
Figura 12 -	Proteínas recombinantes reconhecidas por anticorpo monoclonal anti-6his	50
Figura 13 -	Proteínas recombinantes M1AB e M1C reconhecidas pelo soro de animais imunizados com M1ABC	50
Figura 14 -	Reconhecimento específico da proteína M1 nativa de <i>S. pyogenes</i> pelo soro de animais imunizados com a proteína M1ABC recombinante	53
Figura 15 -	Titulação de anticorpos específicos contra a proteína M1ABC e comparação aos títulos anti-ovalbumina	54
Figura 16 -	Comparação das respostas humorais às proteínas recombinantes M1ABC, M1AB e M1C e miosina	55

Figura 17 -	Ensaio de proliferação para avaliação da resposta imune celular (linfonodo)	57
Figura 18 -	Ensaio de proliferação para avaliação da resposta imune celular (baço)	58
Figura 19 -	Histologia de válvulas a da febre reumática/sugestiva de Nódulo de Aschoff	61
Figura 20 -	Avaliação das válvulas: medida da espessura e avaliação do infiltrado inflamatório	63
Figura 21 -	Avaliação da inflamação valvar	64
Figura 22 -	Inflamação miocárdica	64
Figura 23 -	Presença de células grandes mononucleares.....	65
Figura 24 -	Cultura de linfócitos infiltrantes do tecido do miocárdio do rato E14L4	70
Figura 25 -	Cultura de linfócitos infiltrantes do tecido cardíaco pós-estimulo com ConA.....	71
Figura 26 -	Linfoblastos infiltrantes do tecido cardíaco, pós-estimulo com proteína M1ABC.....	71

Lista de Tabelas

Tabela I -	Fonte de identificação das cepas <i>S. pyogenes</i>	41
Tabela II -	Número de animais usados nos protocolos experimentais via i.p. e s.c. com sacrifício em 21 dias e 41 dias	52
Tabela III -	Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E7, pelos critérios dos dois primeiros patologistas	60
Tabela IV -	Avaliação histológica de animais sacrificados com 21 dias, experimento E13 após imunização via subcutânea, segundo critério histológico inicial	62
Tabela V -	Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E7 pelos critérios do terceiro patologista.....	66
Tabela VI -	Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E13, pelos critérios do terceiro patologista.....	67
Tabela VII -	Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E14, pelos critérios do terceiro patologista	68
Tabela VIII -	Cultivo de linfócitos infiltrantes do miocárdio de ratos Lewis, após 41 dias da imunização (E41)	70

Resumo

Alcantara FFP. Febre reumática: um modelo animal para uma vacina humana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 100 p.

A febre reumática é um bom exemplo de uma doença auto-imune deflagrada por um processo infeccioso. Num prazo de uma a quatro semanas após a resolução de uma faringite não tratada por cepas reumatogênicas de *S. pyogenes*, o organismo de um hospedeiro susceptível desencadeia uma resposta imune contra grandes articulações, coração, tecidos subcutâneos e cérebro. Acredita-se que elementos presentes na bactéria e reconhecidos durante a infecção na orofaringe, sejam confundidos com estruturas próprias do organismo, num processo denominado mimetismo molecular. Entre as proteínas envolvidas na reação cruzada, encontram-se a miosina cardíaca, pelo lado do hospedeiro, e a proteína M do microorganismo invasor. Esta última (proteína M) tem sido extensamente estudada. É a base da classificação das cepas de *S. pyogenes* e importante fator de virulência. Também tem sido explorada como imunógeno em várias estratégias vacinais. O estudo desta patologia tem sido dificultado pela ausência de um modelo animal que reproduza aspectos fundamentais da patologia humana, entre estes as lesões cardíacas. Uma das razões é o fato de que animais não contraem infecção pelo *S. pyogenes*. Portanto, produzimos a proteína M1 recombinante e mostramos que a imunização de 28 ratos Lewis por um período de 21 dias ou 14 ratos por 41 dias, com esta proteína foi capaz de induzir resposta inflamatória na maioria dos animais com intensidade variável. Células similares aos nódulos de Aschoff e células de Anitschkow, sugestivas das lesões patognomônicas da febre reumática foram observadas em 50% dos animais imunizados pela via subcutânea e sacrificados em 21 dias. Observamos uma resposta humoral e celular (células esplênicas e de linfonodos) específica contra a proteína M1 e contra as regiões amino-terminal (M1AB) e carboxi-terminal (M1C). Não observamos, entretanto, reações cruzadas com a miosina cardíaca. Derivamos linhagens de linfócitos T obtidas de células mononucleares infiltrantes do miocárdio de 6 dos 10 animais imunizados com a proteína M1 ABC via subcutânea e sacrificados em 41

dias e também de um em quatro dos animais controles que receberam PBS e adjuvantes. Estes resultados sugerem a presença de células auto-reativas no miocárdio dos animais imunizados.

Em conclusão, o uso de proteína M1 recombinante como imunógeno em modelo animal de ratos Lewis é capaz de desencadear reação inflamatória em miocárdio e tecido valvular e lesões similares às da febre reumática. O modelo do rato Lewis é até o momento o que apresenta maior semelhança com a doença humana e pode ajudar a esclarecer a imunopatologia da febre reumática. Além disso, certamente será importante para a avaliação do potencial de proteção e de segurança em modelos de vacinas contra o *S. pyogenes*.

Descritores: 1.Febre reumática 2.*Streptococcus pyogenes* 3.Ratos endogâmicos Lew
4.Nódulo reumático 5.Mimetismo molecular.

Summary

Alcantara FFP. Rheumatic fever: an animal model for a human disease [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 100 p.

Rheumatic fever is a good example of an autoimmune disease triggered by an infectious process. One to four weeks after the resolution of a non treated pharyngitis caused by rheumatogenic strains of *S. pyogenes*, the susceptible host unravels an immune response targeting joints, heart, connective tissues and brain. It is thought that molecules present in the bacteria and recognized during the infection at the pharynx are confounded with the organism self structure in a process called “molecular mimicry”. Amongst the proteins involved in the cross reaction, it may be found cardiac myosin, on the host side, and M protein on the invading organism’s side. The latter (Mprotein) has been extensively studied. It is the basis of the *S. pyogenes* strains classification, and also an important virulence factor. It has also been explored as an immunogen in several vaccine strategies. The understanding of this disease has been hampered by the absence of an animal model that reproduces fundamental aspects of the human pathology, specially cardiac lesions. One of the reasons is the fact that animals do not get infected by *S. pyogenes*. Hence we have produced the recombinant M1 protein and shown that either the immunization of 28 Lewis rats for a period of 21 days or 14 rats for a period of 41 days, was capable of inducing an inflammatory response in most of the animals with variable intensity. Aschoff nodules-like or Anitschkow-like cells resembling rheumatic fever pathognomonic lesions were seen in 50% of the animals immunized subcutaneously and sacrificed on day 21. We have observed an humoral and cellular response (spleen and lymph node derived cells) specifically targeting M1 protein and the amino (M1AB) and carboxy (M1C) terminus of the protein. However, cross reactions with cardiac myosin were not observed. We have derived T lymphocyte lineages obtained from myocardium infiltrating mononuclear cells from 6 of the 10 animals immunized with M1ABC protein subcutaneously and sacrificed on day 41 and also from one out of four PBS - adjuvant immunized animals. These results suggest the presence of autoreactive cells in the myocardium of the immunized animals.

In conclusion, the use of the M1 protein as an immunogen on the Lewis rat model is capable of triggering an inflammatory reaction in the myocardium and valvular tissue and it can produce rheumatic fever like lesions. The Lewis rat model is up to this moment the one to present the highest similarity with human disease. Besides, it will certainly be important on the evaluation of the protection and safety of *S. pyogenes* vaccines.

Descriptors: 1.Rheumatic Fever 2.*Streptococcus pyogenes* 3. Lew endogamic rat 4.Rheumatic nodule 5.Molecular mimicry.

1. Introdução

1.1 Febre Reumática e a Cardiopatia Reumática

A Febre Reumática (FR) é uma afecção aguda, inflamatória e recidivante que ocorre em indivíduos susceptíveis, acometidos por infecção faríngea não tratada, ocasionada pelo estreptococo do grupo A de Lancefield (GAS, do inglês “*Group A Streptococcal*”). A febre reumática acomete mais frequentemente crianças de 5 a 15 anos de idade (média 11 anos). O período latente entre a faringite estreptocócica e o início do ataque agudo varia de uma a cinco semanas, o qual dura entre uma a duas semanas apenas, embora seja recorrente. A maior parte desses ataques começa com poliartrite migratória, acompanhada de febre. Tipicamente uma articulação após a outra se torna dolorosa e inchada por um período de dias. Embora o ataque agudo possa induzir artrite e algumas vezes miocardite, ambas se resolvem. Acompanham os ataques agudos manifestações transitórias e menos frequentes, vasculares e cutâneas, como o *eritema marginatum* e nódulos subcutâneos, respectivamente. Menos comumente os tecidos periarticulares, as artérias e os pulmões também são afetados (revisto em Decourt, 1972; revisto em Stollerman, 1997; revisto em Bisno 1991; revisto em 2001 WHO, 2004).

A *cardite aguda* ocorre em 50 a 75% das crianças entre as idades de 2 a 16 anos, mas só em 35% dos adultos com um ataque agudo único de FR (Wannamaker, 1951). Durante o *ataque agudo* é a miocardite que apresenta maior ameaça, causando arritmias. Após o ataque inicial, entretanto, há maior vulnerabilidade para a reativação da doença, a partir de infecções faríngeas subseqüentes, e as mesmas manifestações tem maior probabilidade de ocorrência com cada ataque recorrente. Após número variável de ataques de FR aguda, o processo inflamatório pode ocasionar manifestações tardias como a coréia de Sydenham e a cardiopatia reumática crônica (revisto em Decourt, 1972; revisto em Stollerman, 1997; revisto em Bisno 1991; revisto em 2001 WHO, 2004).

A coréia de Sydenham é tida como relativamente benigna, posto que é reversível. Auto-anticorpos reativos contra gânglios da base, que podem ser formados contra antígenos estreptocócicos durante as infecções recorrentes, ocasionam manifestações que surgem tardiamente no processo auto-imune. Estes auto-anticorpos passam a alvejar estruturas específicas do sistema nervoso como

antígenos dos núcleos caudado e subtalâmico (Church *et al.*, 2002). Mais precisamente, o epitopo dominante do carboidrato A do *S. pyogenes*, a N-acetil-beta-D-glucosamine (GlcNAc) e epitopos nos lisogangliosídeos humanos, são as moléculas envolvidas no reconhecimento dos anticorpos de reação cruzada e no dano subsequente. Estes anticorpos atuam bloqueando os estímulos inibitórios, produzindo alterações funcionais da motricidade, sendo responsáveis pelos sintomas neurológicos da coreia de Sydenham (Kirvan, *et al.*, 2003).

Já a Cardiopatia Reumática Crônica (CRC)/Doença Reumática Cardíaca (DRC), é caracterizada por uma valvopatia fibrótica deformante (especialmente a estenose mitral), produzida pelo ataque inflamatório crônico nas valvas. Pode levar a completa incapacitação da função valvar, gerando, décadas mais tarde, insuficiência cardíaca ou disfunções permanentes graves e, algumas vezes, fatais (revisto em Decourt, 1972; revisto em Stollerman, 1997; revisto em Bisno; revisto em 2001 WHO, 2004). Por estes motivos, uma grande proporção destes indivíduos acaba necessitando de cirurgia cardíaca valvar num período de 5 a 10 anos.

Os critérios diagnósticos da FR não se alteraram desde sua descrição definitiva em 1889, por William Chedale, quando era altamente prevalente e virulenta em Londres. Esses sinais principais são poliartrite, cardite, coreia e, menos freqüentemente, nódulos subcutâneos e *eritema marginatum* (Stollerman, 1997). Visando facilitar e uniformizar a identificação da doença T. Duckett Jones, em 1944, associou aos sinais principais da doença, sinais menores de inflamação: febre, aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS), e concentração da proteína C reativa (PCR) acima do normal. Estes critérios foram sendo modificados no decorrer do tempo, inicialmente pela “American Heart Association (AHA)”, em 1956, e revisados pela mesma associação em 1965 e 1984. Novas modificações foram feitas pela organização mundial de saúde em 1988 e, finalmente, sofreram novas atualizações pela AHA em 1992 e pela OMS em 2003. Hoje estão inclusos parâmetros clínicos e laboratoriais (Stollerman, 1997) e, em sua essência, os critérios de Jones revisados, definem FR pelo achado de 2 manifestações maiores ou 1 manifestação maior e 2 menores (revisto em WHO, 2004):

manifestações maiores: cardite, poliartrite, coreia de Sydenham, eritema marginado e nódulos subcutâneos.

manifestações menores: febre, artralgia, prolongamento do intervalo FR, história prévia de FR ou doença reumática cardíaca, VHS (velocidade de hemossedimentação). Aumento de anti-estreptolisina O (ASLO), da PCR e uma cultura de orofaringe positiva, são considerados evidência de uma infecção pregressa por GAS (revisto em Decourt, 1972; Bisno, 1991; Bisno 2001; Ferrieri, 2002).

1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde publicou (do inglês “WHO”), em 2005 um trabalho calculando a incidência, prevalência e mortalidade das doenças associadas com infecções por GAS tomando como base uma extensa revisão da literatura mundial. Este trabalho usou números bastante conservadores, buscando utilizar o valor mais baixo, sempre que houvesse dúvida. Ainda assim, as infecções por GAS foram colocadas no grupo das 10 mais mortais infecções afligindo os seres humanos (Carapetis, 2005a).

As infecções mais comuns causadas por GAS são as faringites e as piodermites. Foi estimado que no mundo todo ocorrem pelo menos 600 milhões de casos de faringites por GAS, em pessoas com mais de 4 anos de idade, sendo que 550 milhões em países em desenvolvimento. Além disso, o número de casos de infecções de pele por GAS foi estimado em 111 milhões, apenas em crianças com menos de 15 anos, em países em desenvolvimento (Carapetis et al., 2005a). Acredita-se que a maioria das crianças desenvolva pelo menos um episódio de faringite por ano, 15 a 20% dos quais por GAS (Bisno, 2001). Um complicador da análise do papel do GAS em infecções humanas é o fato de um número variável (10-50%) de indivíduos assintomáticos poderem portar o GAS (Kaplan, 1980). O número de infecções por GAS chega a 25 milhões/ano nos Estados Unidos, permitindo extrapolar que no Brasil haja um mínimo de 15 milhões de infecções/ano (Fischetti, 1999). O Ministério da Saúde estima que no Brasil ocorram, anualmente, 6 milhões de novos casos de faringites estreptocócicas (Ministério da Saúde, 2000). Calcula-se que cerca de até três por cento das faringites não tratadas causadas por GAS, possam evoluir para febre reumática (Bisno et al., 2001; Cunningham, 2000).

A incidência global de febre reumática aguda (FRA), foi calculada como sendo de, pelo menos, 471.000 casos novos em todas as faixas etárias. Na América

Latina isso representaria 21.222 casos novos/ano ou uma incidência média de 19,6 casos por 100.000 habitantes, enquanto nos EUA a incidência hoje é de menos de 0,5 /100.000 crianças em idade escolar (Carapetis et al., 2005a). Em 2000, no Brasil foram notificados 18.000 casos novos de FRA (Ministério da Saúde, 2000), citado por Da Silva (2005). No Brasil estima-se que a incidência de FR seja de aproximadamente 5.000 casos novos /ano (Ministério da Saúde). Um estudo realizado em 1992 (Meira, 1995) demonstrou, em Belo Horizonte, uma incidência média anual de até 360 casos novos /100.000 habitantes. Na Austrália, a população aborígine nos Territórios do Norte possui uma incidência média de FR de até 650 por 100.000 habitantes.

Em países subdesenvolvidos, até 1% das crianças em idade escolar desenvolvem FR (WHO). Na América Latina a prevalência média é de 1,3/1.000 contra menos de 0,5/1.000 nos EUA (WHO, 2005). No Brasil, segundo Ministério da Saúde, a prevalência de febre reumática em crianças e adolescentes é de 3 a 5% (Ministério da Saúde, 2003) citado por Borges et al. (2005).

Acredita-se que 60% dos casos de FR aguda (282.000 globalmente) irão desenvolver doença reumática cardíaca (DRC) (Carapetis, 2005a). A prevalência global de FR e DRC estimada, é de no mínimo 15,6 a 19,6 milhões de casos em todos os grupos etários, média de 2,5 a 3,2 casos por 1.000 habitantes. A prevalência de DRC no Brasil é de 6,5/1.000 (Feldman et al., 1996). Na Austrália a prevalência média de DRC atinge até 30 por 1.000 em algumas comunidades aborígenes (Carapetis et al., 2005b).

A mortalidade por febre reumática é estimada em 1,5% por ano, representando 492.000 pessoas morrendo, no mundo, por complicações decorrentes desta doença a cada ano. No Brasil a mortalidade, combinada por febre reumática aguda e doença reumática cardíaca, foi de 1% em 1995, representando 1.665 mortes (WHO, 2005). Entretanto, um estudo em São Paulo realizado no período de 1991 a 1995, mostrou uma mortalidade bruta por FR e DRC de 1,63 por 100.000 habitantes (Haddad e Silva, 2000).

Nos países em desenvolvimento, a FR é a principal causa de doença cardíaca em crianças e adolescentes e a principal causa de morte cardiovascular em indivíduos com menos de 40 anos (Stollerman, 1997; Borges et al., 2005), ela é responsável por

mais de 60% das doenças cardiovasculares que acometem crianças e adultos jovens (McDonald et al., 2004). No Brasil sabe-se que a DRC é responsável por cerca de 90% das cirurgias cardíacas valvares infantis, representando um alto custo para o sistema Único de Saúde (SUS), com um valor estimado na ordem de US\$ 51.144.347,00 / ano (Terrerri, 2001).

A incidência de FR e de sua seqüela crônica, a DRC, tem declinado nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros países desenvolvidos. Em 1944, a FR era a principal causa de morte de crianças de 5 a 19 anos e também a principal causa de doença cardíaca em adultos com menos de 40 anos de idade (Jarvis, 2003). Nesta época, a taxa de mortalidade por DRC nos EUA era de 20,6/100.000 indivíduos, mas em 1982, era de apenas 2,2/100.000 indivíduos (Gillium, 1986). Entretanto, periodicamente há ressurgimento da FR em áreas circunscritas dos EUA (Veasy et al., 1987)

1.3 Anátomo Patologia Cardíaca

Na febre reumática aguda são encontradas lesões amplamente disseminadas, focais e inflamatórias em vários locais. Dentro do coração elas são mais evidentes e são chamadas "Corpúsculos de Aschoff". Estes constituem foco de necrose fibrinóide circundada primeiramente por linfócitos e macrófagos, com plasmócitos ocasionais (Aschoff, 1912-1913). À medida que os corpúsculos de Aschoff atingem ampla maturidade, histiócitos modificados arredondados surgem no infiltrado inflamatório e são chamados de células de Anitschkow ou células de Aschoff (Anitschkow, 1913). Tais células possuem o citoplasma anfofílico abundante, com núcleos centrais, redondos a ovais, nos quais a cromatina está disposta na forma de uma linha ondulada, tênue e central criando o aspecto de "células em lagarta". Alguns dos histiócitos alterados e maiores são multinucleares formando as células gigantes de Aschoff. O infiltrado inflamatório variado ao redor do foco central da necrose fibrinóide constitui o Corpúsculo de Aschoff na sua plenitude e é patognomônico da FR. Com o passar do tempo (anos) os corpúsculos de Aschoff são substituídos por tecido cicatricial fibroso, e assim algumas vezes estão presentes em biópsias auriculares de pacientes que se acredita serem portadores de doença quiescente ou crônica (Robbins et al., 1991; Virmani et al., 1977).

Durante a enfermidade aguda, os corpúsculos de Aschoff podem ser encontrados em qualquer das três camadas do coração (endocárdio, miocárdio e pericárdio), surgindo daí o termo pancardite. No pericárdio, estes corpúsculos estão localizados na gordura subserosa e tecido fibroso e são acompanhados por um exudato pericárdico serofibrinoso descrito como "pão com manteiga". Via de regra, a pericardite se resolve com o tempo, embora ela possa deixar aderências fibrosas não significativas. No miocárdio pode-se observar a forma de Corpúsculos de Aschoff disseminados dentro do tecido conjuntivo intersticial muitas vezes em relação com os vasos sangüíneos intramiocárdicos. Os miócitos adjacentes podem estar lesados ou mortos. Algumas vezes a miocardite inflamatória leva a dilatação do coração e dos ventrículos, particularmente do anel da válvula mitral. Embora a miocardite possa não se fazer acompanhar de pericardite, em geral existe um envolvimento concomitante do endocárdio, principalmente das valvas do lado esquerdo.

O envolvimento endocárdico, geralmente valvar, é o aspecto mais sombrio da cardite crônica sendo responsável pela incapacidade crônica, décadas após a doença aguda. Os corpúsculos de Aschoff podem ser encontrados sob o endocárdio mural e, muito mais importante, focos inflamatórios também podem surgir nas valvas cardíacas. Tipicamente eles consistem em focos de necrose fibrinóide dentro das cúspides, recobertos por vegetações friáveis e pequenas (1-2mm), denominadas verrugas, ao longo da linha de fechamento. Essas projeções verrucosas provavelmente resultam da precipitação de fibrina em locais de erosão, nas superfícies endocárdicas inflamadas onde os folhetos impingem um sobre o outro. Verrugas semelhantes podem ser vistas ao longo das cordoalhas tendíneas. Essas afecções valvares agudas causam menos distúrbio à função cardíaca do que a miocardite com dilatação ventricular e conseqüente insuficiência mitral. A valvulite aguda pode presumivelmente resolver-se e induzir somente uma pequena fibrose deixando pouco déficit funcional, mas por outro lado, pode progredir para a DRC. As lesões subendocárdicas podem induzir espessamentos semelhantes a um mapa chamados de placas de McCallum, em geral no átrio esquerdo (Robbins et al., 1991).

A DRC via de regra não aparece até pelo menos 10 anos após o episódio agudo inicial e caracteriza-se por deformidade permanente das valvas envolvidas na

doença aguda. A frequência dessa infeliz consequência é mais provável quando: 1) o primeiro ataque ocorre no início da infância, 2) o ataque inicial de FR é intenso e 3) ocorrem ataques recorrentes. A organização da inflamação aguda e fibrose subsequente fazem com que os folhetos valvares fiquem espessados, encurtados, inelásticos e endurecidos. A válvula mitral é afetada em 65-70% dos casos e a mitral e aórtica concomitantes em 25%, as quais não raro se somam ao acometimento da tricúspide e da pulmonar (Robbins, 1991).

1.4 O Agente

Os *Streptococcus pyogenes* β -hemolíticos do Grupo A de Lancefield, são bactérias aeróbias, Gram positivas de morfologia esférica. São uniformemente sensíveis à penicilina e causa freqüente de piodermite e faringite. Podem também produzir a febre escarlatina, a síndrome do choque tóxico e infecções invasivas, em particular a fascite necrotizante, com determinadas cepas, resultando em rápida letalidade. A febre reumática e a glomerulonefrite são consequências indiretas da infecção pelo *S. pyogenes*, uma vez que a bactéria não é isolada dos tecidos acometidos e não participa diretamente destas afecções, que surgem após a sua eliminação do organismo pelo sistema imune.

Desde a técnica de identificação por crescimento em ágar sangue, de 1903 por Schotmüller, se suspeitava que uma bactéria β -hemolítica causava os ataques iniciais e recorrentes de febre reumática. Em 1931, a febre reumática foi associada à infecção por bactérias β -hemolíticas (Collis, 1931; Cobburn, 1931). Entretanto, apenas em 1928, Lancefield em trabalho pioneiro, usando o soro de coelhos imunizados com diferentes isolados de orofaringe, classificou as diferentes cepas de *S. pyogenes* β -hemolíticos, segundo a sua reação sorológica com estes anti-soros. Os estudos no Fort Warren, publicados em 1951 por Wannamaker e cols. (Wannamaker et al., 1951), mostraram de maneira conclusiva que a terapia com penicilina para a faringite era capaz de prevenir o desenvolvimento das complicações auto-imunes ligadas à febre reumática, reforçando o papel da infecção na deflagração da doença auto-imune. Posteriormente, Lancefield imunizou os coelhos com material derivado da purificação bioquímica de extratos de culturas bacterianas. Esta estratégia permitiu distinguir alguns dos principais antígenos da superfície bacteriana

(Lancefield, 1952), evidenciando que apenas algumas cepas, hoje definidas como sendo as do carboidrato da superfície do grupo A, estavam implicados com a febre reumática, enquanto as cepas de outros grupos (carboidratos do grupo B, C, G e F), embora causem faringite, não produzem febre reumática e DRC. Lancefield percebeu que o antígeno M era a principal proteína na superfície do GAS (Lancefield, 1962). A sorotipagem de Lancefield permitiu que hoje fossem classificados mais de 100 sorotipos M de *S. pyogenes*, abrindo o caminho para os estudos epidemiológicos posteriores (Lancefield, 1962; Center for Disease Control 1987; Bessen, 2000).

Usando a técnica de sorotipagem criada por Lancefield para estudar os isolados de orofaringe relacionados com os episódios de FR em Chicago de 1956 a 1961, Stollerman definiu alguns sorotipos M de *Streptococcus* como “reumatogênicos” (M1, M3, M5, M6, entre outros) (Stollerman, 1969 e 1997). A classificação sorológica tem sido progressivamente substituída pela genotipagem da proteína M e durante uma breve ressurgência da FR em alguns estados nos EUA nos anos 80 e 90, a genotipagem das cepas envolvidas mostrou forte associação com os sorotipos reumatogênicos de *S. pyogenes*. Portanto, o conceito de cepas reumatogênicas, embora recentemente questionado por alguns grupos, notadamente pelo de Carapetis, na Austrália (McDonald, *et al.*, 2004), ainda é plenamente aceito (Bessen et al., 2000; Shulman et al., 2006).

1.5 Estrutura da proteína M, do gene *emm*, família *emm*, e do locus *emm*

Entre as dezenas de proteínas da superfície do *S. pyogenes*, mediando interação com células do hospedeiro, a proteína M é a mais abundante. Seu papel biológico tornou-se mais conhecido com o seqüenciamento da proteína (Scott e Fischetti, 1983) e, posteriormente, dos genes *emm* que codificam a proteína (Kehoe, 1985; Hollingshead et al., 1986; Mouw et al., 1988; Haanes, 1989), o que permitiu conhecer a base estrutural de suas propriedades biológicas. A proteína M é composta por duas cadeias polipeptídicas, complexadas em uma configuração em alfa hélice, como uma mola, ancorada na membrana celular, atravessando a parede celular e aparecendo como fibrilas na superfície bacteriana. Cada cadeia protéica da proteína madura expressa no GAS, possui aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos que

podem ser divididos em diferentes regiões, com base em suas características estruturais, representadas na Figura 1 (revisto em Fischetti, 1989).

Figura 1. Representação esquemática da proteína M. Em amarelo o domínio das repetições A, em vermelho o domínio das repetições B, em verde o domínio das repetições C, em laranja o domínio helicoidal D, em branco o domínio rico em glicina e prolina (Pro/Gly), em verde musgo o domínio H, uma região de ancoragem a membrana celular.

- O domínio das repetições A, altamente variável, extremidade amino-terminal.
- O domínio das repetições B, bem menos variável.
- O domínio das repetições C, região conservada, junto à parede celular bacteriana.
- O domínio D, domínio helicoidal que atravessa a parede celular
- Domínio do peptidoglicano (rico em Pro/Gly).
- Domínio H, hidrofóbico, região de ancoragem à membrana celular (revisto em Fischetti, 1989; revisto em Courtney et al., 2002; revisto em Bisno et al., 2003).

Apenas as repetições A, B e C são extracelulares (revisto em Fischetti, 1989).

A região amino-terminal (repetições A e B) é separada da região carboxi-terminal (C), por um sítio sensível a pepsina, e o fragmento AB liberado é conhecido como PepM. Os genes da família *emm* são extremamente polimórficos, em sua extremidade 5' amino-terminal. Durante a infecção, a resposta imune humoral do hospedeiro, dirigida a aminoácidos desta região, foi usada para distinguir os vários sorotipos. Além disso, a extremidade 5' é composta de repetições que participam em recombinação intragênica, resultando em variação de tamanho da proteína M sendo mecanismo de escape imune. Essas repetições foram denominadas repetições A e repetições B (Fischetti, 1989). Na região proximal à bactéria, mas ainda extracelular, localizam-se as repetições de aminoácidos do domínio C (repetições C). Esta região é extremamente conservada, com homologia de aminoácidos acima de 80% entre os vários genótipos da proteína M. Todos os GAS podem ser divididos com base em um determinante antigênico no domínio C. Uma divisão fundamental entre os GAS compreende a separação entre Classe I (determinante antigênico em C presente) e

Classe II (determinante ausente) (Bessen et al., 1989). Acima da região de âncora, há uma região rica em resíduos de prolina e glicina em alguns membros da família M e em serina e treonina em outros membros, regularmente espaçados, que permitem uma considerável flexibilidade e atravessa a camada peptidoglicana da parede bacteriana (Fischetti, 1989). No extremo da região carboxi-terminal, há uma região hidrofóbica, altamente conservada entre os vários sorotipos. Tal região também está presente na proteína A do *Staphylococcus aureus* e na proteína ligadora de IgG dos estreptococos do grupo G. Essa sequência atua como uma âncora de membrana. Embora haja uma forte ligação à membrana, a proteína M é secretada nos protoplastos e formas -L, (essas formas não possuem parede bacteriana), indicando que a parede celular também participa na ligação da proteína a bactéria (revisto em Fischetti, 1989).

A comparação entre os diferentes genes codificadores das várias proteínas M conhecidas, revelou uma esperada semelhança, e conseqüente agrupamento numa família de genes *emm*. A superfamília *emm* inclui além dos genes que codificam as proteínas M dos vários sorotipos dos estreptococos, genes para proteínas homologas dos vários sorogrupos (A, B e G) (Bisno et al., 1987), e mesmo genes de algumas proteínas não estreptocócicas. Compreende um grupo heterogêneo de genes de proteínas com identidade de nucleotídeos maior que 70% nos três domínios associados à bactéria (domínio H, região rica em prolina/glicina, e domínio D). São conhecidas por diversos nomes como: *emmL*, *fcrA*, *enn*, *arp*, *mrp*, *sir* (Hollingshead et al., 1994). Além de se destacar do ponto de vista quantitativo, a proteína M é considerada inicialmente como importante fator de virulência, por prover uma resistência a fagocitose, interferindo com a opsonização pela via alternativa do Sistema Complemento (Bisno et al., 2003). Os membros da superfamília *emm* podem ainda, serem classificados com base na proteína à qual se ligam. Muitas proteínas nesta superfamília se ligam à região Fc das imunoglobulinas IgG ou IgA, enquanto outras se ligam à fibrinogênio, albumina sérica humana ou fator H do Sistema Complemento.

A interferência com a opsonização pela via alternativa do complemento, ocorre através da ligação ao Fator H, uma proteína reguladora do sistema complemento, à região de repetição C da proteína M. Além desse mecanismo, outros

foram descritos ou postulados, como a ligação do fibrinogênio à região hiper-variável da proteína M, interagindo de maneira não bem conhecida, mas também impedindo a ligação do fragmento C3b do complemento a superfície bacteriana. Algumas proteínas M-símile também se ligam a proteínas do hospedeiro como IgG e IgA, e parecem cooperar como efeito anti-fagocítico (Fluckiger et al., 1988; revisto por Fischetti, 1989; revisto em Courtney et al., 2002; Bisno et al., 2003).

Além disso, a proteína M participa na adesão ao epitélio para a colonização bacteriana. Foi demonstrado que a proteína M participa na adesão a células HEp2, através da interação entre a repetição C da proteína M e o co-fator CD46 expresso nestas células (Okada et al., 1995). Além disso, alguns sorotipos de M (M1 e M3) interagem através de sua região hiper-variável com fibrinogênio (Fischetti, 1989; Courtney, et al., 2002; Bisno et al., 2003).

No genoma do *S. pyogenes* (Ferretti et al., 2001) podem existir até três genes alelos da superfamília emm (emm ou emm-símiles), dispostos sequencialmente e sob a mesma regulação, compondo o agrupamento emm. Entretanto, geralmente apenas um deles codifica a proteína M e apenas uma proteína M é expressa na bactéria (Hollingshead et al., 1994). A mudança de alto nível de expressão da proteína se assemelha a sistemas usados por muitas bactérias para perceber mudanças no meio ambiente, é regulado por níveis altos de CO₂, osmolaridade, baixa temperatura, gases, disponibilidade de ferro, todos aumentando a transcrição do promotor de *emm* (Bisno et al., 2003). A menor quantidade de proteína M (M+) expressa foi correlacionada por Todd e Lancefield (revisto em Fischetti, 1989) como ocorrendo paralela à mudança do fenótipo da colônia de opaco para transparente.

1.6 A resposta imune contra a proteína M

A proteína M desempenha papel preponderante na resposta imune do hospedeiro, sendo importante alvo de reconhecimento tanto por anticorpos (Fischetti, 1989) como por linfócitos (Guilherme, 1995). A resposta humoral anti-M se correlaciona bem com a atividade da doença. Esta resposta confere ao portador uma proteção contra infecção por *S. pyogenes* que se correlaciona com a presença de anticorpos opsonizantes contra o sorotipo da proteína M. Esta proteção sorotipo-específica é devida a anticorpos opsonizantes que se ligam aos domínios A e B e são

capazes de sobrepujar a inibição apresentada pelo domínio C, com propriedades anti-opsonizantes. É esta resposta humoral contra esta região variável que foi usada por Lancefield (1962) na distinção dos vários sorotipos da proteína M. Todos os soros humanos pesquisados também contêm anticorpos contra a região conservada das repetições C. Estes anticorpos parecem surgir precocemente, antes dos anticorpos sorotipo específicos, mas não são opsonizantes ou protetores. Em contraste, alguns trabalhos sugerem que epitopos na região C, compartilhados por muitas proteínas M, são capazes de conferir, em animais, imunidade protetora das mucosas contra a colonização por sorotipos heterólogos (Bessen & Fischetti, 1990; Cunningham, 2000). Em animais, também foi demonstrado que a IgA proteína-específica é capaz de gerar imunidade, bloqueando a aderência. A imunoglobulina IgG por sua vez, embora não bloqueie a aderência, impede a invasão e internalização do *Streptococcus pyogenes* (Fluckiger *et al.*, 1988; Fischetti, 1989; Cunningham, 2000). Em 1989, Fischetti demonstrou que o reconhecimento por anticorpos monoclonais específicos para um epitopo na porção conservada da proteína M (repetição C), permitia classificar as várias cepas de GAS. Desta maneira, as cepas Classe I apresentam o referido epitopo e são reconhecidas por estes anticorpos, enquanto nas cepas Classe II este epitopo está ausente. As cepas Classe I foram associadas à febre reumática, diferentemente das cepas Classe II (Bessen e Fischetti, 1989).

Embora a resposta celular contra a proteína M tenha sido bem menos estudada, ela não é menos importante. Apesar de com uma história mais recente em comparação à resposta humoral, a resposta celular parece ser na verdade mais relevante. O coração de pacientes reumáticos revela um infiltrado inflamatório mononuclear com predominância de linfócitos. O reconhecimento da proteína M por linfócitos T CD4, é inclusive fundamental para uma resposta humoral adequada, através do auxílio T aos linfócitos B, aumentando sua estimulação, favorecendo a troca de classes de imunoglobulina (de IgM para IgG ou IgA), e na manutenção da produção de anticorpos (Janeway, 2004).

Dois epitopos T imunodominantes na proteína M, foram definidos em animais imunizados com a proteína M5: um na região amino-terminal (resíduos 17-31) e um na região carboxi-terminal (resíduos 308-319) (Robinson *et al.*, 1991).

Posteriormente, foram definidos, em estudos animais, epitopos T e B na região c-terminal conservada, uma região candidata a uso em vacinas anti-*S. pyogenes* (Pruksakorn et al., 2001). Alguns pesquisadores, entretanto, relataram que a proteína M apresentaria propriedades superantigênicas (Watanabe-Ohnishi, 1994), não induzindo uma resposta imune antígeno específica, mas sim uma estimulação indiscriminada de grande população de linfócitos. Este achado, entretanto, tem sido repetidamente contestado por vários pesquisadores: usando preparações de proteína M5 recombinante ou fragmentos derivados da clivagem de M5 por pepsina PepM5 na ativação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de voluntários sadios Degnan et al (1997) mostrou não haver ativação superantigênica e, analisando o repertório de CMSP ou de linhages derivadas de linfócitos infiltrantes do coração de pacientes com febre reumática, onde se demonstrou a expansão de diversas famílias da cadeia V β do TCR, com Guilherme et al. (2000), mostrou perfis oligoclonais típicos de uma resposta dirigida a antígenos e não a superantígenos.

Portanto, pelo fato da proteína M ter um importante papel na patogenicidade e, de outro lado, por ser extremamente imunogênica, esta proteína tem sido empregada como antígeno alvo na maioria das estratégias de desenvolvimento de vacinas contra GAS (Beachey et al., 1979; revisto em Fischetti, 1989; Fischetti, 1999; Brandt, *et al.* 2000).

1.7 Febre reumática: uma doença auto-imune

A FR possui estreita associação causal e temporal com a infecção por GAS, entretanto, jamais foi possível isolar a bactéria dos tecidos afetados, tanto em doenças agudas como em lesões crônicas (revisto em Unny e Middlebrooks, 1983). O tempo entre a infecção e o início dos ataques correlacionam-se com o tempo para maturação da resposta imune. Apesar de se acreditar em uma reação auto-imune, deflagrada após o início do processo infeccioso, os detalhes do mecanismo envolvido ainda não estão claramente identificados. Entretanto, é sabido que a FR ocorre apenas após infecção da faringe e não em outros locais como, por exemplo, na pele (piodermite, erisipela). Mais além, nem todas as cepas são igualmente reumatogênicas, havendo relatos de que alguns sorotipos são tidos como mais reumatogênicos que outros (Bessen et al., 2000; Kaplan et al., 2001).

Além disso, fatores genéticos do hospedeiro desempenham importante papel na patogênese. Vários autores em diferentes locais descreveram a associação de antígenos de histocompatibilidade (HLA) específicos com a febre reumática. Estudos dos antígenos HLA de classe II DR e DQ em diversos grupos de pacientes mostraram associação da doença com diferentes alelos. Deste modo foi descrita a associação com HLA-DR4 em caucasóides americanos (Anastasiou-Nana et al., 1986) e árabes (Rajapakse et al., 1987), HLA-DR3 em indianos (Jhinghan et al., 1986) e com HLA-DR2 ou DR11 em populações negras (Ayoub et al., 1986; Maharaj et al., 1987). Mais recentemente, observou-se associação significativa do haplótipo DRB1*0701 / DQA1*0201 na população egípcia (Guedez, et al., 1999) e do haplótipo DRB1*07 / DQB1*0302 e DQB1*0401-2 em população da Letônia (Stanevicha, et al. 2003), sendo que estas associações foram particularmente mais evidentes em pacientes com lesões valvulares múltiplas e regurgitação de valva mitral. Em trabalho desenvolvido por nosso grupo com uma amostra da população brasileira constituída por mulatos escuros e claros, verificamos uma associação dos antígenos HLA-DR7 e DR53 nos pacientes com FR quando comparado ao grupo controle (Guilherme et al., 1991). Em trabalho recente, Visentainer e cols. (2000), estudando uma população do Sul do Brasil de origem caucasóide, confirmaram a associação, previamente descrita por nosso grupo, com HLA-DR7, porém a associação com DR53 não se manteve na população estudada.

A associação de autoanticorpos reagindo com o tecido cardíaco na FR foi inicialmente descrita em 1945 por Cavelti (Calveti, 1945). No início dos anos 60, Kaplan (1961) demonstrou a deposição de anticorpos e complemento no coração de pacientes com FR aguda usando imunofluorescência com o soro de pacientes com febre reumática. Em 1962, foi pela primeira vez observada uma reação cruzada, mostrando anticorpos anti-coração presentes em soro de pacientes portadores de FR, sendo absorvidos por *S. pyogenes* (Kaplan 1962). Estes achados foram em seguida confirmados por Zabriskie (Zabriskie e Freimer, 1966; revisto por Cunningham, 2000). O advento dos anticorpos monoclonais, produzidos contra cepas de *S. pyogenes* permitiu estabelecer a miosina como um importante alvo cardíaco da reação cruzada humoral, demonstrando que estes anticorpos monoclonais também

reagiam de forma cruzada com a proteína M e com o epitopo imunodominante do carboidrato do grupo A (Krisher e Cunningham, 1985; Gulizia et al., 1991).

A teoria mais aceita é a do mimetismo molecular, termo cunhado por Oldstone (Fujinami e Oldstone, 1985), onde o processo autoimune seria deflagrado após uma infecção, devido ao mimetismo entre moléculas do invasor e do hospedeiro. Este processo foi descrito e aplicado a compreensão de várias outras doenças (Wurcherpfenig, 2001)

O fato da FR e o dano cardíaco subsequente ocorrerem em torno 4 a 8 semanas após infecção inicial por GAS, e não no período entre as infecções recorrentes, quando os anticorpos que reagem de forma cruzada estão ainda elevados, indica que, além do envolvimento de anticorpos na doença cardíaca reumática, ocorra a participação de elementos celulares. Desde a descrição original de Aschoff, da lesão anátomo-patológica homônima, em 1904, se sabe que há uma lesão inflamatória celular focal, algo semelhante a um granuloma, nos tecidos afetados, particularmente nas válvulas cardíacas. Ainda assim, um dos primeiros estudos procurando elucidar o papel dos linfócitos T, surge apenas a partir de 1974 (Read et al., 1974, e revisto em Guilherme, 2005), onde foi mostrado em ensaios blastogênicos, que pacientes reumáticos exibem uma reatividade aumentada a preparados de membranas de estreptococos reumatogênicos, mas não de cepas nefritogênicas. Em 1983, Zabriskie demonstrou através de análises histológicas que a valvulite era produzida por uma população de células com iguais proporções de linfócitos e macrófagos. Mais tarde confirmou que, em sua maioria, estes linfócitos na válvula eram do subtipo T CD4⁺, embora em frequência semelhante a dos linfócitos no sangue periférico em pacientes com doença crônica (Raizada et al., 1983; Kemeny et al., 1989; revisto em Guilherme, 2005).

Nesta mesma época os estudos buscando avaliar a reatividade celular usavam células do sangue periférico. Em 1995, a participação de linfócitos T na patogênese da FR foi definitivamente estabelecida, quando Guilherme et al. (1995) isolaram pela primeira vez 107 clones de células T intralesionais (infiltrantes do tecido cardíaco), provenientes de 4 pacientes com FR. Neste trabalho, demonstrou-se uma resposta proliferativa desses clones, tanto frente a peptídeos de segmentos específicos de M5 (aminoácidos 1-25; 81-103; e 163-177), como frente a proteínas derivadas do tecido

miocárdico. Este trabalho seminal permitiu pela primeira vez se estabelecer o reconhecimento cruzado por linfócitos T, como o mecanismo patogênico na febre reumática. O direcionamento da resposta celular na febre reumática contra antígenos específicos da proteína M foi extensivamente demonstrado, eliminando a possibilidade de reconhecimento da proteína M via efeito de superantígeno (Degnan et al., 1997; Guilherme et al., 2000;). Mais tarde, demonstrou-se que os mesmos epitopos da proteína M5 foram reconhecidos por clones derivados tanto do sangue periférico como de linfócitos infiltrando válvulas cardíacas destes pacientes (Guilherme et al., 2001).

1.8 Modelos Animais em Febre Reumática

Os seres humanos são o hospedeiro e único reservatório dos GAS. Portanto, um dos principais obstáculos no estudo da FR tem sido a falta de um modelo animal adequado para a doença. Animais não são facilmente infectáveis e, uma vez infectados, não mantêm a bactéria por períodos significativos. Alguns pesquisadores procuraram inclusive utilizar símios babuínos para o estabelecimento de um modelo animal mais fidedigno para a FR. Neste sentido, procurou-se induzir a doença através da inoculação oral de GAS tipo M1. Por até seis semanas de monitoramento foi possível isolar cepas de GAS na orofaringe dos animais. Apesar de haver formação de anticorpos contra produtos bacterianos (ASLO e anti-M), não há presença de faringite sintomática (Ashbaugh et al., 2000). Mais recentemente, um modelo usando a inoculação naso-faríngea em macacos “*cynomolgus*” produziu pela primeira vez faringite similar à humana (Virtaneva et al., 2003). Ainda assim, estes são animais caros, de difícil manutenção, com poucos centros no mundo habilitados a trabalhar com os mesmos e, não se sabe se esse animal é capaz de produzir FR.

Portanto, as várias tentativas de reproduzir a doença em animais se baseavam em geral na imunização dos animais com extratos de *S. pyogenes* ou produtos bacterianos específicos. Os camundongos da linhagem isogênica BALB/c jovens ou coelhos, eram os animais de preferência. Nos anos 40 um dos estudos mais usados, foi o modelo descrito por Murphy e Swift (revisto por Unny e Middlebrooks, 1983), onde coelhos eram imunizados pela via intradérmica com *S. pyogenes* mortos. Apenas alguns animais desenvolviam lesões caracterizadas por inflamação aguda e

crônica. Nos anos 50 usou-se a inoculação de GAS intra-faríngea em coelhos, com resultados pouco reprodutíveis (Glaser et al., 1955). Nos anos 60, foi descrito em camundongos, um modelo baseado na imunização intra peritoneal dos animais com extratos sonicados de *S. pyogenes* (Cromartie e Craddock, 1966). No entanto, este modelo não comprovou definitivamente que as lesões produzidas eram corpos de Aschoff. Estes estudos se limitavam às análises histológicas dos animais imunizados. Uma das dificuldades dos trabalhos com animais, repousa num consenso geral de que um modelo animal de FR, para ser adequado deve obrigatoriamente demonstrar a presença do nódulo de Aschoff.

Assim devido às dificuldades em reproduzir a doença em animais, vários estudos foram conduzidos em animais que sequer contraem infecção por GAS em condições naturais. Estes estudos se limitaram em avaliar o efeito de imunização com proteínas bacterianas na colonização da orofaringe, que é temporária (poucos dias), após doses maciças de inóculo (10 µL de 10⁹ CFU/mL intranasal) ou então a avaliação da letalidade após injeções intraperitoneais (Bessen e Fischetti, 1990).

Os resultados obtidos com a imunização de coelhos, camundongos, ratos ou macacos, entretanto, foram sempre contraditórios e não reprodutíveis (revisto por Unny e Middlebrooks, 1983; revisto por Cunningham, 2000). Um dos primeiros estudos em animal a focar o papel dos linfócitos foi realizado no Brasil, em 1982 (Dos Reis et al., 1982). Neste trabalho, camundongos foram imunizados com extratos de *S. pyogenes*. Estes animais apresentaram lesões semelhantes às da FR e a transferência de células de animais imunizados induziu a doença, reforçando o papel dos linfócitos T e macrófagos na deflagração da doença animal.

Em 1990, Kodama (1990), relata o uso de ratos Lewis para o estudo de miocardite induzida por miosina, com grandes vantagens em relação ao modelo de miocardite auto-imune original usando camundongos, uma vez que estes animais desenvolviam mais manifestações clínicas da doença. Este animal é um modelo já consagrado para doenças auto-imunes causadas por linfócitos T CD4 (revisto em Wegmann, 1994), como encefalite alérgica experimental (revisto em Fournie, et al., 2001), a uveíte alérgica experimental (Wildner e Dietrichs-Moehring, 2005) e artrite reumatóide (Ridge et al., 1986).

Como a miosina já havia sido identificada como um alvo da reação cruzada com a proteína M na febre reumática, Cunningham e cols. (2001) testam em ratos Lewis, a imunização com proteína M6 recombinante buscando induzir doença valvular cardíaca (Quinn et al., 2001). Neste trabalho, em 3 de 6 ratos Lewis imunizados com M6, são descritas as lesões cardíacas, inclusive formações verrucosas, e a presença de nódulos de Aschoff e células de Anistchikow (achados patognomônicos da FR). Mais além, o acometimento principal observado se localizava nas válvulas cardíacas, reproduzindo assim, todos os aspectos histopatológicos da doença. É sugerido ainda neste trabalho, que a região do fragmento amino-terminal da proteína M6 possui os epitopos patogênicos responsáveis pela reprodução da doença reumática auto-imune. Em 2001, Quinn et al relataram que uma seqüência da proteína M, localizada na região A, como a responsável pela valvulite em um modelo animal. Neste mesmo trabalho os autores afirmam que epitopos da região C não induziram lesões no miocárdio (Quinn et al., 2001). Este modelo, entretanto, ainda não foi reproduzido por nenhum laboratório.

Em 2002, o mesmo grupo usa novamente os ratos Lewis, mostrando reações cruzadas entre a miosina e a proteína M. Desta vez células derivadas de animais sensibilizados por imunização com fragmentos da cadeia pesada da miosina cardíaca (HMM, do inglês “heavy meromyosin” e subfragmento S2), mostram proliferação específica contra peptídeos específicos da proteína M5 localizados na região de repetições A/B, mas também com dois peptídeos da região conservada de repetições C (Galvin et al., 2002).

Em 2003, um grupo Australiano, experimentou um esquema de imunização similar ao descrito pelo grupo americano, e não foi capaz de produzir a doença, como descrito pelos americanos. Este grupo descreveu, entretanto, a reprodução de doença valvular em ratos Lewis após a imunização com um pool de peptídeos da região carboxi-terminal da proteína M5 (no domínio das repetições C). Outros grupos de animais foram imunizados com os fragmentos PepM1 ou PepM6 (que contém a região amino-terminal da proteína M1 e amino-terminal da proteína M6) (Lymbury et al., 2003). Nestes últimos, não foi observada nenhuma lesão histológica além dos controles imunizados com PBS.

Portanto, a região responsável pela valvulite em animais permanece ainda indefinida. Várias estratégias de imunoproteção a infecção por GAS, estão alicerçadas em vacinas usando segmentos específicos da proteína M, entre eles a região aminoterminal (Brandt et al., 2000; Kotloff et al., 2004), e região carboxi-terminal (Bessen e Fischetti, 1990; Pruksakorn et al., 1994). A definição da região responsável pela proteção sem desencadear lesão cardíaca guarda, portanto, importante relevância prática

No presente trabalho, buscamos reproduzir a indução de FR em rato Lewis, usando a proteína M1 recombinante completa por ser esta cepa a mais frequentemente encontrada nos episódios de estreptococcias e por estar associada com o desenvolvimento de FR.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um modelo animal de doença reumática cardíaca usando a proteína M1 recombinante do *S. pyogenes*.

2.2. Objetivos Específicos

Identificar as cepas de *S. pyogenes* prevalentes em nosso meio.

Produzir proteína M1 recombinante.

Avaliar a resposta a resposta auto-imune dirigida ao tecido cardíaco considerando:

- a. resposta humoral contra proteína M e miosina cardíaca
- b. resposta celular contra proteína M e miosina cardíaca
- c. lesão cardíaca (miocardite e/ ou valvulite)

3. Material e Métodos

3.1. *Streptococcus pyogenes*

3.1.1. Obtenção de Amostras Clínicas de *S. pyogenes*

Cepas de *Streptococcus pyogenes*, obtidas de pacientes atendidos no Complexo do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) foram isoladas na Divisão de Microbiologia do Laboratório Central e foram gentilmente cedidas pela Dra Flavia Rossi (LACE PR224). Os isolados de *S. pyogenes* foram recuperados de amostras aleatórias de orofaringe, tonsilas, pele e hemoculturas de pacientes tratados no HC-FMUSP e algumas amostras provenientes do Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras, Rio de Janeiro. A identificação baseou-se nas características da hemólise no ágar sangue e na sensibilidade a bacitracina. Estas amostras foram armazenadas em caldo de cultura contendo 10% (v/v) de sangue de carneiro (Biotério Boavista, Campinas) a -70°C, no laboratório de microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas.

3.1.2. Extração do DNA de *S. pyogenes*

As amostras de bactérias armazenadas foram inoculadas em placa de ágar sangue, que consiste em ágar sangue base (BBL Blood Agar Base, Becton Dickinson, Sparks, EUA e Le Point de Claix, França), suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro (Biotério Boavista, Campinas) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após crescimento em ágar sangue, foram inoculadas 5 a 10 colônias de *Streptococcus pyogenes* em 5 mL de caldo Todd-Hewitt (Difco Becton Dickinson, Sparks, MD), suplementado com 2% (p/v) de neopeptona (Difco, Becton Dickinson, St.Louis USA) e incubadas a 37°C por 10 a 16 horas, até a saturação. Para formar um estoque local de cepas 200 µL da cultura, crescida em caldo Todd-Hewitt (Difco Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), foram colocadas em microtubos plásticos estéreis, onde foi acrescentado 400 µL de sangue de carneiro e após homogeneização por inversão, foi armazenado a -80°C.

Uma alíquota da cultura saturada foi usada para produzir um lisado, segundo protocolo do Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (Center for

Diseases Control and Prevention) (www.cdc.gov). Para o preparo deste lisado, centrifugou-se 300 µL da cultura a 15.800g por 5 minutos, a 5°C (microcentrífuga micromax RF, Thermo IEC, Needham Heights, MA, EUA). Foi desprezado o sobrenadante e o botão bacteriano foi armazenado a 4°C. Esse botão foi ressuspensão em 300 µL de cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,85% (p/v) e incubado a 70°C por 15 minutos. Centrifugamos as amostras a 15.800g por 2 minutos e desprezamos o sobrenadante. O novo botão formado foi ressuspensão em 50 µL solução de tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Merck) 10mM, acrescido de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Merck) 1 mM, pH 8,0 (TE); contendo ainda 10 µL de mutanolisina (3000 U/mL) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 2 µL de hialuronidase (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich). O material foi incubado a 37°C por 30 minutos, seguido de nova incubação a 100°C por 10 minutos, produzindo os lisados bacterianos. Após, o protocolo original sofreu as seguintes modificações: os lisados foram tratados com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, (Invitrogen, Life-Technologies, Carlsbad, CA, USA), na proporção de 25: 24: 1 (v/v) para eliminação de contaminantes protéicos da amostra e purificação dos ácidos nucleicos. Após nova centrifugação a 15.800g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e tratado com adição de 10% (v/v) de acetato de sódio 3M (Merck) para cada volume da solução de ácidos nucleicos, seguido de congelamento a -173°C para precipitação da amostra. A amostra foi então centrifugada a 15.800g a 5°C por 30 minutos. Em seguida, efetuou-se a lavagem do botão com 1 mL de etanol 70% e nova centrifugação 15.800g por 5 min. O botão de DNA resultante foi secado a temperatura ambiente, ressuspensão em 20 µL de água de injeção e armazenado a -20°C até o uso.

3.1.3. PCR para gene *emm*

A reação de polimerização em cadeia (PCR, do inglês “*polymerase chain reaction*”) foi realizada para amplificação do gene da proteína M do *Streptococcus pyogenes*. Iniciadores (*primers*) específicos, desenhados para região conservada da proteína M capazes de amplificar todos os genótipos de *S. pyogenes* (“*primers All M*”), iniciador-1 (5'-TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA-3') e 2 (5'-

GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT-3'), já descritos na literatura, foram usados nos PCR, como previamente descrito (Harbaugh, 1993). Cinco microlitros da suspensão de ácidos nucleicos foram usados como molde (template) para as reações padrão de PCR em um volume de 50 µL, que também incluíam 2U da enzima Taq DNA polimerase, 1 µM de cada iniciador, 0,25 mM de uma mistura de deoxi-nucleotídeos, 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão Tris-HCl (pH 8,8) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Uma alíquota do produto amplificado foi analisada em gel de agarose e a quantidade de DNA amplificada foi estimada através da comparação de intensidade das bandas com o marcador de baixo peso molecular (NEB, Ipswich, MA, EUA).

3.1.4. Padronização do Seqüenciamento do gene *emm*

Para amplificação das amostras de *S. pyogenes* foi necessária a padronização do preparo dos lisados. O melhor resultado foi obtido após o tratamento das amostras com fenol-clorofórmio. Na reação de PCR foi necessário reduzir a quantidade de MgCl₂ para 1,5mM, de forma a diminuir a extringência da reação possibilitando a amplificação de mais amostras. Na reação de "Big Dye" foi necessário o aumento da concentração do reagente em virtude do gene *emm* possuir aproximadamente 900 bp e ser um fragmento grande para ser seqüenciado.

3.1.5. Seqüenciamento Gênico e Alinhamento

Após análise das amostras, os produtos de PCR foram seqüenciados usando o iniciador 1 no método do dideoxinucleotídeo terminador de cadeias, com o teste comercial "BigDye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA-EUA). Esse kit se baseia no método de terminação da cadeia de DNA por incorporação de dideoxinucleotídeos marcados numa reação tipo PCR. As amostras foram amplificadas em apenas uma das fitas do DNA para o seqüenciamento. Em seguida, as amostras foram precipitadas utilizando isopropanol 75%, lavadas com etanol 70% e secas a 95°C. Foram então ressuspensas em 2 µL de Tampão Formamida [1:5, AB Loading Buffer (Warrington, UK) e Formamida (UltraPure, Invitrogen), respectivamente] e corridas em um gel de

poliacrilamida de um seqüenciador genético ABI 377 (Applied Biosystems. Foster City, CA).

Todas as seqüências obtidas foram alinhadas através do programa *Chromas* (Technelysium Pty, Austrália, <http://www.technelysium.com.au>) e comparadas com as seqüências listadas no *EMBL/GenBank* utilizando o programa BLAST 2 (National Center for Biotechnology Information) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A identificação da cepa era definida quando o tipo do gene *emm* possuía 95% de identidade nos primeiros 160 nucleotídeos, contando do início da seqüência obtida com o *primer* 1. Esta seqüência inclui 70 pares de base, codificadores do peptídeo sinal e 90 pares de base que codificam os primeiros 30 a 60 aminoácidos da proteína madura.

3.2. Produção das Proteínas Recombinantes

Proteínas recombinantes M1ABC (proteína M1 total), M1AB (regiões da porção N-terminal A e B) e M1C (região C-terminal) foram produzidas através de técnicas padrão de biologia molecular (Sambrook et al., 1989). O gene codificando a porção extracelular madura (sem o peptídeo líder) da proteína M1 foi obtido por doação do Dr. Patrick Cleary (Departamento de Microbiologia, Minnesota, EUA). Este gene foi clonado em um plasmídeo, transformado em bactérias que foram inoculadas num “swab” de transporte para culturas bacterianas. O “swab” com as bactérias carregando o gene clonado foi usado para inocular placas contendo meio de cultura LB (Luria Broth Base, Invitrogen, Life-Technologies) contendo 1% (p/v) de ágar (Difco, Becton Dickinson, St.Louis, USA) e 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), que foram incubadas a 37°C para selecionar apenas o crescimento das bactérias carregando o vetor plasmidial. No dia seguinte, quatro colônias dentre as centenas que cresceram foram usadas para inocular em tubos com 5 mL de caldo LB com 100 µg/mL ampicilina. Estas culturas foram incubadas por 16 h sob agitação a 37°C, até a saturação. Após, uma parte das culturas saturadas foi diluída v/v glicerol (Sigma-Aldrich), enquanto a outra parte foi usada para a realização de “minipreps” do DNA plasmidial. Inicialmente, as “minipreps” foram realizadas pelo método da fervura (Sambrook et al; 1989), mas no decorrer do projeto passamos a usar os kits comerciais “Concert Rapid Plasmid Miniprep

System” (Gibco BRL, Reino Unido). A presença de DNA plasmidial foi checada em géis a 1% (p/v) de agarose.

3.2.1. Clonagem

O gene *emm1* usado, que codifica a proteína M do *Streptococcus pyogenes* tipo 1 (Harbaugh et al, 1993), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Patrick P. Cleary do Departamento de Microbiologia da Universidade de Minnesota, conforme mencionado acima. Com base na sequência do gene *emm1*, depositada no Banco de Genes “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> código de acesso: X62131) foram confeccionados conjuntos de pares de iniciadores com sítios de restrição específicos para a subclonagem dos diversos fragmentos do gene *emm* (**M1ABCFw** com sítio **XhoI** sublinhado: 5'-CGGCTC GAG AAC GGT GAT GGT AAT CCT AGG-3'; **M1ABCRev** com sítio **Pst I** sublinhado: 5'-CAA CTGCAG AAG TTT TGC TTG TAG TTC AGC-3'; **M1C-Fw**, com sítio de **BamHI** sublinhado: 5'-CG GGA TCC GAA AAA GAG CAG CTA ACG-3'; **M1AB-Rev**, com sítio de **PstI** sublinhado: 5'-CAA CTG CAG CGT TAG CTG CTC TTT TTC-3').

A Figura 2 mostra o esquema da localização dos iniciadores no gene *emm1* e os produtos de amplificação derivados dos vários pares de *primers*.

Figura 2. Localização dos iniciadores e fragmentos amplificados. Os iniciadores M1ABCFw, M1ABRev, M1CFw e M1ABCRev, na parte de cima da figura, localizados em relação ao gene *emm1*. Os fragmentos amplificados estão mostrados na parte de baixo da figura, em relação ao gene *emm1*. M1ABCFw e M1ABCRev contêm sítios de restrição XhoI e PstI, respectivamente, e, através destes, se produziu o fragmento XhoI-emm1ABC-PstI. Os iniciadores M1ABCFw e M1ABRev, contendo os sítios de restrição XhoI e PstI, respectivamente, produzem o fragmento XhoI-emmAB-PstI; os iniciadores M1CFw e M1ABCRev, com os sítios de restrição XhoI e BamHI, respectivamente, produzem o fragmento BamHI-emmC-PstI

Os fragmentos emm1ABC, emmAB e emmC codificando respectivamente, as porções completa (domínios ABC), porção amino-terminal (AB) e porção carboxi-terminal (C) da proteína M1 extracelular madura (sem o peptídeo líder), foram amplificados em reações PCR padrão ($T_m = 55^\circ\text{C}$) usando os iniciadores acima descritos (Figura 1). Os fragmentos amplificados, bem como o vetor plasmidial pAE para expressão protéica em células bacterianas (Ramos et al., 2004) este último gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Lee Ho (Instituto Butantan, SP), foram digeridos com as enzimas de restrições apropriadas (Invitrogen) e os fragmentos então derivados foram cortados dos géis a 1% (p/v) de agarose e purificados usando o kit de purificação de DNA “Concert Rapid Gel Extraction System” (Gibco BRL-Life Technologies). Uma vez purificados, tanto os fragmentos dos DNA do inserto bem como os vetores pAE com as digestões correspondentes, foram ligados em reações padrão com ligase de DNA T4 (Invitrogen) a 4°C por 16hs, gerando respectivamente as construções plasmidiais: pAEemmABC, pAEemmAB e pAEemmC (Figura 2).

Figura 3. Elementos do vetor pAE e inserção do fragmento M1ABC Ao pAE foram ligados os segmentos gênicos codificando os segmentos protéicos M1ABC, M1AB e M1C. O vetor pAE apresenta uma origem de replicação colí EI, que garante alto número de cópias, um gene de seleção para resistência em ampicilina, um promotor da RNA polimerase do fago T7, governando a expressão de 6 histidinas fundidas ao início de um sítio de clonagem múltipla.

O vetor pAE (Figura 3) usa uma sequência do promotor T7 para governar a expressão em bactérias de peptídeos de interesse. Uma sequência de seis histidinas está logo abaixo do promotor e imediatamente ao fim das quais está o sítio de clonagem múltipla, onde foi inserido o segmento gênico de interesse, e após o qual estão as sequências de terminação próprias do vetor (Ramos et al., 2004). O segmento gênico de interesse (emmabc, emmab, ou emmc), foi clonado na mesma fase de leitura da sequência que codifica a tradução das seis histidinas. Dessa forma, o promotor T7 governa a produção de uma “cabeça” peptídica de seis histidinas fundida à proteína codificada pelo segmento gênico clonado distalmente a esta, formando quimeras: 6-his-M1ABC, 6-his-M1AB ou 6his-M1C. Após transformação das construções de DNA plasmidial em bactérias *E. coli* DH5 α (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA), usando o método do fosfato de cálcio (Sambrook et al., 1989), estes plasmídios foram então amplificados durante o crescimento das culturas das bactérias transformadas. Os precipitados das culturas das bactérias transformadas com construções plasmidiais, obtidos após centrifugação por 1 minuto a 2.000g a 4°C, foram empregados para a extração do DNA plasmidial, através dos kits “Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System” (Promega, Madison WI, EUA). Os clones obtidos de cada construção foram seqüenciados, confirmando a clonagem em fase e a ausência de mutações significativas no segmento clonado.

3.2.2. Expressão e Purificação

Alíquotas dos plasmídeos pAEemmABC, pAEemmAB e pAEemmC foram transformados em bactérias *E. coli* cepa BL21 (DE3) (Novagen, EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany), usando o método do fosfato de cálcio. Bactérias transformadas foram crescidas em placas com meio LB, Luria Broth Base (Invitrogen, Life-Technologies) acrescido de 1% (p/v) de ágar por 16 horas. Colônias de bactérias transformadas foram armazenadas em glicerol 50% (v/v), estéril a -70°C, até uso subsequente. A partir da colônia armazenada em glicerol com o clone original seqüenciado, foram crescidas culturas de bactérias para produção de proteínas. Inicialmente, produziu-se um pré-inóculo usando uma alçada do estoque em glicerol para inocular 10 mL de caldo 2YT composto por extrato de

levedura (Biobrás, Montes Claros, MG), triptona (Biobrás, Montes Claros, MG) e cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. Este pré-inóculo, por sua vez, foi crescido a 37°C sob agitação (Orbital Shaker, ThermoForma, Marietta, OH, EUA), até a saturação medida pela densidade ótica (D.O.) de 0.1 em 600 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro GeneQuant pro (Biochrom, Cambridge, Inglaterra). Esta cultura saturada foi usada para inocular 500 mL de um caldo de meio 2YT contendo 100 µg/mL de ampicilina. Este caldo foi crescido a 37°C sob agitação de 240 rpm no agitador orbital, até a densidade ótica atingir entre 0.6 a 0.8 sob comprimento de onda de 600 nm. Neste momento retirou-se uma alíquota de 1 mL do caldo de cultura (denominada alíquota pré-indução). Adicionou-se 1 mL de isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG, Sigma-Aldrich, St.Louis-EUA) a 1M/litro de cultura. A cultura foi crescida ainda sob agitação a 37°C, por um período adicional de 4 a 8 h, variando o tempo conforme a proteína desejada. Ao fim deste período foi retirada uma outra alíquota de 1 mL (denominada pós-indução). As alíquotas pré e pós-indução foram imediatamente centrifugadas a 15.800g, por 1 minuto a 4°C em microcentrífuga, o sobrenadante foi descartado e o botão formado foi armazenado a -20°C. Os 500 mL de caldo de cultura foram centrifugados a 1.500g por 30 minutos a 4°C (Sorvall Instruments, DuPont-EUA) em rotor HS-4, e o botão armazenado a -20°C. Esse botão foi posteriormente tratado com solução de lise, que consiste de solução de cloreto de sódio 300 mM (Merck), contendo 50mM fosfato de sódio monobásico (Merck), 5mM de Imidazole (Sigma-Aldrich) e 0.5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), em banho de gelo por 2 h. O lisado foi centrifugado a 10.000g por 30 minutos a 4°C, usando-se o rotor SS34 em centrífuga Sorvall. O sobrenadante foi transferido para colunas de purificação por afinidade com resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen), que se liga às seis histidinas no início de cada proteína recombinante. A coluna foi então incubada sob agitação por 2 h a temperatura ambiente ou por 16 h a 4°C. Após este período, a coluna foi colocada em um suporte metálico e esta fração foi coletada por decantação e denominada filtrado. A coluna foi lavada com até 1 litro de Tampão de Lavagem, que consiste em solução de fosfato de sódio monobásico 50mM (Merck). Uma alíquota desta fração, denominada lavado, foi coletada. A coluna foi finalmente incubada com Tampão de Eluição, que consiste

em solução de cloreto de sódio 300mM, acrescido de fosfato de sódio monobásico 50mM e imidazol 500mM, por 5 min a temperatura ambiente. A fração coletada foi denominada eluato. As várias frações coletadas (filtrado, lavado e eluato), foram armazenadas a 4°C ou congeladas -20°C até serem analisadas.

3.2.3. Concentração e Quantificação das Proteínas Recombinantes

Inicialmente, as várias frações coletadas da coluna foram analisadas em géis de poliacrilamida a 15% na presença de SDS (15% SDS-PAGE) para verificação da proteína presente com o peso molecular esperado, como descrito abaixo (item 2.4). Uma vez a proteína presente, os eluatos de vários experimentos para cada uma das três proteínas foram combinados em um pool protéico específico (um pool de M1ABC, um de M1AB e um de M1C). Cada pool foi então concentrado por diálise a 4°C, em membranas “Spectrapor Membrane Tubing” (Spectrum Medical Industries, Los Angeles-EUA) contra uma solução de 20% PEG 8.000 (Invitrogen) em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para cada proteína produzida escolheu-se uma membrana com limite de peso molecular “*cutoff*” mais apropriado: 3.000-5.000 kDa para M1AB e M1C e 15.000-25.000 kDa para M1ABC. Posteriormente, as proteínas foram dialisadas contra PBS, para remover o PEG 8.000. Terminada a concentração, a solução contendo as proteínas foi filtrada usando-se filtros com poros de 0,22 nm. A concentração protéica foi quantificada com kit “BCA Protein Assay” (Pierce, Rockford, IL-EUA) e em seguida, a amostra foi armazenada a -20°C.

3.2.4. Preparação de Extratos e Solução de Proteínas para SDS-PAGE.

Para análise em géis de SDS-PAGE (15%), foram usados os extratos das bactérias carregando os vetores de expressão, as frações coletadas da coluna de purificação: filtrado, lavado, eluato e proteínas em fase final para uso, diluídas em PBS.

Os botões de cultura das bactérias com os vetores de expressão, pré e pós-indução com IPTG (item 2.2), armazenados a -20°C, foram ressuspensos em 80 µL de Tampão Laemmly fervidos por 10 min a 94°C, e uma alíquota de 5uL desta solução foi usada para corridas em gel de 15% SDS-PAGE. Para as várias frações coletadas das colunas de purificação (filtrado, lavado e eluato), 10 uL de cada fração foi misturado com 5 uL de Tampão Laemmly e 10uL usado para a corrida em 15% SDS-

PAGE. Para as proteínas já concentradas, dialisadas, filtradas e quantificadas, uma alíquota dessas proteínas correspondente a 2 µg foi ressuspensa em um volume de 5 µL de PBS, misturado a 5 µL de tampão Laemmly e 2-5 µL da mistura foi usado para corrida em 15% SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi removido e corado com azul de Coomassie (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Alíquotas das proteínas usadas também foram analisadas por espectrometria de massas em aparelho Ettan MALDI Toff/Pro (Amersham-Pharmacia, Upsala, Suécia), para confirmação do tamanho e pureza das proteínas obtidas.

3.2.5. Remoção e Dosagem de Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS foi removido das proteínas recombinantes através de extração com Triton X-114 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) ou, alternativamente, usando colunas Acticlean Etox (Stereogene, Carlsbad, CA-EUA), para proteínas M1ABC e M1C que possuem ponto isoelétrico (pI) maior que 5.5, de acordo com as instruções do fabricante.

Padronizou-se depois, o protocolo do Triton X-114 para a remoção de endotoxinas das proteínas recombinantes, adaptado de Aida e Pabst (1990) e de Anspach (2001). Resumidamente, inicialmente, preparou-se uma solução de Triton X-114 10% (v/v) em água apirogênica e incubou-se a 4°C na geladeira para a completa dissolução do detergente. Essa solução foi misturada com a solução de proteínas em PBS, em uma relação 1:1 (v/v). Os tubos foram incubados no gelo por pelo menos 30 minutos, agitando-se cada 5 a 10 minutos em Vortex MaxiMixII (ThermoLyne Barnstead International, Dubuque, IO, EUA). Em seguida, os tubos foram aquecidos a 37°C por 5 minutos, para permitir a formação de duas fases. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se uma fase de detergente no fundo do tubo. A fase aquosa foi removida cuidadosamente para não misturar com a fase oleosa. Este ciclo foi repetido um mínimo de 6 vezes, e ambas, a concentração protéica e a quantidade de LPS foram medidas.

3.2.6. Teste de endotoxina por LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) cromogênico QCL1000

A dosagem do LPS foi realizada com o kit LAL QCL 1000 cromogênico (BioWhittaker - Cambrex, Walkersville, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, usando alíquotas da proteína diluída em água bidestilada. Em linhas gerais, este teste foi desenvolvido a partir da observação de que o *Limulus* (“caranguejo fóssil” vivo marinho que habita a costa leste dos Estados Unidos), após infecção por bactéria gram-negativa, morre por coagulações intravasculares, devido à atividade de endotoxinas. Uma pró-enzima, presente no lisado de amebócitos do *Limulus*, é capaz de se converter em uma enzima, mas somente na presença de endotoxina. Esta enzima, por sua vez, é capaz de degradar um substrato cromogênico, produzindo uma coloração amarela que é lida no comprimento de onda de 405-410nm. A padronização deste ensaio no nosso laboratório permitiu a quantificação de endotoxina presente nas amostras de proteínas recombinantes antes e pós-tratamento com Triton X-114. Todas as proteínas usadas em ensaios de proliferação de linfócitos T, possuíam no máximo 25 EU de LPS/mL.

3.3. Animais

3.3.1. Procedência e Manutenção

Ratos isogênicos da linhagem Lewis, fêmeas com 6 a 8 semanas de idade e livres de patógenos específicos (SPF, do inglês “*specific pathogen free*”), foram adquiridos do biotério de criação da Universidade de Campinas, CEMIB (Campinas). Os animais foram mantidos em condições SPF em nosso biotério, situado no Instituto de Medicina Tropical II (IMT). Os animais foram manipulados e mantidos de acordo com as regras de bem estar animal do Comitê de Ética da Universidade de São Paulo. Um médico veterinário supervisionou a manipulação e condições de habitação adequadas, bem como o número estabelecido de animais por gaiola, o uso de anestésicos em procedimentos invasivos e técnicas normalizadas e procedimentos para eutanásia dos animais.

3.3.2. Imunizações

Grupos de ratos Lewis foram imunizados com 500 µg da proteína M1 diluída v/v em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), suplementado com de 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) inativadas pelo calor, gentilmente cedidas pelas Dras Roxane Maria Fontes Piazza e Mary Dalva Caparroz Vancetto (Instituto Butantã, SP).

Três protocolos de imunizações foram utilizados com variações na via de inoculação do antígeno (subcutânea ou intraperitoneal) e intervalo de tempo do sacrifício (Tabela II)

Para cada animal, injetou-se 250 µL em cada pata traseira (dia 0), pela via subcutânea (s.c.), ou 500 µL intraperitonealmente (i.p.).

Após 24 e 72 horas da primeira injeção, foi administrado pela via intra peritoneal 10^{10} *Bordetella pertussis* inativadas pelo formoldeído em um volume total de 150 µL (gentilmente cedidas pelas Dras Noemy Furuyama e Hisako Gondo Higashi, Instituto Butantã, SP). Os animais foram desafiados novamente com a proteína M1 recombinante diluída v/v em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), 7 dias após a primeira imunização. Grupos de animais imunizados com PBS e adjuvante completo e incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) bem como animais não manipulados também foram empregados, como controles do experimento.

Os ratos foram sacrificados após 14 ou 41 dias da última imunização de acordo com o protocolo escolhido (Figura 4). Os corações foram retirados e foram enviados para análise histopatológica. Células esplênicas e dos linfonodos foram coletadas para avaliação da resposta imune celular e amostras de soro pré e hiper-imune foram obtidas a partir da coleta de sangue pelo plexo retro-orbital dos animais e estocadas a -20°C, para posterior análise da resposta humoral.

Exp 1 e Exp 2 = i.p. 21 dias; Exp 7 e Exp13 = s.c. 21 dias

Exp 14 = s.c. e 41 dias

Figura 4. Esquema dos Protocolos de Imunização Os animais foram injetados nos dias marcados d0 dia 0, d1 dia 1, d3 dia 3 e d7 dia7. O sacrifício (⊕) ocorreu sempre no d21 dia 21 ou d41 dia 41. O imunógeno era sempre M1 proteína M1ABC ou *B.p. Bordetella pertussis*. A via de imunização foi s.c. subcutânea ou i.p. intra peritoneal.

3.4. Avaliação das Respostas Imunes

3.4.1. Ensaio de proliferação celular

As células esplênicas e dos linfonodos drenantes foram obtidas por remoção cirúrgica, logo após o sacrifício dos animais, para a realização imediata do ensaio de proliferação. Todo o procedimento foi realizado sob condições de assepsia, utilizando-se material estéril, em capela de fluxo laminar. As células mononucleares provenientes do baço ou dos linfonodos drenantes dos ratos imunizados foram obtidas após maceração gentil dos órgãos contra uma tela estéril de nylon, e lavadas por centrifugação (1000 rpm a 4°C, por 10 minutos) com 10 mL de meio RPMI 5%, que consiste em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), Hepes 10 mM (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e os antibióticos Gentamicina (Gibco-Invitrogen) (40 µg/ml) e Pefflacin (20 µg/ml). Após a lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI-5% e utilizadas nos experimentos de proliferação celular com incorporação de timidina marcada com

trício (^3H), como descrito (Guilherme et al., 2000). Para tal, utilizamos 5×10^5 células esplênicas ou $2,5 \times 10^5$ células dos linfonodos em 200 μL de RPMI-5%/poço, em placas de 96 orifícios, fundo em U (Nunc, Dinamarca). Os testes foram conduzidos em triplicatas, e as células desafiadas com as proteínas recombinantes de *Streptococcus pyogenes* (M1ABC, M1AB e M1C) e miosina purificada de porco (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Como controle negativo da reação mantivemos poços contendo células sem estímulo adicional (proliferação espontânea) e para o controle positivo, utilizamos 4 $\mu\text{g/mL}$ de concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) por orifício. Após 48 h (células dos linfonodos) ou 72 h (células esplênicas) de incubação a 37°C em estufa com atmosfera úmida de CO_2 (5%) (Forma Scientific, USA), as células foram pulsadas com 0,5 $\mu\text{Ci/poço}$ de timidina triciada (Amersham, USA). Após nova incubação de 18 h, em estufa a 37°C , as células foram recolhidas em filtros coletores através de equipamento de coleta próprio (Cell Harvest, Wallac-Pharmacia, Sweden) e a contagem de incorporação da timidina foi realizada através do método de cintilação líquida para radiação β , em contador específico (Beta Plate, Wallac-Pharmacia, Sweden). O índice de estimulação (I.E.) foi calculado pela média das triplicatas para um determinado antígeno, em contagens por minuto (cpm), dividido pela média da triplicata do controle negativo. Foram considerados positivos os valores do I.E. maiores ou iguais a 2,0.

3.4.2. Detecção de Anticorpos

3.4.2.1. Amostras de soro

Amostras de soros foram obtidas a partir da coleta de sangue pelo plexo retro-orbital dos animais, antes (soro pré-imune, dia 0) e depois (soros imunes, dias 21 e 41), da imunização. As amostras de soros foram estocadas a -20°C , para a análise posterior através de ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo técnicas já estabelecidas (Harlow e Lane 1988).

3.4.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immune Sorbent Assay)

Placas de alta ligação (Immunoware, Pierce, USA) de 96 orifícios (Costar, Corning NY), foram recobertas com 1 μ M/50 μ L/poço das proteínas em estudo (M1ABC, M1AB, M1C ou miosina), diluídas em Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M (Merck), pH 9,6, por 1 h a 37°C, depois por 16 h adicionais a 4°C. Após bloqueio com 200 μ L/orifício de solução PBS-T-G, que consiste em PBS, adicionada de 0,25% (p/v) de gelatina (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e 0,05% (v/v) de Tween 20 (Merk, Alemanha), por 1 h a temperatura ambiente, os soros foram redistribuídos nas placas em diluições seriadas, a partir da diluição 1:100 em PBS-T-G, (50ul/poço). Após incubação por 2 h a 37°C, seguida de três lavagens em uma lavadora de ELISA automática Skan Washer 300 (Skatron Instruments, Noruega), com PBS adicionado de 0,1% (v/v) de Tween 20 (PBS-T, 200 μ L/poço), as placas foram incubadas por 1 h a 37°C com 50 μ L/poço do anticorpo de coelho anti-Imunoglobulinas de rato conjugado à peroxidase, diluído a 1:1000 em PBS-T-G (Monosan, Uden, The Netherlands). Finalmente, após nova lavagem com PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50 μ L do substrato de revelação, que consiste em 0,4 mg/mL de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), diluído em tampão citrato pH 5,0, acrescido de 0,4 μ L/mL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com 50 μ L/poço de solução de ácido sulfúrico a 4N e a leitura das placas foi realizada em 490 nm de comprimento de onda no leitor de placas de ELISA (μ Quant Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EUA), usando o programa KCjunior (USA).

3.4.2.3. Western Blotting

Os mesmos antígenos usados no ELISA foram analisados no formato “Western blotting” (Towbin, 1979) para avaliar a presença de anticorpos específicos. Inicialmente, 2-5 μ g das proteínas recombinantes ou os extratos protéicos de *S. pyogenes* com até 500 μ g de proteína foram solubilizados em tampão de Laemmly, foram aplicados em géis de SDS-PAGE a 12%, para separação por eletroforese. Foram usados faixas individuais para as diferentes proteínas recombinantes ou faixa

única de gel para os extratos protéicos, usando o sistema da BioRad de minigéis (Hercules CA, USA) (Laemmli, 1970). As proteínas do gel então foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hi-Bond (Micron, USA), usando um aparelho de transferência semi-seca (TE-70 Amersham, USA). Estas membranas foram posteriormente usadas em reações de *immunoblotting* convencional. No caso dos extratos protéicos, a membrana de nitrocelulose foi cortada em fitas/tiras de 3mm e cada tira/fita foi usada para testes contra os diferentes soros de ratos ou anticorpos específicos. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 1 mL de solução denominada PBS-T-M que consiste em PBS, contendo 0,05% (v/v) de Tween20 (Merck) e 1 mL de 5% de leite desnatado (Carnation Instanto Non Fat, Nestlé, Sólón, OH, EUA), por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida foi descartada a solução bloqueadora e 1 mL de anticorpo primário na diluição 1:100 em PBS-T, foi incubado as com membranas pré-bloqueadas, por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada com PBS-T. Foi então adicionado o anticorpo secundário; anti-imunoglobulinas de rato produzido em coelho (Monosan, Uden, Holanda), na diluição de 1:2.000 em PBS-T-M, e incubado com as membranas, por 1 h a temperatura ambiente, seguido de uma nova lavagem das fitas. Após lavagem do anticorpo secundário, um sinal quimioluminescente foi produzido usando o reagente do kit “ECL Plus chemiluminescence” (Amersham Biosciences, Buckinghamshire UK) e o mesmo sinal foi detectado usando filmes radiográficos Kodak X OMAT (Rochester, NY), sob vários tempos de exposição. Os resultados foram inspecionados visualmente.

3.4.3. Obtenção de linhagens de linfócitos infiltrantes do tecido cardíaco de ratos Lewis

O estabelecimento de linhagens de linfócitos T infiltrantes do tecido cardíaco, foi efetuado somente para o grupo de ratos Lewis submetidos ao protocolo de imunização com a proteína M1 recombinante, sacrifício após 41 dias da imunização. Fragmentos biópsias de tecido do miocárdio destes ratos foram retirados no momento do sacrifício dos animais. O tecido foi cortado em micro fragmentos, com auxílio de bisturi, e adicionados em placas de 96 poços fundo chato (Becton Dickson, Lincoln Park, NJ), contendo 100 µL de RPMI (2 a 3 fragmentos/poço). O meio RPMI 1640

(Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) foi suplementado com L-Glutamina 2mM (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), Hepes 10mM (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e antibióticos (Gentamicina e Peflacin) nas concentrações de 40 µg/ml e 20 µg/ml respectivamente, acrescidos de 10 % de soro fetal bovino inativado e 40 U IL-2 recombinante humana (Biosource Inc. California). Seis amostras de tecido de miocárdio de ratos Lewis imunizados com a proteína M1 recombinante e adjuvantes (L2, L3, L4, L5 e L6) e 04 amostras de miocárdio provenientes de ratos imunizados com PBS e adjuvantes (L11, L12, L13 e L14) foram fragmentadas e colocadas em placa de cultura de 96 orifícios (1/2 área) na presença de células mononucleares provenientes do baço de animais da mesma linhagem, não manipulados, irradiadas a 5000 rads (10^5 células/poço). As células mononucleares foram utilizadas como fornecedora de fatores de crescimento celular e como células apresentadoras de antígenos (próprio tecido cardíaco). O crescimento de linfócitos infiltrantes (linfoblastos) foi observado e na presença ou não de linfoblastos, no décimo dia de cultura, as células foram estimuladas com o mitógeno concavalina A (2 µg/ml Con-A), em presença de células mononucleares de baço de rato Lewis não manipulado e irradiadas a 5000 rads, com o intuito de expandir os linfoblastos em crescimento após os primeiros dias de cultivo. Após 10 dias do estímulo com Con A, as culturas com ou sem crescimento celular foram re-estimuladas com a proteína M1 recombinante (10 µg/mL), na presença de células mononucleares de baço irradiadas, para a expansão de linfócitos específicos, ou seja aqueles que foram ativados pela imunização do rato com a proteína M1 recombinante.

3.5. Avaliação Histopatológica

Logo após o sacrifício dos animais, houve a retirada cirúrgica do baço e linfonodos, seguida da remoção do coração. Os corações dos diversos animais foram lavados com injeção de 2mL de PBS usando-se uma seringa e agulha. Após a lavagem, foram colocados em formol tamponado a 10% por no mínimo 2 dias.

Cada coração foi inicialmente seccionado longitudinalmente, através do seu eixo maior, dividindo o órgão em cavidades anteriores e cavidades posteriores e então embutidos em blocos de parafina. Cortes de 5 µm foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) para posterior exame histológico. As avaliações histológicas (HE) para

detecção de lesões patológicas características da FR e DRC foram realizadas por médicos anátomo-patologistas habilitados, sem identificar se o material contido na lâmina era proveniente de animais imunizados ou controles.

As análises efetuadas por dois anátomo-patologista habilitados, empregaram os seguintes critérios:

1-No miocárdio:

- a) presença de infiltração focal e miocardite
- b) necrose
- c) nódulos de Aschoff
- d) hipertofia

2-No endocárdio:

- a) região valvular: presença de nódulos de Aschoff e infiltração linfocitária
- b) cavidades: presença de nódulos de Aschoff e infiltração linfocitária

O terceiro anátomo-patologista usou critérios distintos iniciais e elaborou a seguinte escala de pontuação para a análise dos cortes histológicos que foi seguida durante a análise dos tecidos, de acordo com os critérios e notas abaixo:

1. Espessamento da valva mitral
 - 0 - Ausente
 - 1+ - Espessamento leve e distribuição focal
 - 2+ - Espessamento leve difuso ou moderado e focal
 - 3+ - Espessamento moderado e difuso
2. Infiltrado inflamatório na valva mitral
 - 0 - Ausente
 - 1+ - Poucas células, distribuição focal
 - 2+ - Múltiplos focos com poucas células ou poucos focos com muitas células
 - 3+ - Múltiplos focos com muitas células
3. Inflamação intersticial no miocárdio do septo ventricular por linfócitos e macrófagos
 - 0 - Ausente
 - 1+ - Poucas células, distribuição focal
 - 2+ - Múltiplos focos com poucas células ou poucos focos com muitas células
 - 3+ - Múltiplos focos com muitas células
4. Presença no miocárdio do septo ventricular de grandes células mononucleares, irregulares e com afinidade pela hematoxilina (critério desenvolvido após análise preliminar dos resultados)
 - 0 - Ausente
 - 1+ - Até 0,8 células por campo com aumento de 10x

- 2+ - Acima de 0,8, até 1,2 células/ campo, aumento de 10x
 - 3+ - Mais de 1,2 células / campo aumento de 10x
5. Avaliação geral da inflamação no restante do corte (inclui valvas, células inflamatórias em geral e as células grandes basófilas)
- 0 - Ausente
 - 1+ - Poucas células, distribuição focal
 - 2+ - Múltiplos focos com poucas células ou poucos focos com muitas células
 - 3+ - Múltiplos focos com muitas células

Após dois dias, foi feita nova avaliação, pelo mesmo observador, considerando os mesmos critérios. Também desta vez não houve conhecimento prévio da identificação das lâminas, que, foram analisadas em outra ordem também aleatória. As duas avaliações deste anátomo patologista foram somadas, e divididas por dois, obtendo-se um valor médio para cada parâmetro em cada animal. Não foram descritas células de Anitchikow e nódulos de Ashoff.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 3.0. Foram usados o teste não paramétrico, teste U de Mann Whitney, apenas foram considerados significantes, resultados com valores de $p < 0,01$. Os resultados foram expressos em médias, com indicação do erro padrão da média.

4. Resultados

4.1. Identificação das cepas de *S.pyogenes*

Os sorotipos/genótipos de *S. pyogenes*, mais prevalentes em nosso meio foram determinados utilizando amostras obtidas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo e no Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras no Rio de Janeiro. No período de 2002 a 2004, foram coletadas 200 amostras no Hospital das Clínicas, e 4 amostras do Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras, totalizando 204 amostras, analisadas.

Noventa e cinco amostras foram lisadas e o gene *emm* amplificado por PCR, no entanto só foi possível identificar 54 amostras até o momento. As demais estão sendo re-analisadas (Barros et al., 2006).

Os 54 isolados de *S. pyogenes* foram provenientes de pele (n=4), sangue (n=7), orofaringe (n=14), tonsilas (n=12), outros sítios (n=5) e origem desconhecida (n=12). Vinte e seis tipos diferentes de cepas foram identificados nos 54 isolados conforme mostrado na Tabela I.

Tabela I - Fonte e identificação das cepas de *S. pyogenes*

Fonte	Cepas	Amostras	Fonte	Cepas	Amostras
Orofaringe	emm 1	39	Pele	emm 1	
Orofaringe	emm 1	138	Pele	emm 22	
Orofaringe	emm 4	149	Pele	emm 87	
Orofaringe	emm 12	82	Sangue	emm 1	
Orofaringe	emm 22	145	Sangue	emm 1	
Orofaringe	emm 22	150	Sangue	emm 12	
Orofaringe	emm 22	155	Sangue	emm 18	
Orofaringe	emm 22	167	Sangue	emm 81	
Orofaringe	emm 57	140	Sangue	emm 87	
Orofaringe	emm 71	153	Sangue	emm 92	
Orofaringe	emm 75	142	Sangue	emm 102	
Orofaringe	emm 78	72	Sangue	emm 6	
Orofaringe	emm 94	77	Sangue	emm 86	
Orofaringe	emm 108	94	Sangue	emm 1	
Tonsilas	emm 1	54	Secreção Pulmonar	emm 75	
Tonsilas	emm 1	57	Desconhecido	emm 1	
Tonsilas	emm 6	19	Desconhecido	emm 1	
Tonsilas	emm 11	53	Desconhecido	emm 1	
Tonsilas	emm 22	38	Desconhecido	emm 6	
Tonsilas	emm 22	50	Desconhecido	emm 24	
Tonsilas	emm 50	47	Desconhecido	emm 33	
Tonsilas	emm 77	29	Desconhecido	emm 64	
Tonsilas	emm 77	60	Desconhecido	emm 68	
Tonsilas	emm 87	52	Desconhecido	emm 75	
Tonsilas	emm 87	56	Desconhecido	emm 76	
Tonsilas	emm 87	15	Desconhecido	emm 92	
			Desconhecido	emm 101	

Dentre as 26 cepas identificadas, 8 tipos foram mais frequentes, entre eles M1 (20%), M22 (13%), M87 (9%), M6 (7%), M75 (6%) e M92, M77 M12 (4%). As demais cepas foram agrupadas e perfazem um percentual de 33 % (Figura 5)

Figura 5. Frequência das diversas cepas analisadas. Os diferentes genótipos das diferentes cepas isoladas distribuídas de acordo com sua frequência.

4.2. Produção de Proteínas Recombinantes

O estudo piloto da identificação das cepas em nosso meio mostrou que o genótipo emm1 (equivalente ao sorotipo M1) era o mais encontrado nas amostras brasileiras. Este também é o sorotipo mais prevalente em vários países (EUA, México, entre outros). Além disso, este genótipo apresenta alta virulência e está associado tanto à doença cutânea e invasiva como à febre reumática. Com base nestes dados, escolhemos usar a proteína M1 como imunógeno para os experimentos seguintes.

4.2.1 Amplificação de plasmídeos com o gene M1

Obtivemos o gene emm1 codificando a porção extracelular madura (sem o peptídeo líder) da proteína M1 através de doação do Dr. Patrick Cleary (Departamento de Microbiologia, Minnesota). Este DNA plasmidial foi amplificado em bactérias *E.coli* DH5 α , extraído e verificado em gel a 1% de agarose (dados não mostrados).

4.2.2. PCR para amplificação dos segmentos gênicos codificando M1ABC, M1AB e M1C.

Três pares de oligonucleotídeos iniciadores, para subclonagem dos segmentos gênicos desejados em vetores de expressão foram desenhados. Esses pares de iniciadores amplificaram especificamente: **a)** a região do gene *emm1* codificando a porção extracelular madura (sem o peptídeo líder) completa da proteína M1: M1ABC (iniciadores M1ABCFw e M1CRev), segmento gênico de 1,05kb (Figura 6 A, Faixas 2 e 3), **b)** a região de *emm1* codificando a porção amino-terminal da proteína M1: M1AB (iniciadores M1ABCFw e M1ABRev) segmento gênico de 551pb (Figura 6 B, Faixa 2) e **c)** iniciadores para amplificar a região do gene *emm1* codificante da porção carbóxi-terminal da proteína M1, M1C (iniciadores M1ABFw e M1CRev) segmento gênico de 488pb (Figura 6 B, Faixa 3).

Figura 6. Amplificação dos fragmentos do gene *emm1* codificando M1ABC (A) e M1AB e M1C (B) amplificados por PCR Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 1%. **A. Faixa 1**-Pesos Moleculares, **Faixa 2 e 3**-PCR de *emm1*ABC (aproximadamente 1.05 kb, seta) **B. Faixa 1**-Pesos Moleculares, **Faixa 2**-PCR de *emm1*AB (551 pb, seta), **Faixa 3**-PCR *emm1*C (488 pb, seta).

Os segmentos de DNA amplificados foram digeridos com as enzimas apropriadas e ligados ao vetor de expressão bacteriana pAT (Ramos et al., 2004) (gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Lee Ho, do Instituto Butantan), digerido com as mesmas enzimas de restrição usadas para digerir os fragmentos de DNA a serem clonados, produzindo os vetores plasmídiais de expressão: pAEemmABC, pAEemmAB e pAEemmC.

As construções de DNA plasmidiais produzidas foram inicialmente analisadas em gel de agarose a1%, após restrição enzimática com enzimas apropriadas, produzindo segmentos de tamanhos previamente calculados, que confirmassem a clonagem. A Figura 7, mostra a análise em gel de agarose, após cortes por enzimas de restrição, das construções pAEemm1ABC (Figura 7. A), pAEemm1AB (Figura 7. B), e pAEemm1C (Figura 7. C). Os cortes em cada um dos três plasmídeos produziram fragmentos dos tamanhos esperados, sugerindo que as construções foram bem sucedidas. Todas as construções plasmidiais produzidas pAEemm1ABC, pAEemm1AB e pAEemm1C, foram posteriormente verificadas por seqüenciamento, confirmando que foram clonadas na mesma fase de leitura que as seis histidinas precedentes, do vetor, e que também estavam na fase de leitura do sinal de parada de tradução, incluído do vetor. Além disto nenhuma mutação significativa foi evidenciada nas construções produzidas.

Figura 7. Cortes nas construções plasmidiais pAT-M1ABC, com enzimas específicas Gel de agarose a 1% A. pAEemm1ABC. Faixa 1-pesos moleculares, Faixa 2-pAEemm1ABC cortado com PstI/XhoI; setas finas indicam os fragmentos derivados do vetor= 2.9kb e inserto =1.05kb. Faixa 3-plasmideo pAEemm1ABC não cortado: bandas de aproximadamente 4kb, 2kb e 1.2kb (circulado) setas grossas indicam as formas plasmídias circulares, circulares duplas e formas superretorcidas, respectivamente, B. pAEemm1AB. Faixa 1-pesos moleculares, Faixa 2-plasmideo pAEemm1AB não cortados (bandas de 4kb, 2kb e 1,4kb representam formas plasmídias circulares em anel, circulares e formas superretorcidas, respectivamente, Faixa 3-pAEemm1AB cortado com PstI/XhoI (setas indicam os fragmentos derivados do vetor= 2.9kb e inserto =550pb, circulado). C. pAEemm1C. Faixa 1-pesos moleculares. Faixa 1-plasmideo pAEemm1C não cortados (bandas de ~10kb, 2,2kb representam formas plasmídias circulares em anel e circulares, respectivamente, Faixa 3-pAEemm1C cortado com PstI/BamHI (setas finas indicam os fragmentos derivados do vetor =2.9kb, e do inserto = 448pb, além de formas plasmídias com digestão parcial ou não digeridas setas finas)

4.2.3. Expressão das proteínas recombinantes.

Os vetores DNAs plasmidiais com os segmentos clonados foram transformados em bactérias BL21-DE3, apropriadas para expressão de proteínas recombinantes.

A produção de cada uma das proteínas recombinantes necessitou de padronização, pois apresentavam diferentes características de crescimento, expressão e estabilidade. A proteína M1ABC era expressa idealmente com 6 h de indução, peso molecular de aproximadamente 40 kDa, como mostrado na Figura 8, faixa 7. A proteína M1AB por sua vez, apresentava expressão maior com 8 horas de indução, em grandes quantidades e altamente resistente a degradação. Já a proteína M1C possuía uma expressão máxima após 2 a 4 h de indução, e iniciava sua degradação após esse período, gerando quantidades modestas da proteína (dados não mostrados).

Figura 8. Tempo ideal para indução da expressão da proteína M1ABC Faixa 1- marcador de peso molecular; **Faixas 2 a 7-** extratos de bactéria BL21-DE3 transformada com o vetor pAT-M1ABC em vários tempos; de 1 a 6 horas pós indução com IPTG, respectivamente.

Uma vez definidos os tempos ideais para indução da expressão, as proteínas foram expressas em grandes quantidades de cultura líquida. Os extratos bacterianos foram armazenados em -20°C até a purificação em colunas de afinidade, baseadas na interação do níquel com as 6 histidinas do início das proteínas. As várias frações coletadas das colunas durante o processo de purificação foram analisadas em géis de poliacrilamida, confirmando a presença da proteína de tamanho esperado durante o seguimento do processo. A Figura 9 mostra a proteína M1ABC purificada (faixas 7, 8 e 9) e as várias frações coletadas no processo de purificação.

Figura 9. Purificação da proteína M1ABC recombinante Gel SDS-PAGE 12%. **Faixa PM** - marcador de peso molecular; **Faixa 1**- extrato de bactérias BL21DE3 transformadas com vetor plasmidial pAEM1ABC antes da indução com 1mM IPTG; **Faixa 2**- mesmo extrato pós-indução de 6 h com IPTG; **Faixa 3** - “filtrado”, coletado após incubação do extrato de bactérias pós-indução com a coluna de purificação; **Faixas 4, 5 e 6** - “lavado” coletado da mesma coluna após lavagem; **Faixas 7, 8 e 9** - proteína M1ABC purificada, removida da coluna com tampão de eluição que compete com as seis histidinas.

4.2.4. Remoção do LPS das proteínas recombinantes.

Após a concentração das proteínas por diálise em solução de PEG 8.000, as frações protéicas foram submetidas a procedimento para remoção de LPS, para o uso em cultura celular. A diálise e a remoção de LPS não acarretou degradação ou perda das proteínas (Figura 10). As proteínas M1AB e M1C apresentaram-se com os pesos moleculares de 22,3 kDa (faixa 3) e 19,6 kDa (faixas 4 e 5), respectivamente, como predito pela sequência de aminoácidos. A proteína M1ABC, no entanto apresentou peso molecular superior ao predito (40,3 kDa), aproximadamente 45 a 50 kDa (faixa 2 (Figura 10).

Figura 10. Proteínas M1ABC, M1AB e M1C após remoção do LPS Faixa 1- Marcadores de Pesos Moleculares; Faixa 2 - M1ABC, Faixa 3 - M1AB, Faixas 4 e 5- M1C.

O peso molecular da proteína M1ABC foi determinado por espectrometria de massa (Figura 11), e verificou-se que a solução com a proteína M1ABC recombinante produzia um pico de massa 40,99 kDa, correspondente ao peso esperado da proteína M1ABC recombinante. Outros picos menores provavelmente correspondem a fragmentos de degradação protéica.

Figura 11. Espectrofotometria de massa da proteína M1ABC O pico com massa de 40.997,602 Da - corresponde à proteína M1ABC recombinante (seta).

O peso molecular das proteínas recombinantes também foi confirmado usando-se um anticorpo monoclonal anti-histidina (Figura 12) e um anticorpo policlonal, proveniente de um animal imunizado com a proteína recombinante M1ABC (Figura 13) por ensaio de “Western blotting”. Os resultados mostram que as proteínas M1ABC (Figura 12A, faixa 1 e Figura 13, faixa 4) , M1AB (Figura 12B faixa 1 e Figura 13, faixa 3) e M1C (Figura 12B faixa 1 e Figura 13, faixa 1), apresentaram os pesos moleculares de aproximadamente 40kDa, 20 kDa, 20 kDa , respectivamente, como esperado.

Figura 12. Proteínas recombinantes reconhecidas por anticorpo monoclonal anti-6his A- Faixa 1– proteína M1ABC. B - Faixa 1 - M1C, Faixa 3- M1AB.

Figura 13. Proteínas recombinantes M1AB e M1C reconhecidas pelo soro de animais imunizados com M1ABC Faixa 1 – proteína M1C purificada, faixa 3 – proteína M1AB purificada, faixa 4 – proteína M1ABC

4.3. Imunização de Animais com a Proteína M1 recombinante

Com o intuito de desenvolvermos um modelo animal de FR usando a proteína M1 recombinante, inicialmente, seguiu-se o protocolo original descrito por Quinn *et al.* (Quinn et al., 2001). Neste trabalho, foi descrita a indução de miocardite e valvulite em ratos Lewis, 21 dias após a imunização dos animais com a proteína M6 recombinante, pela via intraperitoneal, além da presença de células de Antischkow e nódulos de Aschoff.

Quatorze animais foram imunizados com a proteína M1 (Experimentos E1, E2) pela via intraperitoneal, em acordo com o protocolo descrito, abaixo citado (Tabela II). Observamos a mortalidade de 4 animais (4 mortos/14 imunizados, 29%) um dia após a imunização inicial (E1) ou um dia após a dose de reforço de M1+ACF (E2). Observamos também que todos os animais apresentaram intenso desconforto logo após as injeções, contendo o adjuvante de Freund (ACF ou AIF), pela via intraperitoneal e muitos desenvolveram ascite. Devido à mortalidade e sofrimento observados nos animais após as imunizações via i.p. adotamos, a via subcutânea (s.c), conforme o segundo trabalho com ratos Lewis publicados pelo mesmo grupo (Galvin et al., 2002), além do trabalho de outros (Lymbury et al., 2002). Nos lotes experimentais seguintes, (E7 e E13), 19 animais foram imunizados com proteína M1ABC pela via s.c. e nenhuma mortalidade foi observada. Estes animais foram igualmente sacrificados 21 dias após o início das imunizações.

Nos experimentos que envolveram sacrifício 21 dias após a imunização (E1,E2, E7 e E13), foi analisado o total de 52 animais, sendo 29 animais imunizados com M1ABC, 15 imunizados com PBS, 1 animal imunizado com miosina, todos em adjuvante completo de Freund (ACF) e incompleto de Freund (AIF) e *B. pertussis*. Sete animais controles não manipulados (NM) foram mantidos nas mesmas condições que os outros grupos experimentais (Tabela II).

Com base nos resultados obtidos das análises histopatológicas dos diversos animais sacrificados após 21 dias da imunização (imunização i.p. e s.c.), um novo lote de animais foi imunizado, seguindo as mesmas doses de imunógeno, adjuvantes e reforço, nos mesmos intervalos de tempo do protocolo original, entretanto, o sacrifício dos animais foi postergado para 41 dias após a imunização (Figura 4,

Material e Métodos). Esta alteração teve por finalidade avaliarmos se o tempo mais prolongado de experimentação acarretaria no surgimento de lesões no miocárdio e tecido valvular similares as lesões histopatológicas observadas na doença reumática cardíaca em humanos. A Tabela II resume os protocolos de desenvolvimento do modelo animal de FR (número de animais em cada grupo, amostra e controles), com sacrifício em 21 e 41 dias após a imunização.

Tabela II - Número de animais usados nos protocolos experimentais via i.p. e s.c. com sacrifício em 21 dias e 41 dias

Experimentos	Via de imunização	Antígeno	Adjuvante				Sacrifício
i.p. 21d	i.p./s.c.	M1	Mio	PBS	NM	ACF+AIF+ <i>B.p</i>	21d/41d
Exp1	i.p.	3 (1*)				+	21d
Exp 1	-				1	-	21d
Exp 2	i.p.	7 (3*)				+	21d
Exp 2	i.p.			10		+	21d
Exp 2	-				4	-	21d
Subtotal E1+E2		10 (4*)		10	5		25 animais
s.c. 21d	imunização	M1	Mio	PBS	NM	ACF+AIF+ <i>B.p</i>	Sacrifício
Exp 7	s.c.	7				+	21d
Exp 7	s.c.			3		+	21d
Exp 7	-				2	-	21d
Exp 13	s.c.	11				+	21d
Exp 13	s.c.		1			+	21d
Exp 13	s.c.			2		+	21d
Subtotal E7+E13	s.c.	18	1	5	2		26 animais
s.c. 41d	imunização	M1	Mio	PBS	NM	ACF+AIF+ <i>B.p</i>	Sacrifício
Exp 14	s.c.	7				+	41d
Exp 14	s.c.			4		+	41d
Subtotal E14	s.c.	7		4			11 animais
		M1	Mio	PBS	NM	Sacrifício	
Total		35 (4*)	1	19	7	62 animais	

(*) número dos animais mortos durante o experimento (animais imunizados com M1ABC pela via i.p). Mio – miosina cardíaca, *B.p.* Bordetella pertussis.

4.4. Análise da Resposta Imune Humoral

O soro dos animais imunizados com a proteína recombinante M1ABC, bem como dos animais controles não manipulados e de animais imunizados com PBS, foi inicialmente testado contra antígenos obtidos de extratos da cepa M1 do *S. pyogenes*. Os resultados mostraram a presença de anticorpos capazes de reconhecer a proteína M1 completa selvagem, isto é, o extrato do *S. pyogenes* cepa M1 (Figura 14). Os soros dos animais imunizados reconheceram proteínas caracterizadas por reação de “Immunoblotting” com peso molecular de aproximadamente 55kDa, correspondentes a proteína M1 nativa, bem como bandas menores, provavelmente, subprodutos da

Figura 14. Reconhecimento específico da proteína M1 nativa de *S. pyogenes* pelo soro de animais imunizados com a proteína M1ABC recombinante Os extratos de *S. pyogenes* foram separados em um gel de SDS-Poliacrilamida a 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. Fitas com as proteínas separadas foram cortadas e provadas contra o soro de ratos Lewis não manipulados (**Faixa 1**), ratos Lewis imunizados com PBS (**Faixa 2**) ou imunizados com proteína M1ABC (**Faixas 3-5**).

Os títulos dos anticorpos anti-M1ABC produzidos pelos ratos imunizados com a proteína recombinante M1ABC foram avaliados pelo ensaio de ELISA e comparados

a um soro de rato Lewis imunizados com ovalbumina, uma proteína sabidamente imunogênica. Os resultados mostram que os soros dos ratos imunizados com M1ABC apresentavam altos títulos de anticorpos anti-M1ABC (1: 12800), comparável aos títulos obtidos com o soro do animal contendo anticorpos anti-ovalbumina (Figura 15).

Figura 15. Titulação de anticorpos específicos contra a proteína M1ABC e comparação aos títulos anti-ovalbumina As placas de ELISA foram recobertas com 1µg de cada antígeno: M1ABC ou ovalbumina, e os soros de animais não manipulados (NM), imunizado com ovalbumina (OVA) ou o soro de 3 animais imunizado com M1ABC (Lew1 a Lew4) foram aplicados em várias diluições seriadas, iniciando em 1:100.

Avaliamos também a resposta humoral dos soros dos animais frente a concentrações equimolares das proteínas M1ABC, M1AB e M1C, para verificar se a resposta humoral era mais intensa em algum segmento da proteína. Foi também incluído soro de um animal imunizado com miosina. As respostas humorais às proteína M1ABC, M1AB ou M1C foram significativamente maiores que ao PBS ($p < 0,03$), mas comparáveis entre si nos títulos de 1: 3200 (Figura 16), sem reconhecimento focado em qualquer segmento analisado. Nota-se, entretanto, que o animal imunizado com miosina apresentou títulos de anticorpos mais baixos (1:800) (Figura 16) em relação aos títulos observados nos soros dos animais imunizados com M1ABC. Não houve evidências de reatividade cruzada entre os anticorpos dirigidos contra a proteína M1ABC, M1AB, M1C e miosina.

Figura 16. Comparação das respostas humorais às proteínas recombinantes M1ABC, M1AB e M1C e miosina Os soros foram testados em diluição seriada a partir de 1:100 e cada diluição foi testada contra 1 μ M da proteína rM1ABC (A), rM1AB (B), rM1C (C) ou miosina (D). **Vermelho**, média das D.O. dos anticorpos dos 11 animais imunizados com M1ABC; **Azul** - anticorpo de 1 animal imunizado com miosina; **Preto**- média das D.O. de anticorpos de 2 animais imunizados com PBS, testados contra as proteínas rM1ABC (A), rM1AB (B), rM1C (C) ou miosina (D).

4.5. Resposta Celular

A resposta celular frente à proteína M1ABC foi avaliada em ensaios de proliferação usando células mononucleares derivadas dos linfonodos drenantes do sítio de injeção, e dos baços removidos dos animais no dia do sacrifício. Todas as proteínas empregadas em ensaios de proliferação foram dosadas para LPS, e apresentavam menos que 25 Unidades Endotóxicas por mL. As proteínas foram sempre testadas em três diferentes concentrações, 0.05 μ M, 0.25 μ M e 1 μ M. Os resultados mostram resposta proliferativa específica contra a proteína M1ABC e contra os fragmentos M1AB e M1C, pelos linfócitos extraídos dos linfonodos inguinais e do baço dos 11 animais imunizados com estas proteínas (Figura 17).

Em células obtidas dos linfonodos dos animais imunizados com a proteína M1ABC, houve indução de resposta proliferativa na concentração de $1\mu\text{M}$, com índice de estimulação (I.E.) médio superior a 5,0, significativamente maior que a resposta dos animais imunizados com PBS (I.E. médio $< 2,0$), ($p = 0,029$). Tanto a região AB (M1AB) como a região C-terminal da proteína M1 (M1C) induziram resposta proliferativa quando comparadas com os animais imunizados com PBS ($p = 0,03$, para ambos os fragmentos) (Figura 17).

Em contrapartida, a resposta obtida por células esplênicas dos ratos tratados com a proteína M1 foi dirigida contra a região C-terminal da proteína M1 (M1C), nas concentrações de $1\mu\text{M}$ e $0,25\mu\text{M}$ (Figura 18). A média dos índices de estimulação (I.E. = 4,6 a $1\mu\text{M}$) foi menor do que os obtidos com células derivadas de linfonodos (I.E. = 6,3). A resposta contra M1ABC foi marginal (I.E. = 2,0). A análise da resposta individual mostrou que 6 animais responderam com I.E. maior que 2,0, e um dos animais com I.E. = 3,8 (a $0,25\mu\text{M}$). Não foi observada resposta proliferativa significativa (I.E. >2), contra o fragmento M1AB.

Em resumo, a concentração de $1\mu\text{M}$ das proteínas (M1ABC, M1AB e M1C) induziu a melhor resposta proliferativa para células dos linfonodos e baço, exceto para células do baço de animais imunizados com M1ABC, onde $0,25\mu\text{M}$ desta proteína induziu melhor resposta.

Não observamos reação cruzada com a miosina cardíaca uma vez que as células dos linfonodos e esplênicas dos animais imunizados com a proteína M1ABC não apresentaram resposta proliferativa contra a miosina cardíaca. Na verdade, houve um efeito inibitório da proliferação celular frente à miosina (I.E. médio = 0.5). Por outro lado, também observamos que as células mononucleares do animal imunizado com a miosina cardíaca não apresentaram resposta proliferativa contra nenhum dos antígenos utilizados (Figuras 17 e 18). Como esperado, as células mononucleares dos animais imunizados com PBS não responderam a quaisquer dos antígenos testados. (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Ensaio de proliferação para avaliação da resposta imune celular (linfonodos) Índice de estimulação (I.E.)-média das triplicatas (cpm), dividido pela média da triplicata do controle negativo. Positivos - I.E. $\geq 2,0$. Células de linfonodos (N= 11 animais) obtidas pós imunização com proteína M1 (vermelho), miosina (azul) (N= 1 animais) e PBS (cinza) (N= 2 animais) e testados com proteína M1 total (M1ABC), região amino-terminal (M1AB), região C-terminal M1 (M1C) e miosina nas concentrações de 1,0; 0,25 e 0,05 μM . * valores de p

Figura 18. Ensaio de proliferação para avaliação da resposta imune celular (baço) Índice de estimulação (I.E.)-média das triplicatas (cpm), dividido pela média da triplicata do controle negativo. Positivos - I.E. $\geq 2,0$. Células esplênicas obtidas pós imunização com proteína M1 (vermelho), miosina (azul) e PBS (cinza) e testados com proteína M1 total (M1ABC), região amino-terminal (M1AB), região C-terminal M1 (M1C) e miosina nas concentrações de 1,0; 0,25 e 0,05 μM .

4.6. Análise Histopatológica

Os cortes histológicos dos corações de todos os animais sacrificados foram analisados por três anátomo-patologistas experimentados.

Inicialmente, dois anátomo-patologistas analisaram os fragmentos de tecido cardíaco dos experimentos com animais sacrificados em 21 dias (E1, E2, E7 e E13), usando os critérios histopatológicos descritos em material e métodos, item 5. Por razões inerentes a nossa vontade, necessário se fez que as análises histopatológicas subseqüentes fossem realizadas por um terceiro anátomo-patologista. Este terceiro patologista adotou novos critérios histopatológicos (material e métodos, item 5), com os quais re-analisou os experimentos E7 e E13 (imunização s.c., sacrifício com 21 dias), e analisou o experimento E14 (imunização s.c. sacrifício em 41 dias).

O exame das lâminas teciduais pelos dois primeiros patologistas buscou graduar alterações, em miocárdio, valvas e endocárdio, avaliando a infiltração linfocitária e presença de nódulos de Aschoff. As alterações presentes em cada um destes tecidos foram graduadas em cruzes (+, ++ ou +++) conforme descrito em material e métodos.

Animais imunizados pela via intraperitoneal (i.p.)

Vinte e nove animais foram usados entre controles não imunizados e animais imunizados pela via i.p e sacrificados após 21 dias (experimentos E1 e E2). No experimento E1 (n = 5), incluindo 1 animal “não manipulado” (NM), dentre os quatro ratos imunizados com a proteína M1ABC, Tabela II, apenas três animais sobreviveram. Destes, dois apresentaram foco inflamatório em miocárdio, sugestivo de miocardite. Um dos ratos (E1L4), também apresentou alteração similar a verrugas em tecido valvular.

O experimento E2 (n = 24), constitui-se de 10 animais imunizados com M1ABC, dos quais 3 morreram no decorrer do experimento, 10 imunizados com PBS e 4 animais NM (Tabela II). As análises deste experimento não mostraram alterações histopatológicas no miocárdio e a análise do tecido valvular deste lote de experimentos foi prejudicada devido a problemas com a padronização dos cortes, pois os fragmentos não eram uniformes.

Animais imunizados pela via subcutânea (s.c.)

Inicialmente, em um grupo de 12 animais, sete foram imunizados com a proteína M1 em adjuvantes pela via s.c., três animais foram imunizados com PBS, e 2 animais foram mantidos não manipulados (experimento 7) (Tabela II). Observou-se infiltrado inflamatório discreto no miocárdio dos três ratos E7L5, E7L7 e E7L11 (Tabela III). Verrugas e alterações fibrinóides de colágeno foram observadas no rato E7L9 (Tabela III e Figura 19 A e B), bem como células grandes similares a nódulos de Aschoff. O rato E7L10 apresentou aglomerado de células com núcleo em forma de lagarta, similares às células de Anitschikow (Tabela III e Figura 19 C). Células aglomeradas, sugestivas de nódulos de Aschoff, foram também observadas em miocárdio dos ratos E7L7 (Tabela III e Figura 19 D), E7L8 e E7L11 e em válvula no rato E7L9 (Tabela III), alcançando a porcentagem de 71,4% (5/7) no grupo de animais imunizados com a M1ABC. Hipertrofia de fibras miocárdicas foi encontrada em tecido cardíaco de 3 ratos (E7L5, E7L6, E7L10) (Tabela III). Nos grupos controles, (PBS e NM), também foi observado a presença de infiltrado inflamatório discreto (E7L2, E7L4, E7L1). Tumefação endotelial foi observada em todos os grupos.

Tabela III - Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E7, pelos critérios dos dois primeiros patologistas

Animal	Miocárdio	Hipertrofia Fibras do miocárdio	Valva	Nódulo de Aschoff
E7L5	Inf.+	++	Tumef endot+	
E7L6		+		
E7L7	Inf+		Tumef endot+	NA*mioc
E7L8	NA*		Tumef endot+	NA*mioc
E7L9			Inf focal+/hipertrof+	NA*valva
E7L10		++	Inf+	CA*/NA*precoce mioc
E7L11	Inf+		Tumef endot+	NA*mioc
E7L2	Inf focal+			
E7L3	Necrose isq			
E7L4	Inf+		Tumef endot+	
E7L1	Inf+		Tumef endot+	
E7L12		++	Tumef endot+	

E7L5 a E7L11- ratos imunizados com proteína M1ABC; E7L2 a E7L4 ratos imunizados com PBS; E7L1 e E7L12- animais NM. NA* - células sugestivas de Nódulo de Aschoff; end - endotelial; inf - infiltrado inflamatório; CA-similar à “célula de Anitschikow”; +- discreto; ++ -moderado; ?-duvidoso

Figura 19. Histologia de válvula mitral de ratos Lewis imunizados com proteína M1 A figura A (200 X) mostra uma válvula com lesão que lembra verrugas valvares. A Figura B (200 X) mostra um infiltrado inflamatório em válvula. A figura C (400 X) mostra uma lesão onde se vêem células com núcleo em lagarta, lembrando a descrição da célula de Anitschikow. A figura D (200 X) mostra uma lesão com semelhança com o nódulo de Aschoff. (Figura A e B, animal E7L9; figura C, animal E7L10; figura D, animal E7L7)

No experimento E13, doze animais foram imunizados com a proteína M1ABC, 1 animal foi imunizado com miosina e dois com PBS, sempre pela via subcutânea (Tabela IV), totalizando 15 animais neste experimento.

A análise do experimento E13, feita pelos dois primeiros patologistas revelou em alguns dos animais imunizados com a proteína M1ABC, lesões similares a nódulos de Aschoff no miocárdio (animais E13L2 e E13L4), enquanto os animais E13L3, e E13L6 apresentaram células sugestivas de nódulos de Aschoff na válvula, totalizando assim 36,4% (4/11) de corações apresentando estas lesões, no grupo imunizado com a proteína. Também foi observada infiltração linfocitária, na maioria dos casos discreta (+). O animal E13-L3 apresentou infiltração por células mononucleares no miocárdio e no pericárdio (dados não mostrados). Salientamos,

no entanto que infiltração inflamatória discreta em miocárdio ou tecido valvular também foi observada nos animais imunizados com PBS (Tabela IV).

Tabela IV - Avaliação histológica de animais sacrificados com 21 dias, experimento E13 após imunização via subcutânea, segundo critério histológico inicial

Miocárdio				Endocárdio			
				Valvar		Cavidades	
Animal	Inf Focal e Necrose Miocardite		Aschoff	Aschoff	Infiltr. Infl	Aschoff	Infiltr
E13L1	Infiltr Infl+	-	-	-	+	-	a+
E13L2	Mioc+	Colag+	+?	-	+	+	-
E13L3	-	-	-	+	+	+	+
E13L4	Infiltr Infl+	-	+	-	+	-	+
E13L5	Infiltr Infl+	-	-	-	+(M)	-	-
E13L6	Infiltr Infl+	-	-	+?(M)	+(M)	-	+
E13L7	Infiltr Infl+	-	-	-	-	-	-
E13L9	Infiltr Infl+	-	-	-	+(M/A)	-	-
E13L10	Mioc++	-	-	-	+(M/?)	Exud?	++
E13L11	Infiltr Infl+	-	-	-	+(M)	-	-
E13L15	Infiltr Infl+	-	-	-	+/-	-	-
E13L12	Mioc+	-	-	-	+(M)	-	+
E13L14	Infiltr Infl+	-	- b	-	+(M/T)	-	-
E13L13	Infiltr Infl+++		?	-		?	+++

E13L1 a E13L1 e E13L15, animais imunizados com proteína M1ABC; E13L12 e E13L14, imunizados com PBS e E13-L13, imunizado com miosina e adjuvantes, Infiltr.Linf - infiltração linfocitária, Mioc. - miocardite, Exudat - lesão em fase exudativa, coagul. - necrose de coagulação, colage - colágeno, M - válvula mitral, T - válvula tricúspide, A - válvula aórtica. Adjuvantes: uso combinado de adjuvante completo e incompleto de Freund (ACF e AIF) e *B. pertussis* inativada. a⁺: células com algumas características de nódulos de Aschoff. b: nódulo de células mononucleares. - negativo; + discreto; ++ moderado; +++ intenso, ? duvidoso

Analisando conjuntamente os experimentos E7 e E13 quanto a presença das formações sugestivas de nódulos de Aschoff, notamos que 50 % (9 em 18) dos animais tratados com a proteína M1ABC apresentaram esta alteração (Tabelas III e IV).

Como mencionado anteriormente, houve necessidade de troca do patologista e o terceiro anátomo-patologista estabeleceu um sistema de pontuação, criado após análise inicial preliminar de algumas lâminas de animais imunizados e controles, que se pautou em 5 critérios histológicos, exemplificados nas Figuras 20 a 23, para cada animal, como segue: 1-medida do espessamento da válvula, avaliada em microscópio

Zeiss com um programa próprio (Axio Vision 3.0) (Figura 20), 2-presença de infiltrado inflamatório em válvulas (Figura 21), 3-contagem do número de células grandes multinucleadas (Figura 22), 4-infiltração em miocárdio septal (Figura 23) e 5-outras alterações no restante do corte.

Figura 20. Avaliação das válvulas: medida da espessura e avaliação do infiltrado inflamatório A - Corte histológico de valva mitral E14L8 sem alterações histopatológicas significativas. Coloração pela hematoxilina e eosina; aumento de 400 X. B - Corte histológico de valva mitral com espessamento E14L6. Coloração pela hematoxilina e eosina; aumento de 400 X

Figura 21. Avaliação da inflamação valvar Corte histológico de valva mitral rato E14L6 com infiltrado inflamatório composto por células mononucleares, algumas das quais estão indicadas por setas. Coloração pela hematoxilina e eosina; aumento de 400 X

Figura 22. Inflamação miocárdica Corte histológico de miocárdio com infiltrado inflamatório composto por células mononucleares, algumas das quais estão indicadas por setas, animal E14L8. Coloração pela hematoxilina e eosina; aumento de 400X

Figura 23. Presença de células grandes mononucleares. Grandes células mononucleares infiltrando o miocárdio (setas), animal E14L7. Coloração pela hematoxilina e eosina; aumento de 400X.

Com base nos critérios acima mencionados, os cortes histológicos dos corações dos animais sacrificados dos experimentos E7, E13 foram reavaliados pelo terceiro patologista, para posterior comparação com o experimento E14 (sacrifício após 41 dias). As lâminas dos experimentos E7 e E13 foram examinadas, sem conhecimento prévio das análises anteriores ou sem informações sobre os animais.

De acordo, com o novo critério, os resultados mostraram infiltração por células mononucleares de intensidade moderada no miocárdio do septo interventricular nos animais imunizados com a proteína M1ABC (E7L6, E7L8 e E7L11) e nos controles com PBS (E7L4) e não manipulado (E7L12). Intensidade elevada de infiltração foi observada para o rato E7L5. Os demais animais apresentaram discreta infiltração (E7L7, E7L9, E7L10) incluindo os controles (E7L2 e E7L3) imunizados com PBS e E7L1 (NM) (Tabela V). Observou-se intenso infiltrado por células mononucleares no tecido valvular do rato E7L11 e de intensidade leve E7L5, E7L8, E7L9, E7L10 (Tabela V). Espessamento valvular foi observado com grau moderado para os ratos E7L9 e E7L1 (NM) intenso para o ratos E7L11 (Tabela V).

Tabela V - Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimentos E7 pelos critérios do terceiro patologista

	Espes.Valvas	Inf.Valva	Inf.Interst	Gds Cél/cpo	Outras Áreas
E7L5	+	+	+++	0	na
E7L6	na	na	++	0	na
E7L7	na	na	+	na	na
E7L8	na	+	++	0,67	na
E7L9	++	+	+	0,50	na
E7L10	+	+	+	0	na
E7L11	+++	+++	++	0	na
E7L2	na	na	+	0,40	na
E7L3	na	na		0	na
E7L4	na	na	+	1	na
E7L1	++	+	++	0,29	na
E7L12	+	+	+	0	na

E7L5 a E7L11, animais imunizados com M1ABC; E7L2 a E7L4, animais imunizados com PBS; rato E13L13. – negativo; + discreto; ++ moderado; +++ intenso; Espes.Valvar = espessamento valvar, Infiltr. = infiltração, Grds Cels Cpo = células grandes por campo de 100X.

Tabela VI - Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E13, pelos critérios do terceiro patologista.

	Espes.Valvas	Inf.Valva	Inf.Interst	Gds Cél/cpo	Outras Áreas
E13L1	+	-/+	++	1,20	+
E13L2	-	-	-/+	0	-
E13L3	+	-	+/++	2,43	++
E13L4	-	+	+/++	1,10	++
E13L5	+	+	+	1,63	+
E13L6	+	+	++/+++	1,13	++
E13L7	++	+	+	2,17	++
E13L9	-	-	++	0,90	+
E13L10	-/+	-/+	++/+++	1,30	++/+++
E13L11	+	+	++	1,00	+/++
E13L15	++	+	++	0,84	+
E13L12	+	+	+	3,8	+
E13L14	+	-/+	-	0,63	++
E13L13	++	+	++/+++	0,35	+++

E13L1 a E13L11 e E13L15, animais imunizados com M1ABC; E13-L11 e E13-L14, animais imunizados com PBS; E13L13, animal imunizado com miosina. – negativo; + discreto; ++ moderado; +++ intenso Espes.Valvar = espessamento valvar, Infiltr. = infiltração, Grds Cels Cpo = células grandes por campo de 100X.

O prolongamento do tempo do sacrifício para 41 dias não mostrou diferenças significativas nos padrões histológicos analisados quando comparado aos experimentos com sacrifício em 21 dias.

Os resultados do experimento E14 mostraram infiltração intersticial por células mononucleares de intensidade moderada no miocárdio do septo interventricular nos animais imunizados com a proteína M1ABC (E14L5, E14L8 e E14L14), e em um dos controles imunizados com PBS (E14L12). Os demais animais apresentaram discreta infiltração (E14L1, E14L2, E14L6) incluindo os controles (E14L11, E14L13 e E14L14) imunizados com PBS (Tabela VII). Observou-se intenso infiltrado por células mononucleares no tecido valvular do rato E14L6 e de intensidade leve E14L2 e E14L3 e nos controles E14L11, E14L13,

E14L14 (Tabela VII). Espessamento valvular foi observado com grau intenso para o rato E14L14 (PBS) e moderado para os ratos E14L13 e E14L2 (M1ABC) (Tabela V).

Tabela VII - Avaliação histológica do tecido cardíaco dos animais do experimento E14, pelos critérios do terceiro patologista.

	Espes.Valvas	Inf.Valva	Inf.Interst	Gds Cél/cpo	Outras Áreas
E14L1	na	na	na	na	na
E14L2	+/++	-/+	+	1,2	-/+
E14-L3	+	-/+	+	0,87	-/+
E14-L4	-/+	-	++	0,69	-/+
E14-L5	-	na	+/++	1,45	-/+
E14-L6	+	++	+	0,13	+/++
E14-L8	-	-	++	1,02	+/++
E14-L11	+	-/+	+	0,65	+
E14-L12	-	-	++	0,24	+
E14-L13	+/++	+	+	0,83	+
E14-L14	+++	+	+	0,93	+/++

E14L1 a E14L8, animais imunizados com M1; E14L11 a E14L14, animais imunizados com PBS. – negativo; + discreto; ++ moderado; +++ intenso; Espes.Valvar = espessamento valvar, Infiltr. = infiltração, Grds Cels Cpo = células grandes por campo de 100X

A análise histológica dos três experimentos, (E7, E13 e E14) pelo terceiro patologista, mostrou que os únicos parâmetros que apresentaram alguma diferença foram infiltração intersticial no miocárdio e a contagem média de células grandes por campo de 100X. Entretanto, este patologista não caracterizou a presença de nódulos de Aschoff, em nenhuma lâmina estudada.

4.7. Estabelecimento de linhagens derivadas de linfócitos infiltrantes do miocárdio, experimento E14.

Fragmentos de miocárdio de 6 ratos Lewis (E14L2, E14L3, E14L4, E14L5, E14L6, E14L8) removidos durante o sacrifício, foram fragmentados e colocados em cultura para avaliar a presença de linfócitos infiltrantes no miocárdio, em decorrência do estímulo antigênico, imunização com proteína M1ABC, conforme descrito em material e métodos. Avaliamos também a presença de linfoblastos em 4 ratos controles (E14L11, E14L12, E14L13, E14L14) após imunização com PBS contendo adjuvantes, para verificarmos se apenas os adjuvantes poderiam induzir algum estímulo.

Em apenas 2 dias de cultivo do miocárdio, na ausência de estímulo exógeno foi possível verificar o crescimento de linfócitos a partir de fragmentos do tecido somente em um rato (E14L4), imunizado com a proteína M1ABC, identificados pela presença de alguns linfoblastos (Tabela VIII e Figura 24). Os demais fragmentos (9) não apresentaram crescimento imediato. Após o primeiro estímulo com Con-A (dia 7), 7 das 9 biópsias sem crescimento inicial, passaram a apresentar alguns linfoblastos em expansão (Tabela VIII). Os linfoblastos obtidos a partir da biópsia do rato E14L4, já no segundo dia pós-cultivo sem estímulo exógeno (apenas em presença do próprio tecido cardíaco), ampliaram a sua expansão (Tabela VIII e Figura 25). Novo estímulo com proteína recombinante M1ABC, após 10 dias do estímulo com o mitógeno ConA induziu a proliferação de linfócitos infiltrantes do rato E14L8 e manteve o crescimento dos linfoblastos de vários ratos. No entanto, os linfoblastos obtidos após o estímulo com ConA dos ratos E14L12 e E14L13 (animais imunizados com PBS), não foram mantidos com o estímulo com a proteína M1ABC (Tabela VIII). Estas células ainda encontram-se em cultivo e deverão ser avaliadas futuramente em ensaio de proliferação celular, utilizando a proteína M1ABC.

Tabela VIII - Cultivo de linfócitos infiltrantes do miocárdio de ratos Lewis, após 41 dias da imunização (E14)

Rato Lewis	Linfoblastos sem estímulo exógeno	Linfoblastos pós-estímulo Concavalina A	Linfoblastos pós-estímulo M1 ABC
E14L2 (M1ABC)	-	+	+
E14L3 (M1ABC)	-	+	+
E14L4 (M1ABC)	2º dia +	+	+
E14L5 (M1ABC)	-	+	+
E14L6 (M1ABC)	-	+	+
E14L8 (M1ABC)	-	-	+
E14L11 (PBS)	-	+	+
E14L12 (PBS)	-	+	-
E14L13 (PBS)	-	+	-
E14L14 (PBS)	-	-	-

(-) ausência de crescimento; (+) presença de linfoblastos.

Figura 24. Cultura de linfócitos infiltrantes de tecido do miocárdio do rato E14L4 Setas - linfoblastos em crescimento. Aumento 200X.

Figura 25. Cultura de linfócitos infiltrantes de tecido cardíaco pós-estímulo com ConA A-fragmento tecido e células alimentadoras; ausência de linfoblastos. B-, ratos E14L14 (negativo) e E14L4 (positivo). Setas indicam linfoblastos em crescimento. Aumento 100X

Figura 26. Linfoblastos infiltrantes do tecido cardíaco, pós-estímulo com proteína M1ABC Rato E14L6. Setas indicam linfoblastos em crescimento. Aumento 400X

5. Discussão

No presente trabalho avaliamos o papel da proteína M na indução de lesões similares às observadas na febre reumática, utilizando o rato Lewis como modelo experimental. Caracterizamos as cepas de *S. pyogenes* mais prevalentes em nosso meio, para definir qual sorotipo utilizar no desenvolvimento de cardite reumática em ratos Lewis. É sabido que a prevalência dos genótipos/sorotipos das cepas de *S. pyogenes* varia de uma região para outra, e a incidência de febre reumática está diretamente ligada a esta variação. Este fato tornou extremamente importante a escolha de uma cepa local de maior incidência em processos infecciosos mediados por *S. pyogenes*.

A genotipagem das cepas de *S. pyogenes* isoladas de amostras clínicas, em sua grande maioria, provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP, obtidas de orofaringe (sem história de febre reumática), abscesso amigdaliano, material de secreções, aspirados, cateteres e outros (Tabela I e Figura 5) e definiu a cepa M1 como a mais prevalente dentre todas as amostras analisadas (Barros et al., 2006). Embora esta amostragem não inclua apenas material de orofaringe, é de certa maneira, representativa das cepas que circulam com maior frequência em nosso meio. Através desta amostragem pudemos concluir que a prevalência da cepa M1, observada em nosso meio, apresenta paralelo ao já descrito em outros países como EUA (Kaplan, et al 2001), Itália (Mencarelli et al, 2005), México (Espinosa et al., 2003), Canadá (Tyrrell et al, 2002) e Hong Kong (Ho et al., 2003), países estes que têm a cepa M1 como a mais prevalente.

O uso de proteína M recombinante como um imunógeno em um modelo animal para febre reumática, foi originalmente descrito pelo grupo de Cunningham, em 2001 (Quinn et al, 2001). No modelo original, os autores utilizaram a proteína M6 do *S.pyogenes*, cepa tipicamente reumatogênica, para induzir em ratas Lewis lesões anatomopatológicas descritas como características e patognomônicas da Febre Reumática, tais como nódulos de Aschoff e células de Anitschkow. Em nosso estudo, conforme mencionado acima, usamos como o imunógeno a proteína M1 do *S.pyogenes*, advinda de uma cepa de um sorotipo também classicamente definido como reumatogênico. As cepas de sorotipo M1 são frequentemente associadas com febre reumática, mas também com glomerulonefrite e doença invasiva (revisto em

Cunningham 2000; revisto em Bisno, 2003). Portanto, o uso da proteína M1 segue o mesmo princípio racional da escolha de M6, ou seja, a sua associação com a reumatogênese. Além disso, o fato da cepa M1 causar doença mais severa, poderia acarretar em maior chance de produzir vigorosa estimulação imunológica e doença auto-imune subsequente.

A dificuldade de reproduzir a FR em modelo experimental se deve ao fato de o homem ser o único reservatório do *S. pyogenes*. Os modelos animais desenvolvidos em coelhos, camundongos ou macacos (Murphy et al, 1949 e 1950; Cromartie et al, 1966; revisto em Unny e Middlebrooks, 1983) para estudar a FR utilizaram como imunógeno a própria bactéria ou extratos bacterianos, e apresentaram resultados marginais sem reproduzir a lesão igual a observada na FR/DRC. O trabalho descrito por Dos Reis et al, (1982) usando extratos bacterianos em camundongos, no entanto, mostrou o papel de macrófagos no tecido cardíaco e levantou a hipótese de que estas células tinham o papel de selecionar e apresentar antígenos bacterianos após seu processamento, além de realizar transferência passiva de linfócitos para animais, que assim desenvolviam a doença.

O uso de uma proteína recombinante como imunógeno bem definido para induzir doença autoimune (proteína M recombinante do *S. pyogenes*), apresenta alguns atrativos em relação aos modelos anteriormente descritos. Primeiro, afasta a possibilidade de contaminantes advindos de outras proteínas estruturais e outros componentes da célula bacteriana. Segundo pode permitir a comprovação definitiva do papel da proteína M em questão. Finalmente, facilita a dissecação de mecanismos envolvido na deflagração da doença. O uso de ratos Lewis isogênicos permite controlar vários aspectos experimentais, entre eles o polimorfismo genético, condições ambientais que apresentam grande variedade no ser humano.

O modelo desenvolvido neste trabalho utilizou grandes quantidades de proteína M recombinante para os diversos ensaios *in vivo* e *in vitro*, e foi, portanto, necessário estabelecer e otimizar o método de produção e purificação de grandes quantidades de proteína. Neste sentido, obtivemos um vetor (gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Lee Ho, Instituto Butantan), desenhado para facilitar a clonagem e expressão de grandes quantidades de proteína recombinante, graças ao alto número de cópias proporcionado pela sua origem de replicação e a um forte promotor para

expressão bacteriana. As proteínas recombinantes produzidas (M1ABC, M1AB e M1C) foram extensamente analisadas, e caracterizadas por suas propriedades bioquímicas, como peso molecular, e pela sua capacidade de ativar o sistema imune, através do desencadeamento das respostas humoral e celular dos animais imunizados, mostrando que apresentavam as propriedades da proteína nativa. Apresentaram, portanto, o tamanho compatível tanto por análise em géis SDS-PAGE como por espectrometria de massa (Figuras 10 e 11). O reconhecimento específico por anticorpos monoclonais dirigidos contra as 6 histidinas presente na extremidade amino da proteína recombinante M1ABC, permitiu confirmar o tamanho da proteína M1ABC expressa, bem como dos segmentos M1AB (amino-terminal) e M1C (C-terminal) que foram comparáveis com os tamanhos esperados ao peso predito pela sequência de aminoácidos (Figura 12B). Do mesmo modo, os soros policlonais de animais imunizados com a proteína M1ABC recombinante também reconheceram os fragmentos da proteína do mesmo tamanho que o reconhecido pelo anticorpo anti-histidina (Figuras 13).

O uso de proteínas recombinantes produzidas em bactérias, requer cuidados importantes. Devido a grande quantidade de lipopolissacarídeos presentes na parede bacteriana, as proteínas expressas em bactérias são altamente contaminadas com LPS. A contaminação por LPS pode induzir resposta proliferativa e fornecer resultados falso-positivos. Por isso, todas as proteínas recombinantes usadas em ensaios de linfoproliferação tiveram o LPS removido, e só foram liberadas para uso proteínas com quantidades inferiores a 25 UE/mL.

A imunização de ratos Lewis isogênicos com a proteína M1 de cepas de *S. pyogenes* reumatogênicas se mostrou efetiva, pois foi capaz de produzir uma reposta imune humoral eficiente e vigorosa, em todos os animais. Os animais imunizados apresentaram títulos de anticorpos significativos e tão altos quanto os obtidos com a imunização de ratos com ovalbumina (Figura 15), considerada um potente imunógeno (Westland, 1999). Os anticorpos produzidos pelos animais imunizados reconheceram especificamente a proteína M1 em sua forma nativa (Figura 14), evidenciado em ensaio de “Western blotting” com extratos das bactérias *S. pyogenes* cepa M1. A proteína M1 recombinante produzida foi igualmente reconhecida pelos anticorpos dos animais imunizados, evidenciado usando extratos de *E.coli*

expressando a proteína ou a proteína já purificada. Os soros dos animais reconheceram igualmente a proteína íntegra M1ABC, e os fragmentos M1AB, e o fragmento M1C, (Figura 16), sugerindo que a resposta humoral está dirigida a epitopos presentes ao longo da proteína ou, que os epitopos reconhecidos estão situados numa região comum aos dois segmentos da proteína (M1AB e M1C). Alternativamente, no decurso da evolução da resposta imune dos animais estudados e durante a maturação desta resposta imune, poderia ter havido um espalhamento dos epitopos reconhecidos. O mecanismo do espalhamento de epitopos (Sercarz et al, 1993 e Lehmann et al, 1992) é hoje bem estabelecido e preconiza que durante uma resposta imune, a reatividade é induzida a epitopos distintos dos epitopos que originaram a reação desencadeadora da doença. Na doença reumática cardíaca, o mecanismo do espalhamento de epitopos é gerado a partir do reconhecimento de antígenos do *S. pyogenes* e posteriormente gera o reconhecimento por anticorpos e linfócitos T de auto-antígenos, principalmente de algumas proteínas cardíacas (Guilherme et al, 1995). Além deste mecanismo, a flexibilidade do reconhecimento de antígenos, mesmo na ausência de seqüência de homologia, pelos linfócitos T contribui para a amplificação da resposta auto-imune (Faé et al, 2004).

A resposta proliferativa das células provenientes dos linfonodos contra a proteína M1 foi vigorosa, e dirigida contra a proteína inteira M1ABC), bem como às suas frações (M1AB e M1C), no entanto, foi mais acentuada frente ao segmento M1C (Figura 17). Curiosamente células esplênicas apresentaram resposta proliferativa primariamente dirigida contra a região carboxi-terminal (Figura 18). Esta região é conservada na maioria das cepas do *S. pyogenes* e apresenta na proteína M1 2 blocos de repetição de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos intercalados por dois blocos de 10 resíduos de aminoácidos idênticos, seguidos de um número variável de aminoácidos diversos (Harbaugh et al.,1993). O grupo de pesquisadores liderado por Good, descreveu a presença de valvulite em ratas Lewis imunizadas com um pool de peptídeos da região C-terminal da proteína M5 (Lymbury et al., 2003). Neste estudo, este grupo mostrou que a resposta proliferativa contra alguns peptídeos foi mais elevada quando comparada com a resposta observada contra o pool de peptídeos. Este resultado mostra que apesar da pequena variabilidade é possível identificar epitopos reconhecidos por linfócitos T e B nesta

região. Em nossos experimentos não avaliamos a reatividade contra epitopos das regiões N- terminal e C-terminal.

O mapeamento da resposta imune mediada por linfócitos T e B em camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA/Ca, imunizados com a proteína M5 definiu vários epitopos na região amino-terminal da proteína M5 (Robinson et al, 1991 e Cunningham et al 1997). A reatividade cruzada de anticorpos e células de linfonodos de camundongos BALB/c com a miosina cardíaca foi avaliada usando-se 23 peptídeos com sequências compartilhadas, derivados da proteína M5. Seis sítios de reação cruzada com a miosina foram definidos, resíduos M5(48-58), M5(59-76), M5(72-79), M5(137-154), M5(150-167) M5(163-180), denominados NT4, NT5, NT6, B1B2, B2 e B2B3A, respectivamente (Cunningham et al 1997). Vários clones de linfócitos T derivados de linfonodos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA/Ca, imunizados com a proteína M5, reconheceram preferencialmente o epitopo M5(1-35), no entanto, outros epitopos também foram reconhecidos M5(28-54), M5(55-70), M5(132-162) e M5 (300-319) por alguns clones de linfócitos T (Robinson et al, 1991). Interessantemente, as regiões imunodominantes NT4/5/6 , B1B2 e B2 descritas por Cunningham et al e a região M5(1-35) descrita por Robinson et al. (1991), foram reconhecidas por clones de linfócitos infiltrantes das lesões valvulares de pacientes com doença reumática cardíaca grave (Guilherme et al, 1995). Estas evidências sugerem que algumas seqüências de aminoácidos da proteína M que apresentam homologia com a miosina cardíaca podem quebrar a tolerância e promover a ativação de linfócitos T e causar reação inflamatória no coração tanto de animais como em humanos. Além disso, reforçam a relevância do uso de modelos animais, devido a similaridades com a resposta imune humana.

As reações auto-imunes observadas na febre reumática são mediadas por anticorpos e por linfócitos T, dirigidas a epitopos da porção N-terminal da proteína M e proteínas de vários tecidos humanos, principalmente proteínas cardíacas (revisado por Guilherme et al, 2005). Em modelo do rato Lewis, linhagens de células T derivadas de linfonodos de animais que desenvolveram valvulite, foram estabelecidas após estímulo *in vitro* com miosina cardíaca e IL2, seguida de novos estímulos com proteína M6 e miosina cardíaca. Estas células foram posteriormente testadas e foram reativas à proteína M6 recombinante e a miosina cardíaca (Quinn et

al, 2001), evidenciando reatividade cruzada. Na seqüência o mesmo grupo relatou a presença de reações cruzadas usando células dos animais imunizados com proteína M6 e definiu sítios da miosina cardíaca com reatividade cruzada (Galvin et al, 2002). Em nossos experimentos, a avaliação da reatividade cruzada entre a proteína M1 e a miosina cardíaca foi analisada em células de baço e de linfonodos retiradas após o sacrifício, sem estímulo *in vitro* prévio, bem como em soro dos animais imunizados. Não observamos resposta cruzada entre as proteínas M1ABC, M1AB ou M1C e a miosina. O fato de não termos observado reatividade cruzada pode ser explicado pela baixa freqüência de células auto-reativas não detectadas em uma população policlonal não estimulada *in vitro*, ou esta diferença se deve a uma propriedade intrínseca da proteína M escolhida, no caso a M1. Em concordância com estes resultados, soro e células de um rato imunizado com a miosina cardíaca (E13L13) não foram capazes de reconhecer a proteína recombinante M1ABC, nem os fragmentos M1AB e M1C (Figuras 16, 17 e 18).

Apesar de não detectarmos reatividade cruzada entre a proteína M1 e a miosina cardíaca por anticorpos ou linfócitos T, as análises histológicas de miocárdio e tecido valvular de 18 ratos mostraram que 09 ratos (50 %) avaliados para a presença de células similares a nódulos de Aschoff e células de Anitschkow, apresentavam estas células principalmente no miocárdio, experimentos E7 e E13 (Tabelas III e IV), respectivamente. Estes resultados são compatíveis com os descritos pelo grupo de pesquisadores liderado por Cunningham (Quinn et al, 2001; Galvin et al, 2002). Entretanto, no modelo proposto pelo grupo de Cunningham a presença de nódulos de Aschoff não foi quantificada (Quinn et al, 2001). O grupo australiano, liderado por Good, também não demonstrou a presença de lesões patognomônicas de FR em ratas Lewis imunizadas com peptídeos da proteína M5, com segmentos amino-terminais PepM1 ou PepM5 (Lymbury et al., 2003), embora não tenha descrito miocardite e valvulite em animais imunizados com este pool de peptídeos da região C-terminal (carboxi-terminal) da proteína M5.

O fato de apenas 50% dos animais desenvolverem lesões similares aos nódulos de Aschoff observados em humanos portadores de doença reumática cardíaca aguda (sinal patognomônico da FR) mostra a variabilidade da resposta dos ratos Lewis, a despeito de estes animais serem isogênicos. Várias explicações

possíveis cabem para este fato. A identificação do nódulo de Aschoff ainda se baseia tão somente na morfologia. A sua natureza bioquímica e celular ainda é objeto de controvérsias (Stehbens e Zuccollo, 1999), portanto, não há ainda marcadores específicos para facilitar a sua identificação. Em estudo realizado na Índia em 1995, mostrou-se que a frequência do achado de nódulos de Aschoff foi bem menor que os critérios clínicos poderiam fazer supor (Chaturvedi, 1995). Aliado a isso, alguns trabalhos tem sugerido que a célula de Anitschkow, outrora considerada única da FR, é na verdade bem mais frequente do que se imaginava, estando presente no interstício de corações de adultos sem doenças auto-imunes e, que cardiomiócitos fetais frequentemente apresentem configurações nucleares tipo Anitschkow. Não são observadas, entretanto fora do coração (Satoh e Tsutsumi, 1999). A célula de Anitschkow parece na verdade representar uma célula em estado reativo, e provavelmente imatura (Stehbens e Zuccollo, 1999). Em camundongos, verificou-se a presença de grande número de células de Anitschkow em estado reacional a estímulo por citocinas como Fator de Crescimento de Plaquetas-C (PDGF-C do inglês) junto com a dilatação hipertrófica e fibrose cardíaca (Ponten et al., 2003).

Foi extensivamente sugerido (Unny e Middlebrooks, 1983), que um modelo animal adequado para FR, deve obrigatoriamente produzir lesões histológicas com presença de nódulos de Aschoff e células de Anitschkow. Entretanto, devido a dificuldade de seu reconhecimento e caracterização, até mesmo por patologistas experimentados, um novo critério deve, portanto, ser buscado no sentido de se validar um modelo animal para FR, ou o nódulo de Aschoff deverá ser melhor compreendido para que sua caracterização possa ser feita não apenas com base em sua morfologia, mas em parâmetros mais objetivos.

Além dos nódulos de Aschoff avaliamos a presença de infiltrado inflamatório nos diversos cortes histológicos e a maioria dos animais apresentou infiltração de intensidade variável (discreta a intensa) [Tabela III (E7), Tabela IV (E13), Tabela V (E7), Tabela VI (E13) e Tabela VII (E14)], mostrando que a imunização com a proteína M1 foi capaz de induzir reação inflamatória de grau variável em vários animais.

O rato E13L13 imunizado com a miosina cardíaca apresentou infiltração do miocárdio em área superior a 30% dos cortes analisados e uma intensa pericardite foi

evidenciada no dia do sacrifício, inclusive com volume considerável de exudato. Estes achados são compatíveis com modelos descritos de miocardite induzida por injeção com miosina (revisto por Cunningham, 2000). Em modelos de camundongos (A/J e BALB/c) considerados susceptíveis para indução de miocardite auto-imune (EAM) (McManus et al, 1993) a imunização com miosina cardíaca induz infiltrado celular no coração composto principalmente por linfócitos T e macrófagos (Smith et al, 1991). A miosina cardíaca é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. A proteólise da miosina identificou três subfragmentos denominados de S1 (cabeça globular), S2 (região alfa hélice) e LMM (do inglês light meromyosin) corpo principal da miosina (Tobacman et al, 1984). Em ratos Lewis, a região S2 induziu miocardite grave e o epitopo identificado como potente indutor da miocardite foi o segmento S2(1052-1076) sendo que os resíduos S2(1052- 1073) são idênticos à uma região da miosina cardíaca humana. O segmento S2(1052- 1073) da miosina, entretanto não induziu resposta imune proliferativa ou reatividade de anticorpo nos ratos Lewis imunizados com a miosina e foi considerado como epitopo críptico (Li et al, 2004).

Os animais do lote experimental E14 tiveram o sacrifício prolongado para 41 dias com a finalidade de verificarmos se as lesões observadas nos animais sacrificados com 21 dias, poderiam ser acentuadas, uma vez que em humanos as lesões valvulares são progressivas e permanentes. Conforme mencionado acima, não houve diferenças na intensidade de infiltração celular.

Dentre os animais imunizados com a proteína M1ABC do lote experimental E14, diferentemente dos outros lotes de animais foi possível estabelecer linhagens de linfócitos diretamente do tecido cardíaco em 6 dos 10 fragmentos de tecido cultivados em presença de proteína M1 recombinante (Tabela VIII). Pudemos observar entre os linfoblastos em crescimento, que os do animal E14L4 (Figura 24 e Figura 25B) teve o crescimento mais precoce entre todos cultivados, já no segundo dia, e que os linfoblastos do animal E14L8 apesar de não proliferar com mitógenos (ConA), apresentou expansão proliferativa em resposta a proteína M1ABC, revelando a presença de células reconhecendo especificamente a proteína M1. Estes dois animais por outro lado, são aqueles que apresentaram escore mais elevado de infiltração intersticial (miocárdio). Esta reatividade demonstra que as células

isoladas diretamente do miocárdio são auto-reativas e que foram provavelmente induzidas pela imunização.

Por outro lado, um animal controle E14L11 (imunizado com PBS), apresentou proliferação, mas esta ocorreu tanto em resposta a ConA como após M1ABC, mostrando a falta de especificidade desta proliferação, ou uma resposta auto-reativa induzida pelos adjuvantes (*Mycobacterium tuberculosis* presente no Adjuvante Completo de Freund e *B. pertussis*), ainda que o trabalho de Quinn *et al.*, não tenha estas alterações. Este resultado sugere que o uso de adjuvantes composto por *M. tuberculosis* e *B. pertussis* inativadas também pode induzir células auto-reativas.

A obtenção das linhagens intralesionais obtidas do miocárdio de alguns ratos após a imunização com a proteína M1 nos permitirá a geração de clones de linfócitos T intralesionais para a identificação dos epitopos das regiões N e C-terminal da proteína M de reação cruzada com miosina cardíaca e com outras proteínas do tecido cardíaco. Esta abordagem será complementar aos estudos já realizados com clones de linfócitos infiltrantes das lesões cardíacas de pacientes com DRC grave e poderá estabelecer um paralelo entre o mecanismo da patogênese da FR/DRC em humanos e em modelo experimental.

O desenvolvimento do modelo experimental é fundamental para a escolha de epitopos da proteína M com capacidade de proteção contra a doença e que não desencadeiem miocardite e/ou valvulite.

Ensaio de vacinas vêm sendo desenvolvidos por alguns grupos nos Estados Unidos e na Austrália, Alemanha e pelo nosso grupo, com abordagens diversas. Um grande desafio é testar a vacina em um modelo experimental. O modelo do rato Lewis é até o momento o que apresenta maior semelhança com a doença humana e certamente será importante para a avaliação do potencial de proteção e de segurança em modelos de vacinas contra o *S. pyogenes*.

6. Conclusão

- Nossos resultados mostraram que o uso do rato Lewis como um modelo experimental para febre reumática pode trazer importante conhecimento sobre a imunopatologia da doença.
- Conseguimos mostrar em 50% dos animais imunizados com a proteína M1, lesões similares às lesões características dos nódulos de Aschoff e grande parte dos animais apresentava algum grau de infiltração do miocárdio.
- Os linfócitos e anticorpos dos animais imunizados com a proteína M1 reconheceram especificamente a proteína imunizante e seus fragmentos amino (M1AB) e carboxi (M1C) terminais. Embora não tenhamos observado reação cruzada com a miosina, apenas linfócitos do baço e dos linfonodos foram testados e provavelmente o baixo número de células auto reativas não permitiu a detecção de reatividade cruzada.
- Estabelecemos o cultivo de linfócitos infiltrantes do miocárdio dos animais imunizados, para o uso futuro destas células que poderá esclarecer se a ausência de reação cruzada com miosina se deveu a uma baixa frequência de precursores.

7. Referencias Bibliográficas:

Aida Y, Pabst MJ. Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor- α . *J Immunol*. 1990;145(9):3017-25.

Anitschkow, N. Experimentelle Untersuchungen über die Neubildung des Granulationsgewebes Im Herzmuskel. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol*. 1912-1913;55:373-415.

Anastasiou-Nana MI, Anderson JL, Carlquist JF, Nanas JN. HLA-DR typing and lymphocyte subset evaluation in rheumatic heart disease: a search for immune response factors. *Am Heart J*. 1986;112(5):992-7.

Anspach FB. Endotoxin removal by affinity sorbents. *J Biochem Biophys Methods*. 2001 Oct 30;49(1-3):665-81.

Ashbaough CD, Moser TJ, Shearer MH, White GL, Kenedy RC, Wess MR. Bacterial determinants of Persistent throat colonization and infection and the associated immune response is a primate model of human grown streptococcal infection. *Cell Microbiol*. 2000;2(4):283-292.

Aschoff, L. Zur miocartitisfrage. *Verh Dtsc Ges Pathol*. 1904-1905;8:46-53.

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.

Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penningeret JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999;283:1335-1339.

Barros SF, Alenca R, Higa F, Alcantara F, Rossi F, Muller R, Fae KC, Kalil J, Guilherme L. Identification of group A beta hemolytic streptococcus strains in Brazil. Intern Congress Series. 2006;1289:34-7.

Beachey EH, Stollerman GH, Johnson RH, Ofek I, Bisno AL. Human immune response to immunization with a structurally defined polypeptide fragment of streptococcal M protein. J Exp Med. 1979;150:862-877.

Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence of two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. J Exp Med. 1989;169(1):269-83

Bessen D, Fischetti VA. Synthetic peptide vaccine against mucosal colonization by group A streptococci. J Immunol. 1990;145(4):1251-1256.

Bessen DE, Carapetis JR, Beall B, Katz R, Hibble M, Currie BJ, Collingridge T, Izzo MW, Scaramuzzino DA, Sriprakash KS. Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat J Infect Dis. 2000;182:1109-16.

Bisno AL, Craven DE, McCabe W.R. M proteins of group G streptococci isolated from bacteremic human infection. Infect Immun. 1987;55:753-757.

Bisno AL. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. N Engl J Med. 1991;325(11):783-93.

Bisno AL. Acute pharyngitis. N.Engl J.Med. 2001;244(3):205-211.

Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. Lancet Infect Dis. 2003;3(4):191-200.

Borges F, Barbosa MLA, Borges RB, Pinheiro OC, Cardoso C, Bastos C, Aras R. Clinical and demographic characteristics of 99 episodes of rheumatic fever in Acre, the Brazilian Amazon. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005;84(2):111-114.

Brandt ER, Teh T, Relf W, Hobb RI, Good M. Protective and non protective epitopes from amino termini of M proteins from australian aboriginal isolates and reference strains of group A streptococci. *Infect Immun*. 2000;68(12):6587-6594.

Brandt ER, Sriprakash KS, Hobb RI, Hayman WA, Zeng W, Batzloff MR, Jackson DC, Good MF. New multi-determinant strategy for group A streptococcal vaccine designed for the Australian Aboriginal population. *Nat Med*. 2000;6(4):455-9.

Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005a;5(11):685-94.

Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet*. 2005b;366(9480):155-68.

Cavelti PA. Autoantibodies in rheumatic fever. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1945;60:379-381.

Centers for Disease Control. Acute rheumatic fever-Utah. 1987;MMWR 36:108.

Chaturvedi S, Agarwal PK, Srivastava AK. Histopathology of auricular appendages in rheumatic heart disease. *J Indian Med Assoc*. 1995;93(8):305-6, 317.

Chen SC, Donahoe JL, Fagan LF. Rheumatic fever in children. A follow-up study with emphasis on cardiac sequelae. *Jpn Heart J*. 1981;22(2):167-72.

Church AJ, Cardoso F, Dale RC, Lees AJ, Thompson EJ, Giovannoni G. Anti-basal ganglia antibodies in acute and persistent Sydenham's chorea. *Neurology*. 2002;59(2):227-31.

Collis WRF. Acute rheumatism and hemolytic streptococci. *Lancet*. 1931;1:1341-1345.

Coburn AF. *The Factor of Infection in Rheumatic State*. Baltimore, Md: Williams and Wilkins;1931.

Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med*. 2002;34(2):77-87.

Cunningham MW, Antone SM, Smart M, Liu R, Kosanke S. Molecular analysis of human cardiac myosin-cross-reactive B- and T-Cell epitopes of the group A streptococcal M5 protein. *Infect. Immunity*. 1997;65(9):3913-3923.

Cunningham M. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(3):470-511.

Cromartie, WJ, Craddock JG. Rheumatic-like Cardiac Lesions in Mice. *Science*. 1966;154:285-287.

da Silva CH. Rheumatic fever: a multicenter study in the state of São Paulo. Pediatric Committee-Sao Paulo Pediatric Rheumatology Society. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1999;54(3):85

Da Silva SF, Soares RPF, Santos LS, Maciel A, Aca IS, Lopes ACS, Andrade GP. Análise comparativa da prevalência de streptococcus pyogenes em secreção de orofaringe de escolares da zona urbana e rural do estado de Pernambuco. *Newlab* 2005;73:130-8.

Decourt, LV. *Doença Reumática*. 2ª ed São Paulo: Sarvier;1972.

Degnan B, Taylor J, Hawkes C, O'Shea U, Smith J, Robinson, JH, Kehoe MA, Boylston A, Goodacre JA. Streptococcus pyogenes Type M5 protein an antigen not a superantigen, for human T cells. Hum Immunol. 1997; 53(2):206-15.

Dos Reis GA, Gaspar MIC, Barcinsky MA. Immune recognition in the streptococcal carditis of mice: the role of macrophages in the generation of heart-reactive lymphocytes. J Immunol. 1982;128(4):1514-21.

Espinosa LE, Li Z, Barreto DG, Jaimes EC, Rodriguez RS, Sakota V, Facklam RR, Beall B. M protein gene type distribution among group A streptococcal clinical isolates recovered in Mexico City, Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: overlap with type distribution within the United States. J Clin Microbiol. 2003;41(1): 373-378.

Fae 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 tissue proteins leads to heart lesions in rheumatic heart disease. J Autoimmun. 2005;24(2):101-109.

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

Ferretti JJ, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes PNAS. 2001;98(8):4658-63.

Ferrieri, P. for the Jones Criteria Working Group * Proceedings of the Jones Criteria Workshop *Circulation*. 2002;106:2521.

Fischetti VA. Vaccine Development for Group A Streptococcal Infections), em "Rheumatic Fever". 1999. J. Narula, R.Virman, K.S. Reddy e R. Tandon. American Registry of Pathology.

Fischetti, VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behaviour Clin Microbiol Rev. 1989;2:285-314.

Fluckiger U, Jones KF, Fischetti VA. Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. Infect Immun. 1988;66(6):974-979.

Fournie GJ, Cautain B, Xystrakis E, Damoiseaux J, Mas M, Lagrange D, Bernard I, Subra JF, Pelletier L, Druet P, Saoudi A Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. Immunol Rev. 2001;184:145-60.

Fujinami RS, Oldstone MB. Aminoacid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. Science. 1985;230:1043-45.

Galvin JE, Hemric ME, Kosanke SD, Factor SM, Quinn A, Cunningham MW. Induction of myocarditis and valvulitis in lewis rats by different epitopes of cardiac myosin and its implications in rheumatic carditis. Am J Pathol. 2002;160(1):297-306.

Gillum, R.F. Trends in Acute Rheumatic Fever and Chronic Rheumatic Heart Disease. A National Perspective. Am. Heart J. 1986;111: 430.

Glaser RJ, Wilbur AT, Morse SI, Darnell JE. The incidence and pathogenesis of myocarditis in rabbits after group A streptococcal pharyngeal infections. J Exp Med 1956;103(1):173-188.

Guedez Y, Kotby A, El-Demellawy M, Galal A, Thomson G, Zaher S, Kassem S, Kotb M. HLA class II associations with rheumatic heart disease are more evident and consistent among clinically homogeneous patients. Circulation. 1999;99(21):2784-90.

Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, 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, Weidebach W, Kiss MH, Snitcowsky R, Kalil J. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation*. 1991;83(6):1995-8.

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. Molecular evidence for antigen-driven immune responses in cardiac lesions of rheumatic heart disease patients. *Int Immunol*. 2000;12(7):1063-1074.

Guilherme L, Oshiro SE, Fae KC, Cunha-Neto E, Renesto G, Goldberg AC, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kiss MH, Silva C, Guzman F, Patarroyo ME, Southwood S, Sette A, Kalil J. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. *Infect Immun*. 2001;69(9):5345-51.

Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, Kalil J. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med*. 2005;7(28):1-15.

Gulizia JM, Cunningham MW, McManus BM. Immunoreactivity of anti-streptococcal monoclonal antibodies to human heart valves; evidence for multiple cross reactive epitopes. *Am.J.of Pathol*. 1991;138(2): 285-301.

Haanes EJ, Cleary PP. Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49. *J Bacteriol*. 1989;171(12):6397-408.

Haddad N, Silva MB. Mortality due to cardiovascular disease in women during the reproductive age (15 to 49 years), in the State of Sao Paulo, Brazil, from 1991 to 1995. *Arq Bras. Cardiol.* 2000; 75(5):375-379.

Harbaugh MP, Podbielski A, Hugl S, Cleary PP. Nucleotide substitutions and small-scale insertion produce size and antigenic variation in group A streptococcal M1 protein. *Mol Microbiol.* 1993;8(5):981-91.

Harlow E, Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*, edited by Cold Spring Harbor Laboratory; NY:1998.

Hayman WA, Brandt ER, Relf WA, Cooper J, Saul A, Good MF. Mapping the minimal murine T cell and B cell epitopes within a peptide vaccine candidate from the conserved region of the M protein of group A streptococcus. *Int Immunol.* 1997;9(11):1723-33.

Ho PL, Johnson DR, Yue AW, Tsang DN, Que TL, Beall B, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of invasive and noninvasive group A streptococcal isolates in Hong Kong. *Journal of Clin. Microbiol.* 2003;41(3):937-942.

Hollingshead SK, Fischetti VA, Scott JR. Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A Streptococcus. Repetitive structure and membrane anchor. *J Biol Chem.* 1986;261(4):1677-86.

Hollingshead SK, Arnold J, Readdy TL, Bessen DE. Molecular evolution of a multigene family in group A streptococci. *Mol Biol Evol.* 1994;11(2):208-19.

Husby G, van de Rijn I, Zabriskie JB, Abidin ZH, Williams RC Jr. Antibodies reacting with cytoplasm of subthalamic and caudate nuclei neurons in chorea and acute rheumatic fever. *J Exp Med.* 1976;144(4):1094-110.

Invasive streptococcal Group A infections: First report on enhanced surveillance.
[London: Public Health Laboratory Service (PHLS) Vol 5, No. 10, 1985]

Janeway CA, Travers P. Immunobiology 4^a ed. Garland Publishing:MD: 2004

Jarvis TN. Rheumatic Fever. Prim.Care UpdateOb/Gyns 2003;10(1):9-13

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 EL. The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. J Pediatr. 1980;97(3):337-45.

Kaplan EL, Wotton JT, Johnson DR. Dynamic epidemiology of group A streptococcal serotypes associated with pharyngitis. Lancet. 2001;358(9290):1334-7.

Kaplan MH, Dallenbach FD. Immunologic studies of heart tissue. III. Occurrence of bound gamma globulin in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. J Exp Med. 1961;113:1-16.

Kaplan MH, Meyserian M. An immunological cross-reaction between group-A streptococcal cells and human heart tissue. Lancet. 1962;1:706-10.

Kaplan MH. Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. J Immunol. 1963;90:595-606.

Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. J Clin Invest. 2001;108(8):1097-104.

Kehoe MA, Poirier TP, Beachey EH, Timmis KN. Cloning and genetic analysis of serotype 5 M protein determinant of group A streptococci: evidence for multiple copies of the M5 determinant in the *Streptococcus pyogenes* genome. *Infect Immun.* 1985;48(1):190-7.

Kehoe MA, Kapur V, Whatmore AM, Musser JM. Horizontal gene transfer among group A streptococci: implications for pathogenesis and epidemiology. *Trends Microbiol.* 1996;4(11):436-43.

Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW. Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med.* 2003;9(7):823-5.

Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;57(2):250-62.

Kotloff KL, Corretti M, Palmer K, Campbell JD, Reddish MA, Hu MC, Wasserman SS, Dale JB. Safety and Immunogenicity of a Recombinant Multivalent Group A Streptococcal Vaccine in healthy Adults Phase 1 Trial *JAMA.* 2004;11;292(6):709-15.

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

Laemmly UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assemble of the Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.

Lancefield RC. The antigenic complex of streptococcus hemolyticus. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcu hemolyticus. *J.Exp.Med.* 1928;47:9-10.

Lancefield RC, Perlmann GE. Preparation and properties of type-specific M antigen isolated from group A, type 1 hemolytic streptococcus J.Exp.Med. 1952;96(1):71-82.

Lancefield RC. Persistence of type specific antibodies in man following infection with group A streptococci. J.Exp.Med. 1959;110(2):271-92.

Lancefield RC. Current knowledge of type specific M antigens of group A streptococci.. J. Immunol. 1962;89:307-313.

Lee C-J, Wang TR, Frasch CE. Immunogenicity in mice of pneumococcal glycoconjugate vaccines using pneumococcal protein carriers. Vaccine 2001;19(23-24):3216-25.

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.

Li Y, Heuser JS, Kosanke SD, Hemric M, Cunningham MW. Cryptic epitope identified in rat and human cardiac myosin S2 region induces myocarditis in the Lewis rat. 2004;J Immunol 172, 3225-3234.

Lymbury RS, Olive C, Powell KA, Good MF, Hirst RG, LaBrooy JT, Keethesan N. Induction of autoimmune valvulitis in Lewis rats following immunization with peptides from the conserved region of group A streptococcal M protein. J.Autoimm. 2003;20:211–217.

Maharaj B, Hammond MG, Appadoo B, Leary WP, Pudifin DJ. HLA-A, B, DR, and DQ antigens in black patients with severe chronic rheumatic heart disease. Circulation. 1987;76(2):259-61.

McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993 Aug;68(2):159-69.

McDonald M, Currie BJ, Carapetis JR. Acute rheumatic fever: a chink in the chain that links the heart to the throat? *Lancet Infect Dis*. 2004;4(4):240-5.

Mencarelli M, Corbisiero R, Padula MG, Galgani I, Stolzuoli L, Cellesi C. Group A streptococcal infections: trend and strain emm typing in an area of central Italy, 1985-2002 *Epidemiol Infect*. 2005 Dec;133(6):1107-11.

Meira ZMA Prevalence of rheumatic fever in children from a public high school in Belo Horizonte, Brazil. *Archives of Brazilian Cardiology* 1995; 65:331-4.

Ministério da Saúde. Boletim anual dos dados epidemiológicos de Febre Reumática Aguda, Brasília, 2000.

Ministerio da Saúde. Coordenação de Doenças Crônico-Degenerativas. Incidência da febre reumática no Brasil. MS; 2003; Brasília/DF.

Mouw AR, Beachey EH, Burdett V. Molecular evolution of streptococcal M protein: cloning and nucleotide sequence of the type 24 M protein gene and relation to the other genes of *Streptococcus pyogenes*. *J.Bacteriol*. 1988;170(2):676-84.

Murphy GE, Swift HF. Induction of cardiac lesions closely resembling those of rheumatic fever in rabbits following repeated skin infections with group A streptococci *J Exp Med* 1949;89:687-98.

Murphy GE, Swift HF. The induction of rheumatic-like cardiac lesions in rabbits by repeated focal injections with group A streptococci. Comparisson with the cardiac lesions of serum disease. *J Exp Med* 1950;91:485-98.

Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):2489-93.

Oshiro, SE. "Caracterização Celular e Humoral periferica dos Epitopos Imunodominantes da Proteina M do *S. pyogenes* em Pacientes Portadores da Doença Reumatica". [Tese de Mestrado] São Paulo:Universidade de São Paulo;2000.

Pancholi V, Fischetti VA. Isolation and characterization of the cell-associated region of group A streptococcal M6 protein. *J Bacteriol*. 1988;170(6):2618-24.

Ponten A, Li X, Thoren P, Aase K, Sjoblom T, Ostman A, Eriksson U. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2003;163(2):673-82.

Pruksakorn S, Galbraith A, Houghten RA, Good MF. Conserved T and B cell epitopes on the M protein of group A streptococci. Induction of bactericidal antibodies. *J Immunol*. 1992;149(8):2729-35.

Pruksakorn S, Currie B, Brandt E, Phornphutkul C, Hunsakunachai S, Manmontri A, Robinson JH, Kehoe MA, Galbraith A, Good MF. Identification of T cell autoepitopes that cross-react with the C-terminal segment of the M protein of group A streptococci. *Int Immunol*. 1994;6(8):1235-44.

Quinn A, Kosanke S, Fischetti VA, Factor SM, Cunningham MW. Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal m protein. *Infect Immun*. 2001;69(6):4072-8.

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. Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cell antibodies. *Am J Med.* 1983;74(1):90-6.

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.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(8):1103-9.

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.

Ridge SC, Zabriskie JB, Osawa H, Diamanstein T, Oronsky AL, Kerwar SS. Administration of group A streptococcal cell walls to rats induces interleukin 2 deficiency. *J. Exp. Med.* 1986;164(1):327-32.

Robinson JH, Atherton MC, Goddacre JA, Pinkney M, Weightman H, Kehoe MA. Mapping T-cell epitopes in group A streptococcal type 5M protein. *Infect.Immun.* 1991;59(12):4324-31.

Robinson JH, Case MC, Kehoe MA. Characterization of a conserved helper-T-cell epitope from group A Streptococcal M proteins. *Infect Immun.* 1993;61(3):1062-8.

Robbins, SL. *Patologia Estrutural e Funcional.* Cotran M, Kumar V, Robbins S. Editora Guanabara Koogan S.A.;1991.

Robbins JC, Spanier JG, Jones SJ, Simpson WJ, Cleary PP. Streptococcus pyogenes type 12 M protein Gene regulation by upstream sequences. J Bacteriol. 1987;169(12):5633-40.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 1, 2, 3;1989.

Satoh F, Tsutsumi Y Anitschkow cells in the human heart. Pathol Int. 1999;49(1):85-7.

Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. Annu Rev Immunol. 1993;11:729-66.

Scott JR, Fischetti VA. Expression of streptococcal M protein in Escherichia coli. Science. 1983 Aug 19;221(4612):758-60.

Shulman ST, Stollerman G, Beall B, Dale JB, Tanz RR. Temporal changes in streptococcal M protein types and the near-disappearance of acute rheumatic fever in the United States. Clin Infect Dis. 2006;42(4):441-7.

Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. J Immunol. 1991;147(7):2141-7.

HLA class II associations with rheumatic heart disease among clinically homogeneous patients in children in Latvia.

Stanevicha V, Eglite J, Sochnevs A, Gardovska D, Zavadska D, Shantere R. Arthritis Res Ther. 2003;5(6):R340-6.

Stollerman GH. Rheumatogenic group A streptococci and the return of rheumatic fever. Adv Intern Med. 1990;35:1-25.

Stollerman GH. Nephritogenic and rheumatogenic group A streptococci. *J Infect Dis.* 1969;120(2):258-63.

Stollerman, GH. (1997). Rheumatic Fever. *Lancet.* 349(9056):935-42

Stehbens WE, Zuccollo JM. Anitschkow myocytes or cardiac histiocytes in human hearts. *Pathology.* 1999;31(2):98-101.

Takahashi T (1998). *International Immunology.* 10(12)p1969.

Terreri MT, Ferraz MB, Goldenberg J, Len C, Hilario MO. Resource utilization and cost of rheumatic fever. *J Rheumatol.* 2001;28(6):1394-7.

Tobacman LS, Adelstein RS. Enzymatic comparisons between light chain isozymes of human cardiac myosin subfragment-1. *J Biol Chem.* 1984;259(18):11226-30.

Tomai, M., Kotb, M., Majumdar, G., **Beachey**, EH. (1990). Superantigenicity of Streptococcal M protein. *J.exp.Med.* 172:359-362.

Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *PNAS* 1979;76(9):4350-4354.

Tyrrell GJ, Lovgren M, Forwick B, Hoe NP, Musser JM, Talbot JA. M types of group a streptococcal isolates submitted to the National Centre for Streptococcus (Canada) from 1993 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4466-71.

Unny S, Middlebrooks B. Streptococcal Rheumatic Carditis. *Microbiol.Reviews* 1983;47(1): 97-120.

Veasy LG, Wiedmeier SE, Orsmond GS, Ruttenberg HD, Boucek MM, Roth SJ, Tait VF, Thompson JA, Daly JA, Kaplan EL, et al. Ressurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States, *N.Engl.J.Med.* 1987;316(8):421-7.

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.

Virmani R, Roberts WC. Aschoff bodies in the opereatively excised atrial appendages and in the papillary muscles. Frequency and clinical significance. *Circulation.* 1977;55(4):559-63.

Virtaneva K, Graham MR, Porcella SF, Hoe NP, Su H, Graviss EA, Gardner TJ, Allison JE, Lemon WJ, Bailey JR, Parnell MJ, Musser JM. Group A Streptococcus gene expression in humans and cynomolgus macaques with acute pharyngitis. *Infect Immun.* 2003;71(4):2199-207.

Zabriskie JB, Freimer EH. An immunologic relationship between the group A streptococci and mammalian muscle *J Exp Med.* 1966;124(4):661-78.

Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:579-621.

Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type I: autoimmune disease after viral infection. *Science.* 1998;279(5355):1344-7.

Wannamaker LW, Rammelkamp CH Jr, Denny, FW, Brink WR, Houser HB, Hahn EO, Dingle JH. Prophylaxis of acute rheumatic fever by treatment of the preceding streptococcal infection with various amounts of depot penicillin. *Am J Med.* 1951;10(6):673-95.

Wannamaker LW. The chain that links the heart to the throat. *Circulation*. 1973;48(1):9-18.

Wannamaker LW. Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. I. *N Engl J Med*. 1970;282(1):23-31.

Watanabe-Ohnishi R, Aelion J, LeGros L, Tomai MA, Sokurenko EV, Newton D, Takahara J, Irino S, Rashed S, Kotb M. Characterization of unique human TCR V beta specificities for a family of streptococcal superantigens represented by rheumatogenic serotypes of M protein.. *J Immunol*. 1994;152(4):2066-73.

Wegmann KW, Zhao W, Griffin AC, Hickey WF. Identification of myocarditogenic peptides derived from cardiac myosin capable of inducing experimental allergic myocarditis in the Lewis rat. The utility of a class II binding motif in selecting self-reactive peptides. *J Immunol*. 1994;153(2):892-900.

Westland KW, Pollard JD, Sander S, Bonner JG, Linington C, McLeod JG. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. *Brain*. 1999;122 (Pt 7):1283-91.

Whatmore AM, Kehoe MA. Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal emm-like genes: gene mosaics and variation in Vir regulons. *Mol Microbiol*. 1994;11(2):363-74.

WHO Expert Consultation Geneva. Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease WHO Technical Report Series 923;2004.

Wildner G, Diedrichs-Moehring M. Multiple autoantigen mimotopes of infectious agents induce autoimmune arthritis and uveitis in lewis rats. 2005;12(5):677-9.

Wildner G, Diedrichs-Moehring M. Multiple autoantigen mimotopes of infectious agents induce autoimmune arthritis and uveitis in lewis rats. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(5):677-9.

Wood HF, Feinstein AR, Taranta A, Epstein JA, Simpson R. Rheumatic fever in children and adolescents. A long-term epidemiologic study of subsequent prophylaxis, streptococcal infections, and clinical sequelae. III. Comparative effectiveness of three prophylaxis regimens in preventing streptococcal infections and rheumatic recurrences. *Ann Intern A Med* 1964; 60(suppl 5):31–46.

Identification of group A beta hemolytic *Streptococcus* strains in Brazil

S. Freschi de Barros ^{a,b}, R. Alencar ^{a,b}, F. Higa ^{a,b}, F. Alcântara ^{a,b},
F. Rossi ^c, R. Muller ^c, K.C. Faé ^{a,b}, J. Kalil ^{a,b,d}, L. Guilherme ^{a,b,*}

^a Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b iii-Institute for Immunology Investigation, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Clinical Hospital, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Laranjeiras National Cardiology Institute, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract. Despite the high incidence of RF and the prevalence of RHD in Brazil, the *Streptococcus* strains more prevalent in our country were not identified. Aiming to have a better epidemiological characterization of the most prevalent strains in Brazil, in the present work we isolated streptococcal different strains from random samples from São Paulo and Rio de Janeiro (Brazil) cities using *emm* genotyping. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*; M protein; *emm* sequencing

1. Introduction

Group A beta hemolytic *Streptococcus* causes several diseases, such as severe invasive infections, poststreptococcal nonsuppurative sequel of acute rheumatic fever (RF) and acute glomerulonephritis and also uncomplicated pharyngites and pyoderma [1]. RF affects 3–4% of untreated children. Rheumatic heart disease (RHD) the most serious complication, develops 4–8 weeks (or later) after group A *Streptococcus* infection in 30–45% of individuals with RF. RF occurs most frequently among children and adolescents between 5 and 18 years, coinciding with the age distribution of the highest prevalence of streptococcal infections. The prevalence of RF in developing countries is up to 24 per

* Corresponding author. Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 1130695901; fax: +55 1130695953.

E-mail address: luizagui@usp.br (L. Guilherme).

1000 individuals and 14 million individuals suffered from RHD [2]. In Brazil, registered numbers of acute RF indicated an incidence of 20,000 new cases/year in the 1990s decreasing in the last 5 years to 5000 new cases/year (Brazilian Healthy Ministry). Heart valve damage as a consequence of RF is responsible for 90% of child heart surgeries and represents a very high cost to the Brazilian Health System.

Despite the high incidence of RF and RHD in Brazil, the *Streptococcus* strains more prevalent in our country were not identified. Aiming to have a better epidemiological characterization of the most prevalent strains in Brazil, we isolated 26 *streptococcal* different strains from 54 random samples.

2. Material and methods

2.1. Isolation and identification of *Streptococcus pyogenes*

The *S. pyogenes* isolates were recovered from random samples from oropharyngeal, tonsils, skin, blood infections and others sources from patients treated in Clinical Hospital, University of São Paulo, São Paulo and Laranjeiras National Cardiology Institute, Rio de Janeiro, Brazil. Identification was based on characteristic haemolysis in blood agar and sensitivity to bacitracin.

2.2. PCR for *emm* gene

Single colonies were incubated overnight at 37 °C, and the lawn of *streptococci* was harvested and suspended. DNA extracts were prepared as follows: aliquots were heated at 70 °C for 15 min, centrifuged, and pellets were incubated in 50 µl of 10 mmol/L Tris and 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) with 2 µl hyaluronidase (45,000 U/ml) and 10 µl mutanolysin (3000 U/ml) for 30 min at 37 °C, boiled for 10 min at 100 °C and briefly centrifuged to pellets debris. Five microliters of supernatant was used as template for PCR mixture. Primers 1 ([TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA]) and 2 (GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT) were used in PCRs as previously described [3].

2.3. *emm* sequence typing

PCR products were sequenced by using primer 1 with the Big Dye dideoxynucleotide chain terminator method with an ABI 377 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The BLAST 2 program (National Center for Biotechnology Information; available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) was used to compare the DNA sequence with published sequences in the Gen Bank.

The strain identification was defined when *emm* type had >95% identity over the first 160 nucleotides (counting from the beginning of the sequence obtained with primer 1. This sequence includes 70 bases coding for the signal peptide and 90 bases coding for the 30 first amino acids of the mature protein.

3. Results

A total of 54 GAS isolates from skin ($n=4$), blood ($n=7$), oropharyngeal ($n=14$), tonsils ($n=12$), other sites ($n=5$) and unknown ($n=12$) were analyzed. The samples were collected from 2002 to 2004. A total of 26 different M type strains were identified in the 54 isolates (Table 1). The 8 most

Table 1
Identification of the *streptococcal* M strains

Source	Strains	Sample	Source	Strains	Sample
Oropharyngeal	<i>emm</i> 1	39	Skin	<i>emm</i> 6	34
Oropharyngeal	<i>emm</i> 1	138	Skin	<i>emm</i> 22	10
Oropharyngeal	<i>emm</i> 4	149	Skin	<i>emm</i> 87	55
Oropharyngeal	<i>emm</i> 12	82	Blood	<i>emm</i> 1	61
Oropharyngeal	<i>emm</i> 22	145	Blood	<i>emm</i> 1	16
Oropharyngeal	<i>emm</i> 22	150	Blood	<i>emm</i> 12	21
Oropharyngeal	<i>emm</i> 22	155	Blood	<i>emm</i> 18	30
Oropharyngeal	<i>emm</i> 22	167	Blood	<i>emm</i> 81	64
Oropharyngeal	<i>emm</i> 57	140	Blood	<i>emm</i> 87	31
Oropharyngeal	<i>emm</i> 71	153	Blood	<i>emm</i> 92	68
Oropharyngeal	<i>emm</i> 75	142	Bone	<i>emm</i> 102	49
Oropharyngeal	<i>emm</i> 78	72	Joins	<i>emm</i> 6	40
Oropharyngeal	<i>emm</i> 94	77	Joins	<i>emm</i> 86	23
Oropharyngeal	<i>emm</i> 108	94	Pleura	<i>emm</i> 1	42
Tonsils	<i>emm</i> 1	54	Pulmonary Secretion	<i>emm</i> 75	58
Tonsils	<i>emm</i> 1	57	Unknown	<i>emm</i> 1	3
Tonsils	<i>emm</i> 6	19	Unknown	<i>emm</i> 1	8
Tonsils	<i>emm</i> 11	53	Unknown	<i>emm</i> 1	51
Tonsils	<i>emm</i> 22	38	Unknown	<i>emm</i> 6	37
Tonsils	<i>emm</i> 22	50	Unknown	<i>emm</i> 24	18
Tonsils	<i>emm</i> 50	47	Unknown	<i>emm</i> 33	172
Tonsils	<i>emm</i> 77	29	Unknown	<i>emm</i> 64	67
Tonsils	<i>emm</i> 77	60	Unknown	<i>emm</i> 68	11
Tonsils	<i>emm</i> 87	52	Unknown	<i>emm</i> 75	9
Tonsils	<i>emm</i> 87	56	Unknown	<i>emm</i> 76	65
Tonsils	<i>emm</i> 87	15	Unknown	<i>emm</i> 92	44
Skin	<i>emm</i> 1	32	Unknown	<i>emm</i> 101	1

frequently were M1 (20%), M22 (13%), M87 (9%), M6 (7%), M75 (6%) and M92, M77, M12 (4%) (Fig. 1).

4. Discussion

This study showed that M1 (20%), M22 (13%), M87 (9%), M6 (7%), M75 (6%) and M92, M77, M12 (4%) types were the most prevalent isolate strains. The M1 and M12 strains were also the most prevalent finding in other regions such as, North America [4], Europe [5], Mexico [6] and Canada [7]. In addition, some strains are known as rheumatogenic as M1, M6, M24, M18 [8]. In order to characterize the diversity and

Fig. 1. Frequency of *emm* types.

prevalence of group A beta hemolytic *Streptococcus* strains in our country, we intend to increase the number of *Streptococcus* samples from different regions of Brazil. Certainly the identification of *Streptococcus* strains prevalent in Brazil will be useful for epidemiologic investigations and seminal to a vaccine for preventing RF/RHD.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP and CNPq.

References

- [1] M.W. Cunningham, Pathogenesis of group A streptococcal infections, Clin. Microbiol. Rev. 13 (3) (2000 (Jul.)) 470–511.
- [2] J.R. Carapetis, The current evidence for the burden of group A *streptococcal* diseases, WHO/FCH/CAH/05·07, World Health Organization, Geneva, 2004, pp. 1–57 http://www.who.int/childdolescent-health/publications/CHILD-HEALTH/DP/Topic_2/ paper_1.htm.
- [3] A.M. Whatmore, M.A. Kehoe, Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal *emm*-like genes: gene mosaics and variation in *Vir regulons*, Mol. Microbiol. 11 (1994) 363–374.
- [4] S.T. Shulman, et al., Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000–2002, Clin. Infect. Dis. 39 (3) (2004 (Aug. 1)) 325–332.
- [5] A. Efstratiou, Group A *streptococci* in the 1990s, J. Antimicrob. Chemother. 45 (2000) 3–12.
- [6] L.E. Espinosa, et al., M protein gene type distribution among group A *streptococcal* clinical isolates recovered in Mexico City, Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: overlap with type distribution within the United States, J. Clin. Microbiol. 41 (1) (2003 (Jan.)) 373–378.
- [7] G.J. Tyrrell, et al., M types of group a *streptococcal* isolates submitted to the National Centre for *Streptococcus*(Canada) from 1993 to 1999, J. Clin. Microbiol. 40 (12) (2002 (Dec.)) 4466–4471.
- [8] A.L. Bisno, The concept of rheumatogenic and non-rheumatogenic group A *streptococci*, in: S.E. Read, J.B. Zabriskie (Eds.), Streptococcal Diseases and the Immune Response, Academic Press, New York, 1980, p. 789.