Hui-Tzu Lin Wang

Autorreatividade humoral a peptídeos da miosina cardíaca e proteína de choque térmico 60: estudo sequencial em pacientes transplantados cardíacos e indivíduos sadios

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lin-Wang, Hui Tzu
Autorreatividade humoral a peptídeos da miosina cardíaca e proteína de choque término 60: estudo sequencial em pacientes transplantados cardíacos e indivíduos sadios / Hui Tzu Lin Wang. -- São Paulo, 2009.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.
Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Descritores: 1.Transplante de coração 2.Miosinas cardíacas 3.Chaperonina 60 4.Peptídeos 5.Auto-anticorpos

USP/FM/SBD-058/09

“A sabedoria suprema é ter grandes projetos, de tamanho suficiente para que não os percamos de vista enquanto são perseguidos”

William Faulkner

DEDICATÓRIAS

... A águia mãe é dotada de sabedorias inatas...

Enquanto os filhotes não descobrissem suas asas, não haveria objetivo em suas vidas. Enquanto não aprendessem a voar, não compreenderiam o privilégio de ter nascido águia. O empurrão era o maior presente que a águia mãe tinha para lhes dar. Era o supremo ato de amor. E por isso, um a um, ela os empurrou, e eles voaram...

David McNally

Aos meus pais, Jung-Hui e Chhing-Jung que sacrificaram o conforto próprio para proporcionar o estudo aos seus cinco filhos, e assim, cada um voou com as próprias asas. Suas vidas são nossos eternos exemplos de fé, perseverança e amor ao próximo

Aos meus irmãos, Hui-Lin, Hui-Ching, Yu-Chih e Yu-San, mestres e doutores nas suas áreas profissionais. Muito obrigada pelo carinho, companheirismo e cumplicidade que sempre existiram entre nós, desde os momentos mais difíceis da nossa infância

Ao meu marido Ming-Chhang, o pilar da nossa família, o companheiro compreensivo e amoroso que me proporcionou os momentos mais felizes da minha vida e aos nossos filhos, Gabriel e Christiane,
presente dado por Deus e que nos enchem de alegrias e orgulho.

AGRADECIMENTOS

Os resultados desta dissertação vão muito além dos gráficos, tabelas e os dados aqui apresentados. Muito foi discutido, compartilhado e aprendido. Certamente, a maior conquista foi a amizade construída ao longo do caminho e que seguirá comigo para sempre.

Aos professores doutores da disciplina de alergia e imunopatologia da faculdade de medicina da universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho de mestrado. Às secretárias: Tânia e Andréia, pela paciência e incansáveis esforços em ajudar-me nos problemas burocráticos;

Ao Instituto do Coração, por me acolher como aluna de Mestrado, e pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Imunologia de Transplantes – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

Prof. Dr. Jorge Kalil, pela forma carinhosa com que fui recebida no seu laboratório e também por proporcionar estruturas para realização deste trabalho. Muito obrigada também pelas críticas construtivas e sugestões que recebi nas reuniões de quintas-feiras, que certamente, foram importantes para a finalização deste trabalho;

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, onde mantenho vínculo de servidor público e todos os colegas da instituição: pesquisadores científicos, pessoal administrativo, colegas médicos, enfermeiras, farmacêuticos, biólogos e especialmente ao diretor da divisão de pesquisa, Dr. Álvaro Avezum pela oportunidade de voltar para a vida acadêmica e realizar este trabalho;

Dra. Verônica Coelho, que além de orientadora foi uma amiga e conselheira durante todos estes anos de convivência. Obrigada pela paciência, confiança e respeito ao meu ritmo de trabalho. Entre os momentos de alegria e de dificuldades que surgiram por toda esta trajetória, foi no seu abraço afetuoso que encontrei energias para continuar trabalhando. Certamente sentirei muita falta dos seus abraços, mas espero

que possamos continuar crescendo juntas, tanto na pesquisa como na amizade.

Dr. Ricardo Manrique, chefe do laboratório de pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Um grande amigo acima de tudo - foi a primeira pessoa que me incentivou a fazer o curso de pós-graduação e participou ativamente para tornar possível este sonho. Obrigada pelos inúmeros momentos em que conversamos longamente, algumas vezes sobre assuntos científicos, outras vezes sem assunto específico, no entanto, todas as vezes falamos de assuntos agradáveis e construtivos;

Aos amigos técnicos do Laboratório de Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia: Marluce, uma pessoa sempre atenciosa e muito prestativa para atender os pacientes que procuram pelo nosso serviço; Luis - que se orgulha de ser descendente de índios -, pela colaboração ao se desdobrar para cobrir a minha ausência durante o período da realização deste trabalho;

Dr. Fernando Bacal e Dra. Silvia Ayub pelo valiosíssimo conhecimento na área do transplante cardíaco, o que contribuiu muito na interpretação e discussão dos nossos resultados;

Ao serviço de Anatomia e Patologia do InCor por fornecer os laudos de biópsias endomiocárdicas dos pacientes transplantados, usados na comparação com os nossos resultados;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Imunologia de Transplante do InCor, cada um a contribuir de alguma forma para a realização deste trabalho; aos chefes de grupos: Dra. Luiza Guilherme, Dr. Edecio Cunha-Neto, Dra. Anna Carla Goldberg pelas valiosas críticas. Especialmente à equipe do HLA, Dr. Hélcio e Dr. Nicolas pelo primeiro estágio concedido e imenso apoio na chegada ao laboratório;

Aos amigos Cláudio e Washington pela síntese de peptídeos utilizada neste trabalho. E também à Dra. Madaleine Cunningham da Universidade de Oklahoma, EUA por ceder gentilmente os peptídeos da miosina cardíaca, sem os quais não seria possível chegarmos até este ponto;

Aos amigos que fizeram parte do grupo de transplante do laboratório de imunologia do InCor: Mônica Spadafora-Ferreira, Idânia Marrero, Ernesto

Dunnas, Cristina Caldas, Adalberto e Evelyn, doutores agora, e cada um seguindo seu caminho em busca de novos desafios profissionais. Muito obrigada pela convivência tão agradável, e pela paciência em tirar dúvidas de uma principiante em imunologia. Também aos amigos que ainda continuam no grupo: Dra. Francine, Dra. Geórgia, Dra. Maristela, Fernanda, Maísa, Aninha, Nathalia, Carol, Paty, Pedro e Hernandez, pelo constante incentivo e sugestões para melhora a qualidade deste trabalho.

Às amigas de todas as horas, Sandra Emiko, Maria Lúcia Marin (a querida Malú), Carla Ronda, Sandra Maria, Rica e Ângela Fucks, cuja amizade foi responsável pelos melhores resultados dessa jornada. Obrigada por não medirem esforços para auxiliar na realização deste projeto.

Aos pacientes transplantados e indivíduos sadios que doaram sangue para a realização deste trabalho. Também à Márcia Maluf, a primeira mulher que recebeu o transplante do coração no Instituto Dante Pazzanese de Cardilogia, cuja vida é um exemplo de luta e perseverança. Muito obrigada pela sua amizade e também por auxiliar na correção deste trabalho.

A todos os amigos e colegas da biblioteca e do laboratório de epidemiologia e estatística do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, especialmente à Roberta, Valdir e Helena, meus sinceros agradecimentos pela assistência na análise estatística, informática e bibliográfica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de gráficos
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO.....1
   Autoimunidade 2
   Autoanticorpos, anticorpos naturais e células B1 4
   Citocinas que atuam na mudança de isotipo de anticorpo 6
   Autoantígenos.....7
      Miosina Cardíaca.....8
      Proteínas de choque térmico.....12
   Transplante cardíaco.....17

2. OBJETIVOS 20

3. MÉTODOS 21
   3.1 Delineamento experimental ..... .22
   3.2 Comissão de ética e científica 23
   3.3 Casuística 23
      3.3.1. Sujeitos de pesquisa: indivíduos sadios 23
      3.3.2. Sujeitos de pesquisa: transplantados cardíacos 24
   3.4 Peptídeos 27
      3.4.1. Síntese de peptídeos 27
      3.4.2. Peptídeos da miosina cardíaca 28
      3.4.3. Peptídeos da Hsp60 29
   3.5 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ……..31
      3.5.1. Procedimento do ELISA padronizado.....31

3.5.2. Controles utilizados no ELISA 32
3.5.3. Valores de referência para validação do teste de ELISA 33
3.5.4. Ponto de corte para teste de ELISA 34
3.6 Análise estatística 34

4. RESULTADOS 36
4.1 Autorreatividade fisiológica 37
4.1.1. Frequência de indivíduos sadios reativos à miosina cardíaca e à Hsp60 37
4.1.2. Intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos sadios.....40
4.1.3. Número de peptídeos reconhecidos por indivíduos sadios.....42
4.1.4. Variabilidade da autorreatividade humoral fisiológica 44

4.2 Autorreatividade humoral no transplante cardíaco.....46
4.2.1. Frequência de indivíduos transplantados reativos à miosina cardíaca e à Hsp60.....46
4.2.2. Intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e Hsp60 nos indivíduos transplantados.....48
4.2.3. Número de peptídeos reconhecidos por indivíduos transplantados 51
4.2.4. Variabilidade da autorreatividade humoral no Transplante cardíaco.....54
4.2.5. Autorreatividade humoral aos peptídeos selecionados 56
- Frequência de indivíduos transplantados reativos: períodos de transplante 59
- Frequência de indivíduos transplantados reativos: tipo de rejeição 61

- Frequência de indivíduos transplantados reativos:
doenças cardíacas de base 63
4.2.6. Número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos
Transplantados cardíacos 65
- Número de peptídeos reconhecidos:
tempo de transplante.....65
- Número de peptídeos reconhecidos:
tipo de rejeição 66
- Número de peptídeos reconhecidos: episódios de
rejeição no primeiro ano de transplante.....67
- Número de peptídeos reconhecidos: doença de base 68

4.3 Autorreatividade humoral fisiológica e no
transplante cardíaco.....70
4.3.1. Frequência de indivíduos reativos 70
4.3.2. Número de peptídeos reconhecidos 74
4.3.3. Isotipos de anticorpos envolvidos no reconhecimento
dos peptídeos: Sadios e Transplantados 76
4.3.4. Variação individual da intensidade
de autorreatividade humoral 79

5. DISCUSSÃO 80

6. CONCLUSÕES 100

7. ANEXOS 102

8. REFERÊNCIAS 120

APÊNDICE

Lista de abreviaturas

a a - Aminoácidos

CAA - Célula apresentadora de antígenos

CPH - Complexo Principal de Histocompatibilidade

D.O. - Densidade óptica

DMSO – Dimetil sulfóxido

DP - Desvio padrão

DVE - Doença vascular do enxerto

ELISA – Ensaio imunoenzimático (do ingles: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

HSP – Proteína de choque térmico (do inglês: *Heat shock proteins*)

Ig – Imunoglubulina

ISLHT – Do ingles: *International Society for Heart and Lung Transplantation.*

kDa - Quilodalton

MC – Miosina cardíaca

MHC – Molécula principal de histocompatibilidade (do inglês: major histocompatibility complex)

MM - Massa molecular

NOD – Diabetes não obesos (do inglês: non obese diabetes)

OPD - Orto-fenilenodiamina

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (do ingles: *peripheral blood mononuclear cells*)

Pep. – Ppeptídeo

PM - Peso molecular

RAL - Rejeição aguda leve

RAM - Rejeição aguda moderada

Tx – Transplante

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema estrutural das cadeias pesadas da miosina cardíaca 9

Figura 2 – Delineamento Experimental.....22

Figura 3 – Frequência de indivíduos sadios positivos para os anticorpos reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60.....40

Figura 4 – Frequência da intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e Hsp60 nos indivíduos sadios 41

Figura 5 – Porcentagens de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos Indivíduos sadios 43

Figura 6 – Número de peptídeos reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e IgM de indivíduos sadios em três tempos sequenciais.....45

Figura 7 – Distribuição da proporção de indivíduos sadios segundo às porcentagens de peptídeos com variação da intensidade de reatividade ao longo do tempo 46

Figura 8 – Frequência de indivíduos transplantados positivos para os anticorpos IgG e IgM reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e Hsp60 48

Figura 9 – Frequência da intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos transplantados 50

Figura 10 – Porcentagem de peptídeos reconhecidos por indivíduos transplantados cardíacos 53

Figura 11 – Comparação do número de peptídeos reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e IgM de indivíduos transplantados nos períodos pré e pós transplante 54
Figura 12 – Distribuição da proporção de indivíduos transplantados segundo às porcentagens de peptídeos com variação da intensidade de reatividade ao longo do tempo.....56
Figura 13 – Frequência de indivíduos sadios e transplantados positivos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM reativos aos peptídeos da miosina cardíaca.....57
Figura 14 - Frequência de indivíduos sadios e transplantados positivos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM reativos aos peptídeos da Hsp60 58
Figura 15 – Análise longitudinal da frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 60
Figura 16 – Frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos selecionados da miosina cardíaca e da Hsp60 em relação ao tipo de rejeição 62
Figura 17 – Frequência de indivíduos transplantados reativos segundo as doenças cardíacas de base 64
Figura 18 – Porcentagem de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos indivíduos transplantados nos diferentes períodos de evolução do transplante 65

Figura 19 – Comparação do número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados na ausência de rejeição e nos diferentes tipos de rejeição 67
Figura 20 – Comparação do número de peptídeos reconhecidos em relação ao número de episódios de rejeição no primeiro ano de transplante 68
Figura 21 – Número de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM nas doenças cardíacas de base 70
Figura 22 – Frequências de reatividade aos peptídeos selecionados no grupo de indivíduos sadios e nos grupos de diferentes estados clínicos do transplante 73
Figura 23 – Número total de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgM de indivíduos sadios e de indivíduos transplantados nos diferentes períodos de evolução do transplante 75
Figura 24 – Porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos IgG reativos aos peptídeos da miosina cardíaca foi maior do que o IgM no grupo de indivíduos transplantados.....77
Figura 25 – Porcentagem de indivíduos positivos para anticorpos IgG reativos aos peptídeos da Hsp60 foi maior no grupo de indivíduos transplantados cardíacos.....78

Figura 26 - Variação da intensidade de autorreatividade Humoral individual no grupo de indivíduos sadios ao longo 80
Figura 27 – Variação da intensidade de autorreatividade humoral individual no grupo de indivíduos transplantados cardíacos ao longo do tempo.....80
Figura 28 - Comparação individual da intensidade de autorreatividade humoral entre o momento da rejeição e no momento de não rejeição do enxerto cardíaco.....81

Lista de tabelas

Tabela 1 – Caracterização demográfica e clínica do grupo de Indivíduos transplantados cardíacos 25

Tabela 2 – Distribuição das amostras de soro dos indivíduos transplantados, segundo número de amostras por indivíduo, tempo de transplante e laudo de biópsia endomiocárdica 27

Tabela 3 – Sequência de aminoácidos, localização dos resíduos e peso molecular dos peptídeo da miosina cardíaca 30

Tabela 4 – Sequência de aminoácidos, localização dos resíduos e peso molecular dos peptídeo da Hsp60.....31

Tabela 5 – Valores de referência para validação do teste de ELISA.....34

Tabela 6 –Quantidade de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos por indivíduos sadios 38

Tabela 7 - Número de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM de indivíduo transplantado cardíaco 52

AUTORREATIVIDADE HUMORAL A PEPTÍDEOS DA MIOSINA CARDÍACA E PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60: ESTUDO SEQUENCIAL EM PACIENTES TRANSPLANTADOS CARDÍACOS E INDIVÍDUOS SADIOS

A resposta imune dirigida a autoantígenos pode contribuir para a patogênese das doenças autoimunes. Porém, também é discutido o papel imunorregulador da autoimunidade em processos inflamatórios e na rejeição do aloenxerto. Nós pesquisamos os autoanticorpos IgG e IgM reativos a peptídeos da miosina cardíaca (MC) e da proteína de choque térmico 60 (Hsp60) no soro de indivíduos sadios (IS, n=30; 3 momentos com intervalos de 6 meses) e indivíduos transplantados cardíacos (Tx, n=65, $\geq$ 2 amostras/indivíduo, de diferentes períodos Tx: pré-Tx, T1: < 1 ano, T2: 1 a 5 anos e T3: >5 anos), por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Todos os sujeitos do estudo tiveram anticorpos IgG ou IgM que reconheceram pelo menos um dos peptídeos avaliados. Os anticorpos IgG de indivíduos Tx reconheceram mais peptídeos do que dos IS, para a MC (12,2 ± 8,5, intervalo: 1–32 peptídeos versus 5,2 ± 3,0, intervalo: 0-14; p<0,0001), e para a Hsp60 (6,0 ± 4,4, intervalo: 0-18 versus 3,9 ± 3,0, intervalo: 0-12; p=0,0208). A frequência de indivíduos positivos para os anticorpos IgG foi maior no grupo Tx do que nos sadio (p<0,05), com reatividade para a maioria dos peptídeos da MC e da Hsp60. Em contraste, a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos IgM foi maior no grupo de IS do que no Tx (p<0,05), principalmente para a reatividade dirigida aos peptídeos da MC. Os indivíduos do grupo Tx reconheceram todos os

peptídeos da MC, inclusive alguns não reconhecidos pelos sadios (S2: 19, 21, 22, 25, 27, e 29). A variabilidade temporal da autoimunidade humoral aos peptídeos desses antígenos foi maior no grupo Tx ($p<0,001$), indicando maior estabilidade do perfil no estado fisiológico.

No grupo Tx, a frequência de indivíduos positivos para anticorpos IgG e o número de peptídeos reconhecidos foram maiores nos períodos de pré-Tx e T1 e na rejeição ($p<0,05$). Em contraste, para os anticorpos IgM, a frequência de indivíduos positivos e número de peptídeos reconhecidos foram maiores nos períodos de T1, T2 e no momento sem rejeição ($p<0,05$).

Em resumo, no estado fisiológico, observamos um predomínio de autoanticorpos dirigidos à MC e à Hsp60 do tipo IgM, enquanto que no período pré-Tx e durante a rejeição o predomínio foi de IgG. Com base nesses resultados, interpretamos que o ambiente inflamatório da doença cardíaca e da rejeição possa induzir uma maior expressão de Hsp60 e exposição da MC - decorrente da necrose de cardiomiócitos - a células do sistema imune. A resposta imune desencadeada, neste contexto, culminaria na mudança do isotipo IgM, predominante no estado fisiológico, para o isotipo IgG, predominante no quadro de inflamação.

Em conclusão, identificamos um perfil distinto da autoimunidade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60, no estado fisiológico e no transplante cardíaco. Novos estudos permitirão avaliar a atividade funcional desses autoanticorpos no enxerto e nas células do sistema imune, talvez desempenhando um papel na rejeição ou na manutenção da homeostase, no contexto fisiológico.

Abstract

HUMORAL AUTOREACTIVITY TO PEPTIDES FROM CARDIAC MYOSIN AND HEAT SHOCK PROTEIN 60: SEQUENTIAL STUDY IN HEART TRANSPLANTED PATIENTS AND HEALTHY SUBJECTS

The immune response directed to self antigens can contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases. However, autoimmunity may also have an immunoregulatory role in allograft rejection and in other inflammatory processes. We analyzed IgG and IgM autoantibodies reactive to peptides from the human cardiac myosin (CM) and the heat shock protein 60 (Hsp60) in the sera of healthy individuals (HI, n=30, 3 time points with 6 month intervals) and heart transplant individuals (Tx, n=65, $\geq$2 samples/individual, from different Tx periods: pre-Tx, T1: <1 year post-Tx, T2: 1 to 5 years and T3: >5 years), by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

All subjects from both groups had IgG or IgM antibodies that recognized at least one of peptides studied. The numbers of peptides recognized by IgG antibodies was higher in the Tx group than in the HI, for CM (12.2 ± 8.5, range: 1–32 peptides versus 5.2 ± 3.0, range: 0–14 peptides; $p < 0.0001$) and for Hsp60 (6.0 ± 4.4, range: 0-18 peptides versus 3.9 ± 3.0, range: 0–12 peptides; $p=0.0208$). The frequency of individuals displaying IgG antibodies was higher in the Tx group than in HI ($p<0.05$), for both CM and Hsp60. In contrast, the frequency of individuals with IgM antibodies was higher in HI than in the Tx group ($p<0.05$), mainly for CM.

The Tx individuals recognized all CM peptides, including those not recognized by healthy individuals (S2: 19, 21, 22, 25, 27, e 29). Time variability of humoral autoimmunity directed to peptides of both antigens was higher in the Tx group ($p<0,001$), indicating a more stable profile in the physiologic state.

In the Tx group, the frequency of individuals with IgG autoantibodies and the number of peptides recognized were higher in the pre-Tx and T1 periods and during rejection ($p<0.05$). In contrast, for IgM antibodies, the frequency of individuals and the number of peptides recognized were higher in the T1, T2 and in the period with no rejection ($p<0.05$).

In summary, IgM autoantibodies directed to CM and Hsp60 were predominant in the physiologic state, in contrast with the predominance of IgG autoantibodies in the pre-Tx period and during rejection. We suggest that the inflammatory environment found in both cardiac diseases and rejection favors the increase of Hsp60 expression and the exposure of cardiac myosin antigens due to cardiomyocyte necrosis. The immune response triggered in this context induces cell activation and isotype switch, from IgM, predominant in the physiologic state, to IgG, more detected in the inflammatory process.

In conclusion, we identified a distinct profile of humoral autoimmunity to cardiac myosin and to Hsp60 in the physiologic state and in cardiac transplantation. Further studies will allow us to evaluate the functional activity of these antibodies in the graft and in cells of the immune system; they may have a role in rejection or in the maintenance of homeostasis, in the physiologic context.

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Autoimunidade

Autoimunidade refere-se à existência de receptores específicos de antígenos presentes em células do sistema imune de um indivíduo que reconhecem as moléculas próprias. O termo autorreatividade pode ser utilizado como sinônimo de autoimunidade no seu conceito histórico original, traduzindo a existência de linfócitos T, B e de anticorpos autorreativos, mesmo na ausência da doença.

A teoria de seleção clonal (Burnet, 1959) sustentava a idéia de que a função primária do sistema imune era distinguir molecularmente entre o próprio e não próprio, e que a existência de linfócitos autorreativos seria resultado de uma falha no processo de seleção. No entanto, esta hipótese foi refutada, assim como o conceito de "*horror autotoxicus*" (Ehrlich et. al., 1957), uma vez que a autoimunidade fisiológica foi observada por vários grupos de pesquisadores (Nobrega et. al., 1993; Coutinho et. al., 1995; Schwartz et. al., 2000). Em nosso laboratório, a autoimunidade também tem sido investigada em condições fisiológicas e em diversos contextos, como no transplante (Granja et. al., 2004; Caldas et. al., 2006; Luna et. al., 2007), na doença de Chagas (Cunha-Neto et. al., 1995; Iwai et. al., 2005) e na febre reumática (Guilherme et. al., 1995; Guilherme et. al., 2001). Na teoria do *homúnculo imunológico* postulou-se que as células T e B autorreativas, bem como os autoanticorpos formariam uma rede interconectada que apresentam a capacidade de regulação e manutenção da homeostase (Cohen et. al., 1991). Ainda segundo esta teoria, o repertório de linfócitos autorreativos

envolvidos na autoimunidade fisiológica seria dirigido a três classes principais de autoantígenos dominantes: moléculas da resposta imune, moléculas de manutenção e moléculas tecido-específicos (Schwartz et. al., 2000). Aqui, destacamos dois autoantígenos homunculares estudados neste trabalho: a miosina cardíaca (tecido-específico) e proteína de choque térmico 60 (Hsp60, molécula de manutenção). Esses mesmos pesquisadores observaram que o padrão global de autoanticorpos foi capaz de diferenciar um estado fisiológico do patológico nos sistemas murinos e humanos e, também predizer a susceptibilidade para diabetes tipo I em camundongo NOD (Quintana et. al., 2004a; Quintana et. al., 2004b; Cohen IR, 2007). A autoimunidade poderia resultar em tolerância ou em resposta imune patológica dependendo da susceptibilidade genética do indivíduo e, dos mecanismos pelos quais os autoantígenos são apresentados ao sistema imune, e assim como do seu contexto de reconhecimento (Malkiel et. al., 1996). No contexto do transplante, a resposta dirigida aos aloantígenos do doador é o fator desencadeador que pode modificar a autorreatividade fisiológica (Fedoseyeva et. al., 1996). Esses pesquisadores sugerem que a maior exposição de autoantígenos durante a rejeição ativa os linfócitos T e B autorreativos, podendo contribuir para maior lesão do enxerto no modelo murino de transplante cardíaco (Fedoseyeva et. al., 1999). Em nosso laboratório, também verificamos aumento da autorreatividade de células T após o transplante renal humano (Portugal et. al., 2001). Essas diferentes visões da autoimunidade abrem novos campos de investigação sobre o seu papel benéfico e sua potencial aplicação para o desenvolvimento de

estratégias terapêuticas para induzir imunorregulação em doenças autoimunes e no transplante.

Autoanticorpos, anticorpos naturais e Células B1

Os autoanticorpos são imunoglobulinas que reconhecem as moléculas do próprio organismo. Quando esses autoanticorpos são produzidos fisiologicamente, sem estímulos antigênicos externos e não apresentam ação patogênica, são denominados também de anticorpos naturais (Coutinho et. al., 1995; Haury et. al., 1997). Sabe-se que os anticorpos naturais são capazes de suprimir atividades bacterianas no início de uma infecção (Haury et. al., 1994b; Zhou et. al., 2004). Há experimentos em que os linfócitos B obtidos a partir do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos e do fígado fetal de humanos foram cultivados “in vitro”. Esses linfócitos B produziram anticorpos com capacidade de reagir não só aos antígenos endógenos, mas também aos antígenos exógenos (Mouthon et. al., 1995). Em outros experimentos foi verificado que os camundongos criados sob condições livres de patógenos, inclusive recebendo dietas ultrafiltradas e quimicamente definidas, possuem o repertório de linfócitos B semelhante ao daqueles criados em condições convencionais (Bos et. al., 1987; Haury et. al., 1997; Menezes et. al., 2003). Esses dados experimentais sugerem que os anticorpos naturais são produzidos independentemente de estímulos antigênicos externos.

Vários grupos de pesquisadores observaram que os indivíduos sadios possuem autoanticorpos que reconhecem inúmeros antígenos de tecidos

próprios (Nobrega et. al., 1993a; Haury et. al., 1994a; Mouthon et. al., 1995; Vaz, 2000). Cohen e colaboradores, mais recentemente, aplicaram recursos de bioinformática para a leitura de "*immunochips*" de aproximadamente 100 autoantígenos pré-fixados em uma membrana, sendo possível estabelecer padrões de reatividade a autoanticorpos que superam variações de diferenças individuais provenientes do *background* genético e da história imunológica do indivíduo. Essa nova abordagem possibilitou a discriminação entre o estado de saúde e do diabetes, tanto em camundongos NOD (Quintana et. al., 2004b) como em humanos (Quintana et. al., 2003). O padrão global de reatividade dos autoanticorpos tem a característica de pouca variação entre indivíduos saudáveis. No entanto, é possível detectar alterações quantitativas de autoanticorpos no soro de indivíduos, mesmo antes de desenvolver a doença (Revisado por Poletaev et. al., 2003). Vale lembrar que existem também autoanticorpos que podem ter atividade patogênica e contribuir para o desenvolvimento das doenças autoimunes (Murakami M et. al., 1997; Korganow et. al., 1999; Fields ML et. al., 2003; Martin et. al., 2004).

A subpopulação de linfócitos B conhecida como B-1 tem sido descrita como produtora de anticorpos naturais (Boes, 2000). Essas células surgem na fase precoce da ontogenia, no fígado fetal e na medula óssea e em camundongos adultos, são encontrados principalmente nas cavidades pleural e peritoneal (Hayakawa et. al., 1999). Outra subpopulação de linfócitos B residentes da zona medular do baço, que possui a capacidade de interagir com células dendríticas foliculares, também tem sido citada na

literatura como produtora de anticorpos naturais (Ferguson et. al., 2004; Bayry et. al., 2005; Mauri et. al., 2008). Estima-se que, *in vivo*, 5 a 15% dos linfócitos B ativados no baço sejam produtores de anticorpos naturais (Holmberg et. al., 1986). Os mecanismos de ativação e seleção desses linfócitos B autorreativos ainda são controversos, porém há dados da literatura nos quais é sugerido que a interação anti-idiotípica (Lundkvist et. al., 1989) e o reconhecimento de autoantígenos (Haury et. al., 1997; Hardy et. al., 2001) sejam fatores importantes na geração desses anticorpos.

Citocinas que atuam na mudança de isotipo de anticorpo

Os linfócitos B são ativados pelos sinais provenientes da ligação do antígeno ao receptor de células B e dos sinais coestimulatórios dos linfócitos T auxiliares (Abbas et. al., 2005). Quando ativados, os linfócitos B sofrem a mudança do isotipo IgM para o isotipo IgG e, nesse processo, as citocinas do padrão Th1, como: IL-2, IFNγ e TNFβ direcionam para a produção dos anticorpos dos isotipos IgG1 e IgG3, em humanos (Spiegelberg et. al., 1991; Harriman et. al., 1993). Geralmente, esses isotipos de anticorpos estão associados às respostas antivirais, possuem capacidade de opsonização e fixam complementos. Também são fundamentais para o mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (Wong et. al., 1994). Quanto aos anticorpos IgG2, ainda há controvérsias na literatura. Alguns pesquisadores defendem que a mudança para o isotipo IgG2 seja dependente da citocina IFNγ (Baida et. al., 1999), no entanto, outros sustentam que citocina TGF-β direciona a produção de IgG2 e também de

IgA (Stavnezer, 1995). As citocinas de padrão Th2 como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 favorecem a mudança de isotipos de imunoglobulinas para o isotipo IgG4 e para IgE (Paul WE, 1994). Esses anticorpos são neutralizantes e ativadores de eosinófilos e induzem resposta de hipersensibilidade tipo I ou alérgica (MacDonald AS et. al., 2001; Kapsenberg ML, 2003). Em um trabalho recente, os autores mostraram *"in vitro"* que os linfócitos T reguladores, com alta expressão de Foxp3 e produtores de IL-10 foram capazes de induzir os linfócitos B a produzir anticorpos do isotipo IgG4 de modo dependente do contato entre as células (Satoguina et. al., 2008). Os anticorpos do isotipo IgG4 são de baixa afinidade pelas moléculas de C1q do complemento e os receptores Fc das células efetoras, portanto, acredita-se que esses anticorpos não possuam atividade inflamatória (van der Zee et. al., 1986).

Autoantígenos

Os autoantígenos do organismo também são alvos de reconhecimento do sistema imune, não só em estado patológico, mas também em indivíduos sadios. Podemos citar alguns desses autoantígenos, cuja reatividade tem sido descrita, por exemplo, a miosina cardíaca (Dunn et. al., 1991; Warraich et. al., 2000), glicolípides do músculo esquelético (Laguens et. al., 1996), colesterol LDL oxidado (Fang et. al., 2002), Grp75 (do inglês: *glucose regulated protein*) e Hsp60 (Wheeler et. al., 1995; Pockley et. al., 2005). O reconhecimento de antígenos das células endoteliais como a vimentina, actina e tubulina pelos autoanticorpos de

indivíduos transplantados tem sido associado à maior frequência de vasculopatia do enxerto ou também denominada de rejeição crônica (Wheeler et. al., 1995; Jurcevic et. al., 2001; Rose, 2005; Álvarez-Marquez et. al., 2008; Sun et. al., 2008). No entanto, outros pesquisadores levantam a discussão de que a autorreatividade também pode ter um papel importante na imunorregulação (Poletaev et. al., 2003; Cohen IR, 2007).

No presente trabalho, escolhemos dois autoantígenos - a miosina cardíaca humana (MC) e a proteína de choque térmica 60 (Hsp60) - para avaliar a resposta imune humoral no estado fisiológico e no contexto do transplante, com a finalidade de identificar padrões diferenciais de autorreatividade associados ao processo de rejeição e à condição fisiológica.

Miosina Cardíaca

A unidade contrátil do músculo é denominada de sarcômero, sendo composta de filamentos grossos e finos intercalados. O filamento fino é formado por três proteínas: actina, troponina e tropomiosina. O filamento grosso é formado pela molécula de miosina, que é uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas pesadas de peso molecular de aproximadamente 200kD, e quatro leves: duas de 27kD e duas de 20kD (Malkiel et. al., 1996). As cadeias pesadas possuem uma estrutura globular em suas extremidades denominada cabeça, e as duas cadeias pesadas formam uma dupla hélice deixando as cabeças livres na extremidade. As quatro cadeias leves se localizam na cabeça da miosina, duas em cada cabeça (Caforio et. al., 1992). Por meio da digestão enzimática é possível

fragmentar a miosina em LMM (do inglês: *Light meromyosin*) e HMM (do inglês: *Heavy meromyosin*). A porção de HMM é subdividida em fragmento S1, contendo a porção globular da molécula e o fragmento S2 está localizado entre os fragmentos S1 e LMM (Figura 1).

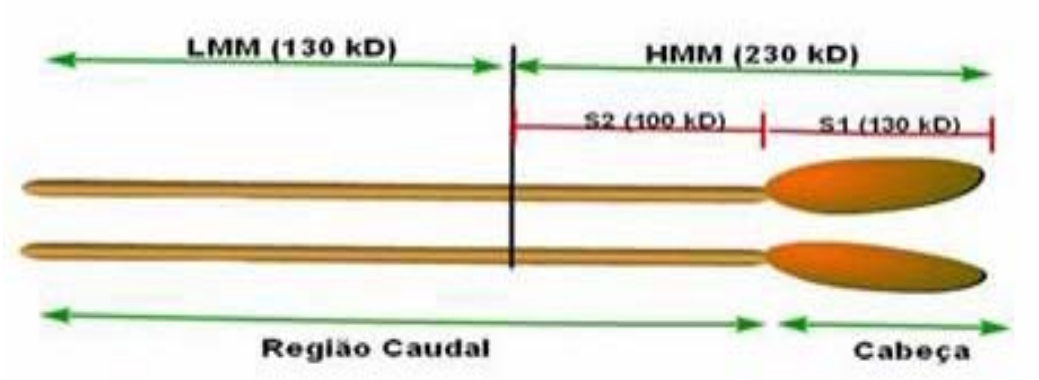


Figura 1 - Esquema estrutural das cadeias pesadas da miosina cardíaca: Cada cadeia pesada da miosina cardíaca é composta por uma região caudal e outra região globular ou cabeça. *In vitro*, as proteases fragmentam a cadeia pesada em duas porções: LMM (meromiosina leve, do inglês, *light meromyosin,* de 130 kD) e HMM (meromiosina pesada do inglês, *heavy meromyosin,* de 230 kD). A porção da HMM, por sua vez, também pode ser fragmentada em dois subfragmentos: S1 (130 kD) e S2 (100kD).

Há duas isoformas de miosina na fibra muscular, a miosina α que é específica do átrio cardíaco e isoforma β, presente no ventrículo cardíaco e músculo esquelético (Birk et. al., 1999).

Na maioria dos estudos, a reatividade dirigida à MC em indivíduos sadios foi analisada como controle do grupo de indivíduos acometidos por algum processo patológico no coração. Em nosso laboratório, Neumann e colaboradores, por meio da técnica de Western Blot, identificaram autoanticorpos que reconheciam a fração de proteína com o peso molecular de 190 a 199 kD, posteriormente confirmada corresponder à cadeia pesada

da miosina cardíaca (Neumann et. al., 1990). Em nosso laboratório, a autorreatividade à proteína e a peptídeos sintéticos da miosina cardíaca foi observada em pacientes chagásicos assintomáticos e indivíduos sadios através da técnica de imunoblot e ELISA (Cunha-Neto et. al., 1995). Em outro trabalho do grupo, além de 61% de pacientes com cardiopatia reumática grave, 20% dos indivíduos sadios também apresentaram células mononucleares do sangue periférico que proliferaram frente à proteína da MC extraída do miocárdio e válvula cardíaca humana (Guilherme et. al., 2001). A presença de autorreatividade tanto celular quanto humoral dirigida à MC nos indivíduos sadios indica que essa reatividade não é somente patológica, e que talvez exerça também alguma função na regulação da resposta imune e na manutenção da homeostase.

Nos estudos pioneiros da resposta humoral dirigida à MC, o extrato de tecido cardíaco foi utilizado como fonte antigênica para a detecção de anticorpos presentes no soro de indivíduos transplantados, por meio das técnicas de imunofluorescência direta e/ou *Western Blot*. Os pesquisadores observaram que os anticorpos reconheceram várias frações de proteína cardíaca, sendo principalmente uma proteína de 200 kD que corresponde à miosina cardíaca (Dunn et. al., 1991; Latif et. al., 1995). Dunn e colaboradores observaram que a presença de anticorpos dirigidos à proteína do extrato cardíaco no período pré-Tx estava associada ao maior número de episódios de rejeição e, no período pós-Tx, 91% (20/22) dos indivíduos transplantados foram positivos para os anticorpos IgG e/ou IgM, dos quais 55% (12/22) foram positivos somente para os anticorpos do isotipo IgM

(Dunn et. al., 1991). Latif e colaboradores observaram que os indivíduos transplantados cardíacos que tiveram forte reatividade de anticorpos do isotipo IgM dirigidos à MC, 22,5% sofriam um número significativamente maior de episódios de rejeição, e também precisaram de doses maiores de imunossupressão para a manutenção do órgão transplantado (Latif et. al., 1995).

No Brasil, Morgun e colaboradores utilizaram a proteína da miosina cardíaca de porco comercial, com 95% de homologia à MC humana, para detectar anticorpos reativos à MC no ensaio de ELISA. Eles observaram que a intensidade de reatividade desses anticorpos foi mais forte no grupo de transplantados do que nos indivíduos sadios, além disso, os pacientes que tiveram a doença de Chagas como a causa de transplante, tiveram níveis de anticorpos reativos à MC mais elevados do que o grupo com cardiopatia dilatada idiopática, isquêmica e de indivíduos sadios. Os níveis de anticorpos dirigidos à MC também estavam associados com a evolução do enxerto, sendo que os pacientes que faleceram antes de dois anos de transplante cardíaco apresentaram níveis de anticorpos reativos à MC mais elevados do que o grupo controle. Foi sugerido que esses anticorpos poderiam estar associados com a rejeição e apresentar a função patogênica no contexto do enxerto cardíaco (Morgun et. al., 2004).

Em estudo anterior, nós estudamos a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico a peptídeos sintéticos derivados do fragmento da meromiosina leve (LMM) da miosina cardíaca humana em 38 pacientes transplantados cardíacos, em diferentes momentos do pós-

transplante, comparado com 22 pacientes cardíacos da lista de espera para o transplante cardíaco. Observamos que 61% dos pacientes transplantados e 54% dos pacientes em lista de espera tinham uma resposta proliferativa a pelo menos um peptídeo, em pelo menos um dos pontos estudados. Alguns peptídeos testados estimularam proliferação celular somente no período pós-transplante, sugerindo que a resposta a alguns epítopos da miosina pode ter sido induzida depois do transplante (manuscrito em preparação).

Sabe-se que a autorreatividade pode resultar em respostas imunes tanto pró-inflamatórias quanto imunorreguladoras. Em relação à MC, na maioria dos trabalhos aponta-se o seu papel pró-inflamatório (Caforio et. al., 1997; Fedoseyeva et. al., 1999; Rolls et. al., 2002; Benichou G et. al., 2007), e a sua atividade imunorreguladora ainda não está bem estabelecida. Benichou e colaboradores mostraram que a administração de proteína da miosina cardíaca associada ao adjuvante incompleto de Freund pôde prolongar a sobrevida do transplante cardíaco alogenéico em camundongos com disparidade da MHC classe I (Fedoseyeva et. al., 2002). O aumento da sobrevida do enxerto esteve associado com a ativação de linfócitos T produtores de citocinas com perfil Th2 e redução de linfócitos T próinflamatórios produtores de IFN-γ, sugerindo uma atividade imunorreguladora induzida pela resposta imune dirigida à proteína da MC.

Proteínas de choque térmico

A proteína de choque térmico, HSP (do inglês, *Heat shock proteins*) foi descoberta por Ferruccio Ritossa e seus colaboradores (Ritossa, 1962).

Em seus experimentos com larvas de *Drosophila melanogaster,* os pesquisadores notaram que havia um aumento significativo na expressão de HSP quando essas larvas eram submetidas ao aquecimento térmico. Embora o termo proteínas de estresse seja usado comumente como sinônimo de HSP, elas incluem não só as famílias de HSP, mas também as GRPs (do inglês, *glucose-regulated proteins*) e ubiquitina (Moseley, 2000). As HSPs são agrupadas de acordo com o seu peso molecular aproximado, havendo, atualmente, mais de 10 famílias de HSPs conhecidas, como por exemplo, as Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp 60, Hsp 40 e as Hsps de baixo peso molecular (Pockley, 2003).

As HSPs são moléculas conservadas filogeneticamente e consideradas como eficientes imunogênicos. Por isso, essas proteínas têm sido apontadas como alvo de reconhecimento cruzado após a resposta a antígenos de microorganismos nas infecções, induzindo autoimunidade patológica (Lamb et. al., 1989). Também é atribuída às Hsps uma função de ligação entre imunidade inata e adaptativa, não só ativando a resposta imune, mas também com a capacidade de regular negativamente as respostas inflamatórias, como foi observado em modelo experimental de artrite adjuvante (van der Zee et. al., 1998; Wendling et. al., 2000; van Eden et. al., 2000) e diabetes mellitus tipo I, em humanos (Raz et. al., 2001; Cohen, 2002).

As HSPs são proteínas tipicamente intracelulares, consideradas como “chaperonas” que têm a função de se ligar e carrear peptídeos, evitando a agregação protéica durante o processo da montagem e translocação das

proteínas (Srivastava, 2002). No entanto, são expressas na superfície de células e/ou liberadas para o meio extracelular sob qualquer situação de estresse, como inflamação, aumento de temperatura, hipóxia, radiação ultravioleta, isquemia, privação de glicose, infecção e exposição a substâncias tóxicas, neoplasias e outros (Schett et. al., 1995; Pockley, 2003). Essa forma solúvel da HSP tem a capacidade de interagir com as células apresentadoras de antígenos através das moléculas CD14, CD40, CD91, TLR e LOX-1, levando à endocitose e apresentação cruzada (*cross*-priming) dos peptídeos por elas carreados, em moléculas de MHC de classe I para os linfócitos T CD8. Uma pequena quantidade de complexos peptídeos pode entrar nos endossomos e ser apresentada por MHC-II para linfócitos T CD4 (Binder et. al., 2000; Delneste et. al., 2002). Outros pesquisadores observaram que a proteína inteira da Hsp60 cultivada "in vitro" com as células B virgens de ratos, se liga ao TLR4 e sinaliza via MyD88 para ativar os fatores de transcrição nuclear. Essas células B ativadas têm a expressão de moléculas coestimuladoras aumentada e produzem, preferencialmente, as citocinas IL-10 e IL-6. Observou-se também que esses linfócitos B foram capazes de induzir os linfócitos T alorreativos a produzir citocinas do padrão Th2 (Cohen-Sfady et. al., 2005).

Vários grupos de pesquisadores relataram autorreatividade celular e humoral às HSPs em indivíduos sadios (Munk et. al., 1989; Filion et. al., 1996; Pockley et. al., 1998; bulafia-Lapid et. al., 2003; Danke et. al., 2004). Em nosso grupo, observamos que 90% e 55% dos indivíduos sadios analisados tiveram respostas proliferativas de linfócitos T à Hsp60 e Hsp70,

respectivamente (Granja, 2000). Observamos também que as células mononucleares de sangue periférico estimuladas com Hsp60 foram capazes de produzir citocinas IL-10 em humanos (Caldas, 2005), assim como em três linhagens de camundongos saudáveis de diferentes MHC (Luna et.al., 2007). No Brasil, Gerbase de Lima e colaboradores detectaram anticorpos que reconheceram a Hsp65 de micobactéria no soro de voluntários sadios e pacientes transplantados cardíacos, sendo a reatividade de menor intensidade foi observada no grupo de sadios. Os autores sugerem que a resposta dirigida à Hsp65 de micobactéria pode levar à reatividade cruzada por mimetismo molecular e contribuir para a rejeição do coração transplantado (Morgun et. al., 2004).

Currie e colegas descreveram, pela primeira vez, o aumento da expressão da Hsp70 no aloenxerto do transplante cardíaco em ratos, e observaram que o procedimento cirúrgico e o tempo de isquemia de reperfusão também são fatores que aumentam a expressão desta proteína de estresse (Currie, 1987). Nos primeiros trabalhos sobre as HSPs no contexto do transplante, os linfócitos T isolados do aloenxerto cardíaco de camundongos, quando estimulados com a Hsp65 apresentada pelas células apresentadoras de antígenos do doador irradiadas, observou-se um aumento da proliferação desses linfócitos T (Moliterno et. al., 1995). Em outro experimento de alotransplante cardíaco em murinos, foi possível observar a expressão aumentada de várias Hsp no grupo de alotransplante, entre elas Hsp60, Hsp72, grp78 e grp96. Quando analisada a cinética da expressão de Hsp ao longo do transplante, esses pesquisadores

observaram que a expressão aumentada de Hsp parecia estar relacionada com o processo de rejeição (Qian et. al., 1995).

Em humanos, a Hsp65 de micobactéria induziu a proliferação de linfócitos obtidos de biópsias endomiocárdicas de pacientes transplantados cardíacos, e o maior índice de proliferação correlacionou-se com a rejeição do enxerto (Moliterno et. al., 1995). Nosso grupo avaliou, sequencialmente, a resposta celular anti-Hsp60 humana, no sangue periférico de 36 pacientes transplantados renais. Os resultados sugerem a coexistência de sub-populações funcionalmente distintas de linfócitos T reativas às Hsp60 humana, que poderiam ter uma participação durante o processo de rejeição, seja amplificando ou regulando-o negativamente (Granja et. al., 2004). Em outro trabalho do grupo realizado com células mononucleares tanto periféricas quanto infiltrantes de enxerto renal humano, observou-se uma alta frequência de células produtoras de IL-10 em resposta à Hsp60 inteira, ao fragmento C-terminal e a alguns peptídeos da Hsp60 (Caldas, 2005). Nessa linha de pesquisa em modelos murinos, observamos que com a imunização com o peptídeo p277 da região C-terminal da Hsp60 por via intranasal foi possível aumentar a sobrevida do enxerto dos transplantes alogenéicos de pele e de coração vascularizado em camundongos BALB/c (Luna et. al., 2007).

Os dados da literatura, até o presente momento, apontam para a participação de linfócitos T reativos à Hsp com perfil imunorregulador no contexto da inflamação, reforçando a hipótese de que a autorreatividade à

Hsp60 possa ter um papel importante no complexo processo de manutenção da homeostase do organismo.

Transplante cardíaco

O sistema imune de um indivíduo submetido a um transplante alogenéico não só responde às moléculas MHC (do inglês: *Major Histocompatibility Complex*) do doador, mas também às proteínas não polimórficas do enxerto (Rose, 2005). Essas proteínas são conhecidas como autoantígenos e apresentam algumas características comuns: I) são proteínas compartilhadas entre doador e receptor, II) são crípticas em condições fisiológicas, III) são expostas ao sistema imune apresentadas no contexto MHC das células apresentadoras de antígenos do receptor (Fedoseyeva et. al., 2005). Para o presente estudo, escolhemos dois autoantígenos: a miosina cardíaca que é específica do tecido cardíaco, e a Hsp60 que tem uma expressão aumentada em processos inflamatórios.

O transplante cardíaco é a última opção terapêutica utilizada para restabelecer as funções hemodinâmicas perdidas devido às doenças cardíacas no estágio terminal. Apesar dos avanços na técnica cirúrgica e das novas terapias imunossupressoras, a rejeição continua sendo a principal limitação para o sucesso do transplante alogenéico. Segundo o registro do *ISHLT* (*International Society for Heart and Lung Transplantation*) realizado entre o período de junho/2000 a julho/2006, aproximadamente 80.000 pacientes transplantados cardíacos de todo o mundo, 12% de óbitos ocorreram por rejeição aguda no primeiro ano de transplante, e após cinco

anos, 33% dos pacientes morreram de vasculopatia do enxerto, anteriormente denominada de rejeição crônica (Taylor et. al., 2008). Além disso, as complicações decorrentes do transplante como: hipertensão, diabetes, disfunção renal e neoplasias, também são frequentes em pacientes com longo tempo de transplante (Ozduran V et. al., 2005; Roussel et. al., 2008). É possível que os mecanismos imunológicos envolvidos nessas doenças possam também contribuir para a progressão da vasculopatia, resultando na perda do enxerto (Pascual et. al., 2002; Fehr T et. al., 2004; Rahmani et. al., 2006).

A rejeição pode ser definida como a deterioração funcional e estrutural do enxerto por mecanismos imunológicos e não imunológicos (Lechler et. al., 2003) . Considerando o componente imunológico envolvido no processo, a rejeição pode ser classificada em dois principais grupos: celular ou humoral. Destacamos que componentes humoral e celular podem atuar conjuntamente no processo de rejeição do aloenxerto (Stewart et. al., 2005).

Na rejeição do transplante, os linfócitos T do receptor reconhecem os aloantígenos no contexto da molécula MHC, seja na APC (do inglês: *Antigen Presenting Cells*) do doador - via direta de alorreconhecimento, ou seja, na APC do próprio receptor – via indireta de alorreconhecimento (Huston, 1997; Lechler et. al., 2003). Nesse processo de alorreconhecimento há cooperação entre os linfócitos T e B por meio da produção de citocinas e pela expressão de moléculas coestimuladoras, resultando na ativação de ambos os linfócitos (Bernard et. al., 2005). Outras células inflamatórias também são recrutadas,

amplificando a inflamação (Rose et. al., 1989) e levando à ativação dos sistemas do complemento e da coagulação no órgão transplantado, podendo culminar em trombose vascular e necrose tecidual (Wecker et. al., 1992).

Há evidências na literatura sobre a participação dos linfócitos B no processo da rejeição, como mostra os trabalhos seguintes: em um experimento de alotransplante cardíaco heterotópico e vascularizado, observou-se que a rejeição foi mais precoce nos camundongos com linfócitos B eficientes na apresentação dos antígenos, do que em camundongos com deficiência da molécula MHC classe II nos linfócitos B. Os autores sugerem que a ausência da apresentação de antígeno mediado pelos linfócitos B, interrompe a progressão da ativação do linfócito T CD4 e também a produção de anticorpos alorreativos (Noorchashm H et. al., 2006). Na prática clínica, a rejeição humoral é considerada de difícil tratamento, porque é resistente às terapias imunossupressoras convencionais com inibidores de calcineurina e azatioprina, e requer tratamentos mais específicos (Eisen et. al., 2003; Bacal et. al., 2003). É discutido também que a presença de anticorpos dirigidos a aloantígenos nos indivíduos transplantados, mesmo em indivíduos assintomáticos de rejeição aguda, pode contribuir para o desenvolvimento de vasculopatias do transplante (Uber et. al., 2007).

Neste trabalho, analisamos os padrões de autoanticorpos no estado fisiológico e no contexto do transplante cardíaco, comparando os indivíduos antes e após o transplante, e também entre os momentos de diferentes estados clínicos. Os resultados deste estudo poderão contribuir para uma

compreensão mais ampla da imunobiologia do transplante cardíaco, incluindo a autorreatividade como parte deste processo. Procuramos também, através da análise comparativa da autorreatividade fisiológica e aquela no contexto do transplante, identificar epitopos da miosina cardíaca e/ou da Hsp60, cujo reconhecimento possa estar associado à imunorregulação ou ao processo de rejeição.

2. OBJETIVOS

Analisar se há um perfil diferencial na autorreatividade humoral dirigida a dois autoantígenos: miosina cardíaca e proteína de choque térmico 60 (Hsp60), no contexto fisiológico e no transplante cardíaco, e se a autorreatividade a determinados peptídeos desses antígenos está associada à rejeição ou à estabilidade do enxerto.

3 – MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Para estudar repertório de autoanticorpos reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 no estado fisiológico e no contexto do transplante, avaliaram-se os anticorpos do isotipo IgG e do IgM no soro de indivíduos transplantados cardíacos retrospectivamente e de indivíduos sadios coletados sequencialmente, por ensaio de ELISA (Figura 2).

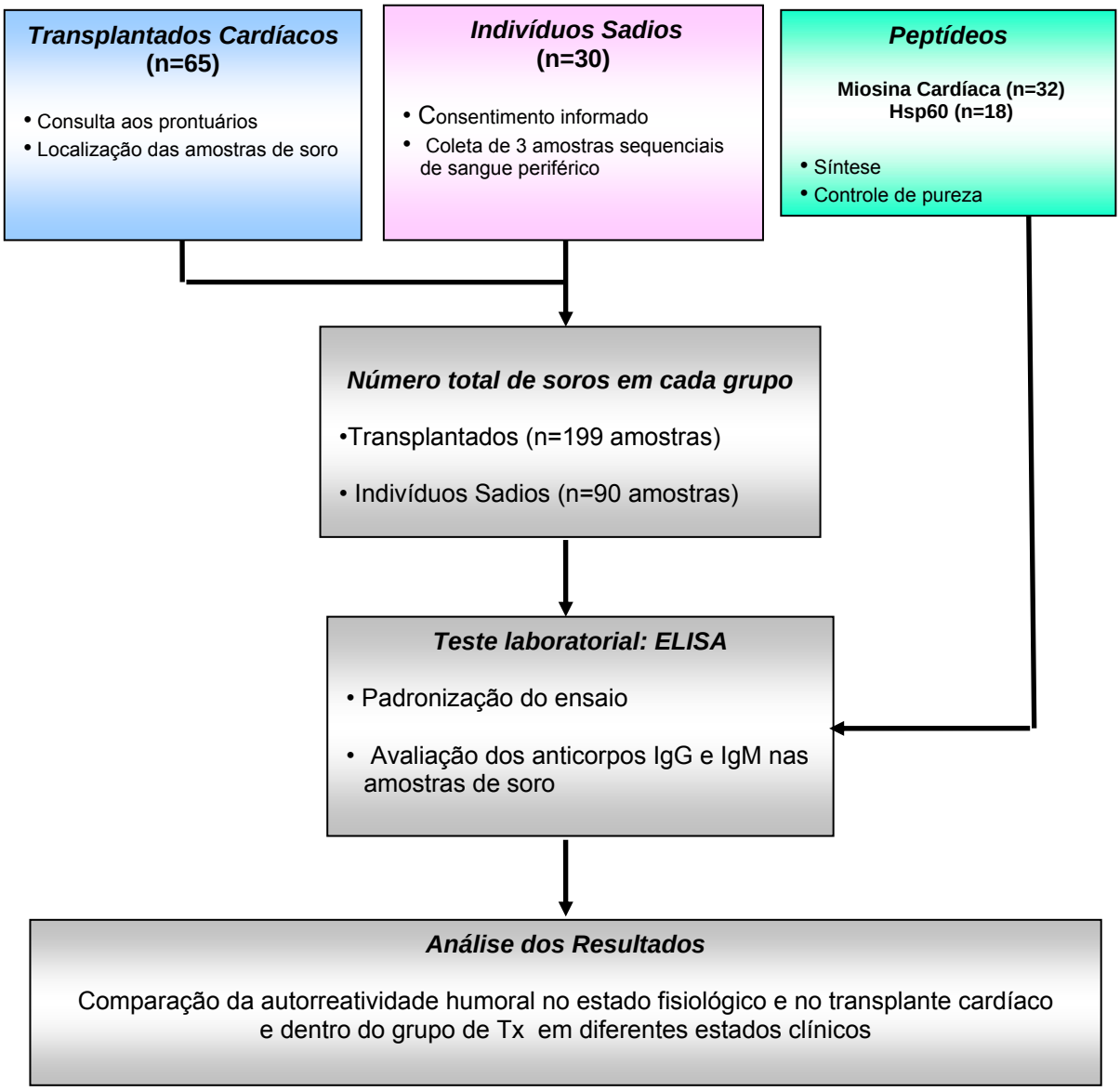


Figura 2. Delineamento Experimental: as etapas da execução do trabalho.

3.2. Comissão de ética e científica

A realização do presente trabalho foi aprovada pela Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor), processo SDC 2726/05/146, em 17 de novembro de 2005 (Apêndice 1 e 2) e, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de pesquisa número 1181/05 (Apêndice 3).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado somente no grupo de indivíduos sadios (Apêndice 4). Os indivíduos transplantados foram dispensados da assinatura do termo de consentimento, porque as amostras estudadas eram todas históricas em nosso laboratório. O uso e o armazenamento do soro procederam-se conforme as normas da resolução 347/2005 do Conselho Nacional de Saúde.

3.3. Casuística

3.3.1. Sujeitos da Pesquisa: Indivíduos Sadios

No grupo de sadios, 30 indivíduos foram incluídos no estudo, sendo 12 homens (40%) e 18 mulheres (60%), com a idade média de 35 ± 9 anos (intervalo: 23-58 anos). Os critérios de exclusão foram: história prévia de doenças autoimunes, doenças cardíacas ou qualquer tipo de infecção ou processos inflamatórios nos últimos seis meses. O perfil demográfico do grupo de indivíduos sadios está detalhado no Anexo A.

As três amostras de sangue venoso de cada indivíduo sadio foram coletadas de forma asséptica, em tubos de vácuo com capacidade para 10

ml, sem uso de anticoagulantes, com intervalos entre as coletas de seis meses.

As amostras de soro dos indivíduos sadios (n=90) foram fracionadas em alíquotas puras e diluídas (1:2) em glicerol (Merk, Darmstadt, Alemanha) tamponado, guardadas a -20º C até o momento da realização da análise.

3.3.2. Sujeitos da Pesquisa: Transplantados Cardíacos

Os indivíduos transplantados cardíacos incluídos neste trabalho pertencem ao grupo de pacientes acompanhados pelo grupo de transplante cardíaco do Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todas as amostras dos indivíduos transplantados foram separadas a partir do banco de soros do Laboratório de Imunologia desta mesma instituição, e as datas da coleta dessas amostras compreendem entre o período de 1985 a 2002. Os perfis demográfico e clínico individuais dos pacientes encontram-se no Anexo B.

O grupo de transplantados cardíacos foi composto por 65 indivíduos, sendo, 54 homens (83,1%) e 11 mulheres (16,9%), com a média das idades no momento do transplante de 43 ± 13 anos (intervalo: 11-68 anos). Quanto ao diagnóstico clínico da doença cardíaca de base, 28 pacientes (43,1%) tinham cardiopatia dilatada, 17 (26,1%) isquêmica, 10 (15,4%) chagásica, e outras cardiopatias menos frequentes (reumática, restritiva, idiopática e periparto) totalizaram 15,4% dos pacientes (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização demográfica e clínica do grupo de indivíduos transplantados cardíacos.

Dados demográficos e clínicos	65 indivíduos transplantados n	%
Sexo		
Masculino	54	83,1
Feminino	11	16,9
Idade no momento do transplante (anos)		
9 -18	5	7,7
20 - 30	4	6,2
31 - 40	15	23,1
41 - 50	23	35,4
51 - 68	16	24,6
Sem este dado	2	3,1
Doença de base: cardiopatias		
Dilatada	28	43,1
Isquêmica	17	26,1
Chagásica	10	15,4
Reumática	4	6,1
Restritiva	3	4,6
Idiopática	2	3,1
Periparto	1	1,5

Ao todo foram analisadas 199 amostras de soro dos indivíduos transplantados: 41 amostras (20,6%) do período **Pré-transplante,** 93 amostras (46,7%) **até 1 ano pós-tranplante,** 48 amostras (24,1%) de **1 a 5 anos,** 17 amostras (8,5%) **após 5 anos** de transplante. No entanto, o número de amostras por paciente foi bastante heterogêneo; a maioria dos indivíduos transplantados possuía duas ou três amostras de soros, ou seja, 26 indivíduos (40%) tinham apenas duas amostras; 20 indivíduos (30,8%) três amostras; 11 indivíduos (16,9%) quatro amostras; 4 indivíduos (6,2%)

cinco amostras; 3 indivíduos (4,6%) seis amostras e, apenas um indivíduo possuía sete amostras.

Os laudos de biópsias endomiocárdicas disponíveis no mesmo período da coleta dos soros foram obtidos através dos prontuários de pacientes e no arquivo da unidade de patologia do InCor. A classificação de rejeição seguiu os critérios do *International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT Consensus Report, Stewart et al 2005)*. Assim sendo, estudamos um total de 199 amostras; 47 amostras de soro (23,6%) tinham laudo de Sem Rejeição; 39 (19,6%) de Rejeição Aguda Leve ou Grau 1 da classificação do *ISLHT*, e 32 (16,1%) de Rejeição Aguda Moderada (RAM) ou grau 3 do *ISLHT*. Somente 11 amostras (5,5%) foram coletadas no período do diagnóstico da Doença Vascular do Enxerto (DVE), que foi realizado através do cateterismo ou ecocardiografia de estresse. Para 70 amostras (35,2%) não foram encontrados resultados de biópsias endomiocárdicas na data correspondente ao soro, sendo consideradas amostras sem rejeição; por informação da equipe clínica (Tabela 2).

Os pacientes receberam esquema tríplice de drogas imunossupressoras, que consiste em ciclosporina (nível sérico ajustado em torno de 200 ng/ml), Azatioprina (1,5 a 2,5 mg/Kg/dia) e Prednisona (0,1 a 0,3 mg/Kg/dia). O controle do processo de rejeição consistiu em pulsoterapia com Prednisona (1 mg/Kg/dia) por 4 dias e posterior redução de 0,2 mg/kg a cada 4 dias, até atingir a dose prévia de manutenção.

Tabela 2: Distribuição das amostras de soro dos indivíduos transplantados cardíacos, segundo o número de amostras por indivíduo, o tempo de transplante, e o laudo de biópsia endomiocárdica.

Variáveis		Total de 199 amostras	
		n	%
Amostras / paciente (nº. pacientes)			
2	(28)	56	28,1
3	(18)	54	27,1
4	(11)	44	22,1
5	(4)	20	10,1
6	(3)	18	9,1
7	(1)	7	3,5
Tempo de transplante			
Pré-Tx		41	20,6
Até 1 ano pós-Tx		93	46,7
1 a 5 anos pós-Tx		48	24,1
Superior a 5 anos pós-Tx		17	8,6
Tipos de rejeição			
Sem rejeição		47	23,6
Rejeição aguda leve (Grau 1 ISHLT)		39	19,6
Rejeição aguda moderada (Grau 3 ISHLT)		32	16,1
Doença Vascular do Enxerto		11	5,5
Sem laudos de biópsia		70	35,2

ISHLT – international society for heart and lung transplantation , Tx - transplante

3.4. Peptídeos

3.4.1. Síntese de Peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se a tecnologia de fase sólida com aminoácidos na forma Fmoc (Fluorenilmetilcarbonil) em sintetizador APEX-396 (Advanced Chemtech, Louisville, KY, EUA). As purificações foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão – HPLC (LC-10 AD, Shimadzu, Japão), e caracterizadas por espectrometria de massa (Ettan Maldi, Amersham Biosciences, Oxford, Reino Unido).

Os critérios internos para a liberação de peptídeos com o grau de pureza satisfatório para o uso experimental foram:

1. Haver similaridade entre o tempo de retenção do peptídeo analisado e o tempo de retenção de referência no HPLC.
2. O pico referente ao peptídeo ser uma curva Gaussiana.
3. Ter no mínimo 75% de pureza. O cálculo da pureza foi obtido dividindo-se a fração da área correspondente ao pico de peptídeo pela área total do cromatograma, expressa em percentagem.
4. Constar no espectro de massa o pico corresponde ao peso molecular esperado para aquele peptídeo.

As pequenas variações entre o peso molecular esperado e o observado são aceitáveis e, na maior parte das vezes, são devido à perda ou adição da molécula de hidrogênio ou água à cadeia peptídica, e provavelmente não interferem no ensaio de ELISA.

3.4.2. Peptídeos da Miosina Cardíaca

Os peptídeos da fração S2 da miosina cardíaca foram gentilmente cedidos por Dra. Madeleine W Cunningham (*University of Oklahoma, Health Sciences Center, Oklahoma, EUA*). A síntese foi realizada pela empresa *Genemed Synthesis* (*E.U.A.*), baseada na sequência da miosina cardíaca humana publicada por Vosberg e colaboradores (Diederich, 1989). Cada peptídeo contém 25 aminoácidos com sobreposição de 11 resíduos idênticos, exceto o peptídeo S2-32, que contém sobreposição de 22

resíduos do peptídeo anterior (Tabela 3). Todos os peptídeos da MC estudados neste trabalho têm o peso molecular próximo de 3,0 kDa.

Avaliamos pureza de todos os peptídeos da MC e, detectamos seis peptídeos (S2: 7, 10, 14, 20, 31 e 32) que não preencheram os critérios internos para a aprovação do uso experimental, portanto, esses peptídeos foram sintetizados novamente.

3.4.3. Peptídeos da Hsp60

Os peptídeos da Hsp60 foram desenhados com base na sequência de aminoácidos da proteína já publicada (Jindal et al; 1989). Utilizou-se, previamente no nosso labaratório, o programa de computação TEPITOPE-2000™ (Hammer et al, 1997; Bian 2003) para identificar as regiões da Hsp60 com maior probabilidade de ligação às diferentes moléculas HLA-DR, que seriam as moléculas apresentadoras desses peptídeos, conforme já descrito anteriormente (Caldas et al, 2006). Os 30 peptídeos desenhados, inicialmente, cobriram 85% da molécula da proteína, no entanto, devido a dificuldades técnicas na síntese, conseguiu-se sintetizar somente 18 peptídeos, que cobrem 55% da proteína da Hsp60 (Anexo C). A maioria dos peptídeos da Hsp60 estudados neste trabalho contém 20 aminoácidos, exceto cinco peptídeos: I-4 (21 a.a.), I-5 e C8 (23 a.a.) e N7 e p277 (24 a.a.), e o peso molecular dos peptídeos é de aproximadamente 2,0 kDa (Tabela 4).

Tabela 3: Sequência de aminoácidos, localização dos resíduos e peso molecular dos peptídeos da miosina cardíaca estudados no presente trabalho.

Peptídeos	Seqüência de aminoácidos	Localização	Peso Molecular (kDa)
S2-1	SAEREKEMASMKEEFTRLKEALEKS	842-866	2,958
S2-2	FTRLKEALEKSEARRKELEEKMVSL	856-880	3,021
S2-3	RKELEEKMVSLLQEKNDLQLQVQAE	870-894	2,999
S2-4	KNDLQLQVQAEQDNLADAEERCDQL	884-908	2,887
S2-5	LADAEERCDQLIKNKIQLEAKVKEM	898-922	2,916
S2-6	KIQLEAKVKEMNERLEDEEEMNAEL	912-936	3,018
S2-7	LEDEEEMNAELTAKKRKLEDECSEL	926-950	2,953
S2-8	KRKLEDECSELKRDIDDLELTLAKV	940-964	2,960
S2-9	IDDLELTLAKVEKEKHATENKVKNL	954-978	2,879
S2-10	KHATENKVKNLTEEMAGLDEIIAKL	968-992	2,796
S2-11	MAGLDEIIAKLTKEKKALQEAHQQA	982-1006	2,765
S2-12	KKALQEAHQQALDDLQAEEDKVNTL	996-1020	2,836
S2-13	LQAEEDKVNTLTKAKVKLEQQVDDL	1010-1034	2,856
S2-14	KVKLEQQVDDLEGSLEQEKKVRMDL	1024-1048	2,958
S2-15	KVKLEQQVDDLERAKRKLEGDLKLT	1038-1062	3,027
S2-16	KRKLEGDLKLTQESIMDLENDKQQL	1052-1076	2,973
S2-17	IMDLENDKQQLDERLKKKDFELNAL	1066-1090	3,047
S2-18	LKKKDFELNALNARIEDEQALGSQL	1080-1104	2,844
S2-19	IEDEQALGSQLQKKLKELQARIEEL	1094-1118	2,910
S2-20	LKELQARIEELEEELESERTARAKV	1108-1132	2,970
S2-21	LESERTARAKVEKLRSDLSRELEEI	1122-1146	2,958
S2-22	RSDLSRELEEISERLEEAGGATSVQ	1136-1160	2,761
S2-23	LEEAGGATSVQIEMNKKREAEFQKM	1150-1174	2,825
S2-24	NKKREAEFQKMRRDLEEATLQHEAT	1164-1188	3,059
S2-25	LEEATLQHEATAAALRKKHADSVAE	1178-1202	2,690
S2-26	LRKKHADSVAELGEQIDNLQRVKQK	1192-1216	2,904
S2-27	QIDNLQRVKQKLEKEKSEFKLELDD	1206-1230	3,074
S2-28	EKSEFKLELDDVTSNMEQIIKAKAN	1220-1244	2,881
S2-29	NMEQIIKAKANLEKMCRTLEDQMNE	1234-1258	2,981
S2-30	MCRTLEDQMNEHRSKAEETQRSVND	1248-1272	3,008
S2-31	KAEETQRSVNDLTSQRAKLQTENGE	1262-1286	2,833
S2-32	ETQRSVNDLTSQRAKLQTENGELSR	1265-1289	2,861

S2- Região S2 da cadeia pesada da miosina cardíaca (figura 1) ; kDa – kilo Dalton

Tabela 4. Sequência de aminoácidos, localização dos resíduos na região da proteína da Hsp60 humana e os pesos moleculares dos peptídeos analisados no presente estudo.

Peptídeos	Seqüência de aminoácidos	Localização	Peso Molecular (kDa)
N-terminal			
N2	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD	16-35	2,228
N3	KFGADARALMLQGVDLLADA	31-50	2,075
N4	LLADAVAVTMGPKGRTVIIE	46-65	2,054
N6	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA	76-95	2,135
N7	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG	87-110	2,619
N10	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL	136-155	2,165
Intermediária			
I 2	YISPYFINTSKGQKCEFQDA	223-242	2,339
I 4	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN	269-289	2,209
I 5	TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD	285-307	2,394
I 6	GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH	321-340	2,082
I 8	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ	353-372	2,257
I 9	QEIIEQLDVTTSEYEKEKLN	372-391	2,409
C-terminal			
p277	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED	437-460	2,390
C3	PALDSLTPANEDQKIGIEII	449-468	2,137
C4	GIEIIKRTLKIPAMTIAKNA	464-483	2,181
C8	PTKVVRTALLDAAGVASLLTTAE	521-543	2,297
C9	LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM	539-558	2,186
C10	KDPGMGAMGGMGGGMGGGMF	554-573	1,803

kDa – kilo Dalton

3.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.5.1. Procedimento do ELISA Padronizado

As placas de 96 poços, com alta ligação para ELISA (Costar 3369, Corning, New York, NY, EUA), foram usadas para a sensibilização com os peptídeos sintéticos da miosina cardíaca ou da Hsp60, diluídos previamente em tampão bicarbonato-carbonato 0,05 M pH 9,6 (Merk, Darmstadt,

Alemanha) a uma concentração de 4 µM e aplicados em um volume de 100 µl por poço, conforme a padronização prévia (Anexo D). As placas foram incubadas por 1 hora a 37^0C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,1%) na lavadora de placas (Skan Washer 300, Skatron, Maryland, EUA) e bloqueadas com gelatina 2,5% (Porcine Skin gelatin, G-2625, Sigma, Steinhein, Alemanha) por uma hora a 37^oC. Os soros foram diluídos, previamente, na proporção de 1/100 em tampão PBS e aplicaram-se 100 µl/poço, incubando-se por 24 horas, a 4^oC. Após a lavagem das placas, foi adicionado o conjugado anti-IgG total humana (lote 9839, Sang Stat, Menlon Park, CA, EUA) a uma diluição de 1/30.000 ou o conjugado anti-IgM humana (lote A-4290, Sigma, Steinhein, Alemanha), diluído na proporção de 1/2500. As placas foram incubadas por 30 minutos, a 37^0C. Seguiu-se, então, uma nova lavagem e adição de 100 µl/poço do substrato (4mg de orto-fenilenodiamina - O.P.D. em 10 ml de tampão citrato pH= 5,0 adicionado de 4 µl de H_2O_2 30%). As placas, então foram incubadas novamente por 30 min a 37^0C. A reação foi bloqueada com 50 µl de H_2SO_4 a 2N, e a leitura realizada em leitor de ELISA (µ Quant, Bio-Tek, CA, EUA) a um comprimento de onda de 490 nm.

3.5.2. Controles Utilizados no ELISA

Em todos os ensaios, foram incluídos em cada placa os seguintes controles:

Controle negativo: os poços sensibilizados com o peptídeo S2-10 e testados contra “pool” de soros não reagentes a este peptídeo.

Controle positivo: os poços sensibilizados com o peptídeo S2-10 e testados contra “pool” de soros reagentes a este peptídeo.

Controle do conjugado: os poços sensibilizados com o peptídeo específico, no entanto, sem adição de soro, para a determinação de eventuais ligações inespecíficas do conjugado a algum componente do sistema.

Controle Imunoglobulina: Os poços foram sensibilizados com IgG ou IgM monoclonais humanas (1 µg/poço), que funcionam como controles positivos e servem também para checar a qualidade de ligação do conjugado.

Controle anti-gelatina: Para verificar se os soros estudados tinham anticorpos dirigidos à gelatina (componente da solução usada para bloqueio do sistema), as placas foram sensibilizadas com uma solução de gelatina, e após o tempo de incubação e a lavagem da placa, foram adicionadas as amostras de soro ao sistema. As densidades óticas acima de 0,1 foram descontadas do resultado bruto com os peptídeos para se obter os resultados livres de ligações inespecíficas.

3.5.3. Valores de referência para a validação do ensaio

O estabelecimento de intervalos de referência é útil para minimizar as variações interensaios. Nesse trabalho, os intervalos foram obtidos por meio do cálculo da média de D.Os. de cada controle, em 68 ensaios distintos com o peptídeo S2-10 +/- dois desvios padrão (Tabela 5). O ensaio era repetido quando qualquer um dos controles não fosse satisfatório.

Tabela 5: Valores de referência para validação do teste de ELISA.

Controles	Média (DO)	Intervalo de Referência (DO) Média ± 2 dp
Branco	0,060	< 0,060
Conjugado	-	Próximo ao zero
Controle Positivo	1,263	0,987 – 1,539
Controle Negativo	0,174	0,089 – 0,259
IgG monoclonal	1,981	1,562 – 2,436
IgM monoclonal	2,040	1,680 – 2,400

DO = densidades ópticas dp = desvios padrão

3.5.4. Ponto de Corte para ELISA

A partir da média das reatividades do isotipo IgM de 289 amostras de soros contra a gelatina, acrescentadas de dois desvios padrão (0,088 + 0,084), encontrou-se o valor de 0,172. Este valor foi arredondado para 0,170 e usado como o ponto de corte do ensaio de ELISA, indicativo de ligações inespecíficas do sistema.

3.6. Análise Estatística

Para a análise estatística foram utilizados os programas Microsoft Office Excel, versão 2003 para gerenciamento do banco de dados, e o programa *Graph Pad Prisma* versão 4 para execução dos cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos.

As variáveis categóricas foram apresentadas como números absolutos e relativos, e as variáveis contínuas apresentadas como média e desvio-

padrão ou mediana e valores máximos e mínimos, conforme a normalidade da distribuição da amostra avaliada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*.

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* ou teste exato de *Fisher* (quando n < 40).

As variáveis contínuas dependentes com distribuição normal foram comparadas através do teste T pareado e, o teste não paramétrico de *Wilcoxon* para as amostras que não apresentaram distribuição normal.

Para a análise das variáveis contínuas independentes com distribuição normal, aplicou-se o teste *t de Student*, e para as amostras que não seguiram essa distribuição, utilizou-se o método não paramétrico de *Mann Whitney* para as duplas comparações e, *Kruskal Wallis* para as múltiplas comparações. O nível de significância adotado para todas as análises realizadas neste trabalho foi de 0,05.

4 - RESULTADOS

4.1. Autorreatividade humoral fisiológica

Com o objetivo de conhecer o padrão da autorreatividade humoral fisiológica, avaliamos três amostras sequenciais de soro de 30 indivíduos saudáveis (n=90). Os resultados foram organizados nos seguintes tópicos: I) frequência de indivíduos reativos, II) intensidade de reatividade dos anticorpos, III) número de peptídeos reconhecidos individualmente, e por fim, IV) variabilidade da autorreatividade humoral ao longo do tempo.

4.1.1. Frequência de indivíduos sadios reativos à miosina cardíaca e à Hsp60

Para a análise da frequência, considerou-se que o indivíduo é reativo a um determinado peptídeo quando pelo menos uma das três amostras de soro deste indivíduo teve reatividade superior ao ponto de corte (D.O. >0,170).

Todos os indivíduos sadios analisados tiveram autoanticorpos dirigidos a pelo menos um peptídeo da MC e/ou Hsp60 testado (Tabela 6). Observamos que a proporção de indivíduos que reconheceu mais de 30% dos peptídeos da MC foi significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgM (86,6%, 26/30) do que o isotipo IgG (6,7%, 2/30), p=0,0001. Entretanto, para os autoanticorpos dirigidos à Hsp60, as proporções de indivíduos reativos a mais de 30% dos peptídeos foram iguais em ambos os isotipos de anticorpos (30%, 9/30).

Tabela 6 – Quantidade de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos por indivíduos sadios.

Indivíduos sadios (n = 30)	QUANTIDADE DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS							
	Miosina Cardíaca (n=32)				Hsp60 (n=18)			
	Nº. (%)				Nº. (%)			
	IgG		IgM		IgG		IgM	
1	2	(6,3)	**27**	**(84,4)**	0		**6**	**(33,3)**
2	6	(18,8)	**15**	**(46,9)**	2	(11,1)	3	(16,7)
3	6	(18,8)	7	(21,9)	4	(22,2)	5	(27,8)
4	4	(12,5)	**11**	**(34,4)**	3	(16,7)	0	
5	1	(3,1)	**13**	**(40,6)**	**12**	**(66,7)**	0	
6	6	(18,8)	**23**	**(71,9)**	2	(11,1)	4	(22,2)
7	8	(25,0)	**23**	**(71,9)**	3	(16,7)	5	(27,8)
8	2	(6,3)	**14**	**(43,8)**	4	(22,2)	2	(11,1)
9	8	(25,0)	**11**	**(34,4)**	3	(16,7)	2	(11,1)
10	6	(18,8)	9	(28,1)	2	(11,1)	2	(11,1)
11	8	(25,0)	**13**	**(40,6)**	**7**	**(38,9)**	1	(5,6)
12	3	(9,4)	**16**	**(50,0)**	2	(11,1)	1	(5,6)
13	**12**	**(37,5)**	**16**	**(50,0)**	**8**	**(44,4)**	2	(11,1)
14	7	(21,9)	**12**	**(37,5)**	**9**	**(50,0)**	5	(27,8)
15	8	(25,0)	**24**	**(75,0)**	1	(5,6)	**10**	**(55,6)**
16	**14**	**(43,8)**	**11**	**(34,4)**	**7**	**(38,9)**	**7**	**(38,9)**
17	6	(18,8)	**12**	**(37,5)**	**11**	**(61,1)**	**12**	**(66,7)**
18	2	(6,3)	**17**	**(53,1)**	2	(11,1)	**7**	**(38,9)**
19	6	(18,8)	**18**	**(56,3)**	3	(16,7)	**8**	**(44,4)**
20	3	(9,4)	**19**	**(59,4)**	**6**	**(33,3)**	**6**	**(33,3)**
21	2	(6,3)	**16**	**(50,0)**	0		**7**	**(38,9)**
22	5	(15,6)	**18**	**(56,3)**	**8**	**(44,4)**	5	(27,8)
23	5	(15,6)	**18**	**(56,3)**	1	(5,6)	3	(16,7)
24	4	(12,5)	**15**	**(46,9)**	4	(22,2)	2	(11,1)
25	4	(12,5)	**16**	**(50,0)**	2	(11,1)	1	(5,6)
26	6	(18,8)	**14**	**(43,8)**	3	(16,7)	3	(16,7)
27	0		**13**	**(40,6)**	0		**7**	**(38,9)**
28	5	(15,6)	**15**	**(46,9)**	**6**	**(33,3)**	5	(27,8)
29	5	(15,6)	5	(15,6)	1	(5,6)	0	
30	3	(9,4)	8	(25,0)	0		1	(5,6)
Média e Desvio Padrão	**5,2±3 (16,4±9)**		**15±5 (46,8±15)**		**3,9± 3 (21,5±18)**		**4,1 ± 3 (22,6±17)**	

- Os números marcados em vermelho: reatividade ≥30% de peptídeos.
- A tabela mostra a distribuição da quantidade de peptídeos reconhecidos por cada indivíduo sadio, segundo a proteína (miosina cardíaca ou Hsp60) e isotipo de anticorpo detectado (IgG ou IgM).

Comparando as frequências de indivíduos reativos para os anticorpos IgG e IgM em cada peptídeo da MC, observamos que a frequência de

indivíduos sadios positivos para os anticorpos IgM foi significantemente maior do que para o IgG (Wilcoxon, p<0,0001). A frequência de positividade para os anticorpos IgM superior a 50% foi observada em 50% (16/32) dos peptídeos, e para o isotipo IgG, apenas 6% (2/32) dos peptídeos tiveram a mesma frequência de reconhecimento. Todos os peptídeos da MC testados foram reconhecidos por indivíduos sadios, exceto o peptídeo S2-19. Os peptídeos S2-4 e S2-30 foram mais reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG, sendo reconhecidos por 50% (15/30) e 60% (18/30) de indivíduos sadios, respectivamente. E os peptídeos S2: 1, 3, 4, 11, 25, 26,29 e 30 foram reconhecidos por anticorpos IgM de aproximadamente 90% de indivíduos sadios (Figura 3-a).

Em relação à reatividade dirigida à Hsp60, não observamos diferenças significantes entre as frequências de indivíduos positivos para os dois isotipos de anticorpos (Wilcoxon, p=0,990). Em contraste com a reatividade à MC, raros peptídeos da Hsp60 foram reconhecidos por mais de 50% de indivíduos sadios. Aqui, ressaltamos o peptídeo I-9 que foi reconhecido por anticorpos IgG de 73% dos indivíduos sadios, e os peptídeos; N7 e I-6 que foram reconhecidos por anticorpos do isotipo IgM de 50% e 70% de indivíduos sadios, respectivamente (Figura 3-b).

Os peptídeos S2:14, 20 e 22 da MC, assim como, N3 e N10 da Hsp60 foram pouco reconhecidos por autoanticorpos de ambos os isotipos, todos esses peptídeos foram reconhecidos por menos de 10% de indivíduos sadios (Figura 3).

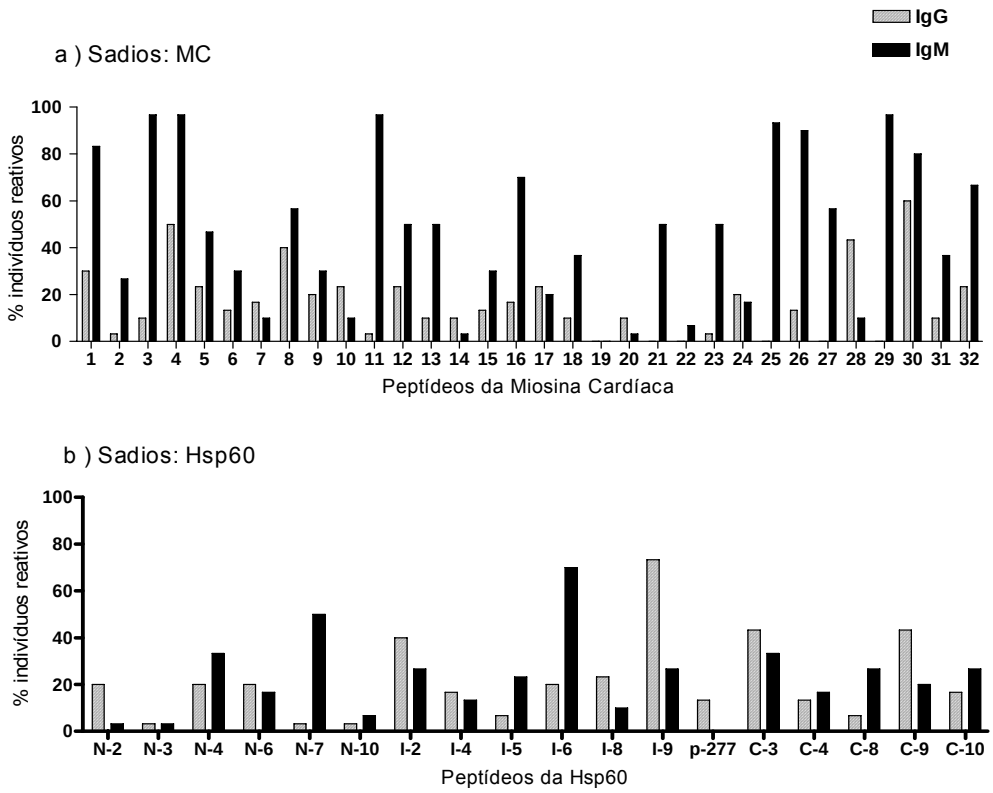


Figura 3. Frequência de indivíduos sadios positivos para os anticorpos IgG e IgM reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60: Os gráficos mostram as frequências de indivíduos sadios (n=30) que apresentaram anticorpos dos isotipos IgG e IgM dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca (a) e da Hsp60 (b). Considerou-se que o indivíduo foi reativo ao peptídeo testado, quando pelo menos uma das três amostras apresentou densidade ótica (D.O.) ≥ 0,170 por método de ELISA.

4.1.2. Intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos sadios

A reatividade dos anticorpos foi classificada em três níveis de intensidade: baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340), média (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850), e alta (D.O. > 0,850). No estado fisiológico, os autoanticorpos dirigidos aos dois autoantígenos estudados foram predominantemente de média e de baixa intensidade.

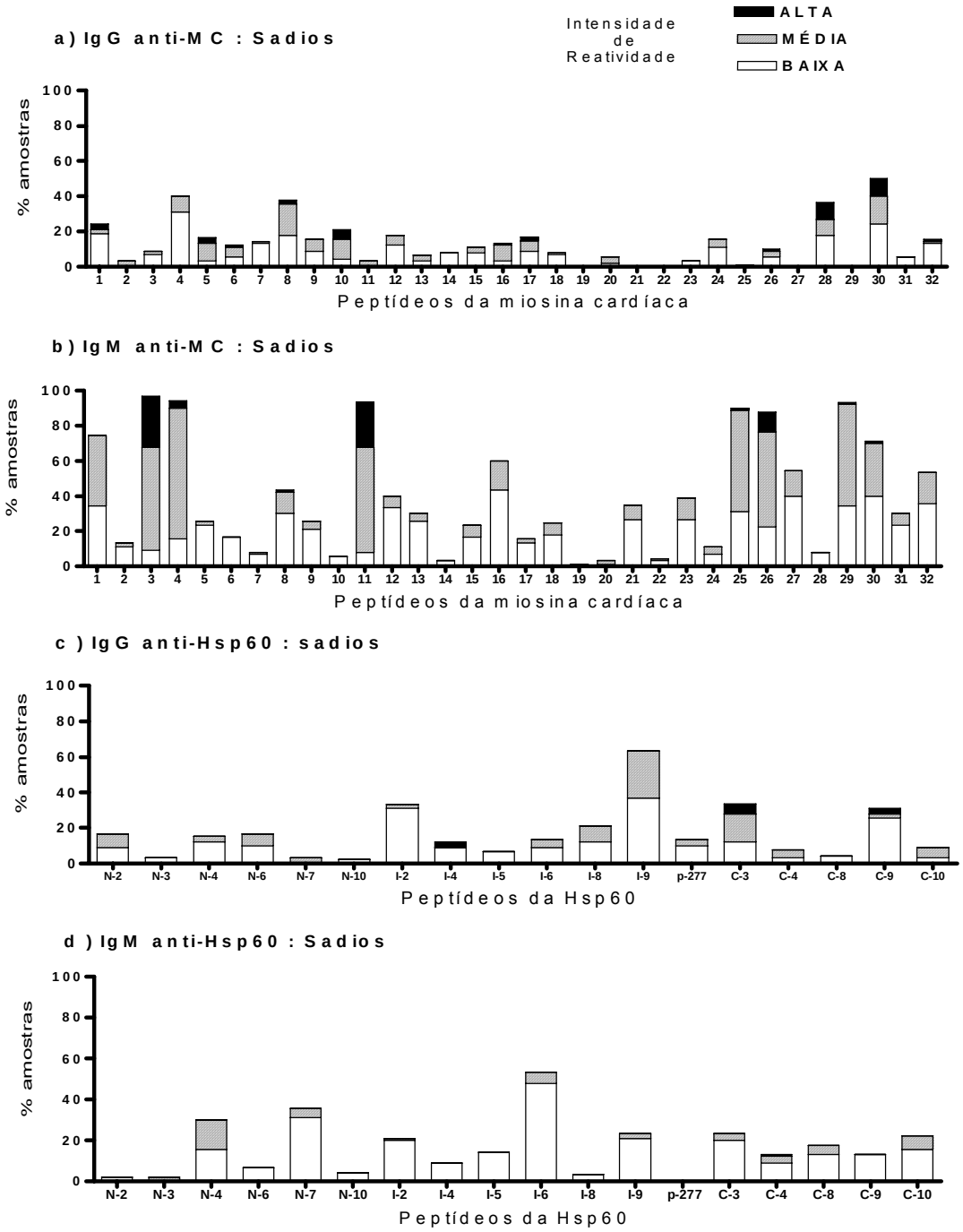


Figura 4. Frequência da intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos sadios: Porcentagem de amostras positivas em cada nível de intensidade de reatividade para os anticorpos anti-miosina cardíaca do isotipo IgG e IgM (a e b) e os anticorpos anti-Hsp60 (c e d). As amostras de soro provenientes de 3 coletas sequenciais (intervalos de 6 meses) de 30 indivíduos sadios (n=90) foram analisados por ELISA. As intensidades de reatividade em densidade óptica (D.O.) foram classificadas em: baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340), média (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e, alta (D.O. > 0,850).

Todos os 30 indivíduos sadios tiveram reatividade de baixa e/ou média intensidade contra pelo menos um peptídeo da MC ou Hsp60. Entretanto, a maioria dos indivíduos sadios (90%, 27/30) foi capaz de responder com reatividade de alta intensidade a pelo menos um antígeno analisado; sendo 23,3% (7/30) responderam com os anticorpos IgG e 46,7% (14/30) com o IgM e 20% (6/30) com ambos os isotipos de anticorpos. As reatividades de alta intensidade foram detectadas em 22% (11/50) e 10% (5/50) de todos os peptídeos estudados, para os anticorpos IgG e IgM, respectivamente. Os anticorpos IgG de alta intensidade foram dirigidos principalmente aos peptídeos S2: 28 e 30 e C3, e os anticorpos IgM dirigidos aos peptídeos S2: 3, 11 e 26. Em relação às reatividades de média intensidade, 66% (33/50) e 72% (36/50) dos peptídeos foram reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgM, respectivamente. E as reatividades de baixa intensidade foram detectadas em mais de 80% de todos os peptídeos analisados para os dois isotipos de anticorpos (Figura 4).

4.1.3. Número de peptídeos reconhecidos por indivíduos sadios

A maioria dos indivíduos sadios foi capaz de reconhecer no mínimo 30% dos peptídeos de um dos antígenos estudados, exceto quatro indivíduos (#3, 10, 29 e 30); estes reconheceram menos de 30% dos peptídeos das duas proteínas (Tabela 6).

Na comparação entre as médias de peptídeos reconhecidos, observamos que anticorpos do isotipo IgM reconheceram mais peptídeos da MC do que o isotipo IgG (15±5, intervalo: 5-27 peptídeos vs 5±3, intervalo: 0-

14 peptídeos; p<0,001). No entanto, para a reatividade dirigida aos peptídeos da Hsp60, a média de peptídeos reconhecidos foi semelhante entre os anticorpos dos isotipos IgG e IgM (3,9±3, intervalo: 0-12 peptídeos vs 4,1±3, intervalo: 0-12 peptídeos, p=0,802).

Devido ao número de peptídeos da Miosina cardíaca (32 peptídeos) ser diferente da Hsp60 (18 peptídeos), transformamos os números absolutos em números relativos de peptídeos reconhecidos para possibilitar a comparação entre as duas proteínas (Figura 5). O teste T pareado revelou que os anticorpos anti-MC do isotipo IgM reconheceram um número significantemente maior de peptídeos do que os anticorpos do isotipo IgG (p<0,001). Além disso, os anticorpos do isotipo IgM reconheceram mais peptídeos da MC do que da Hsp60 (p<0,001).

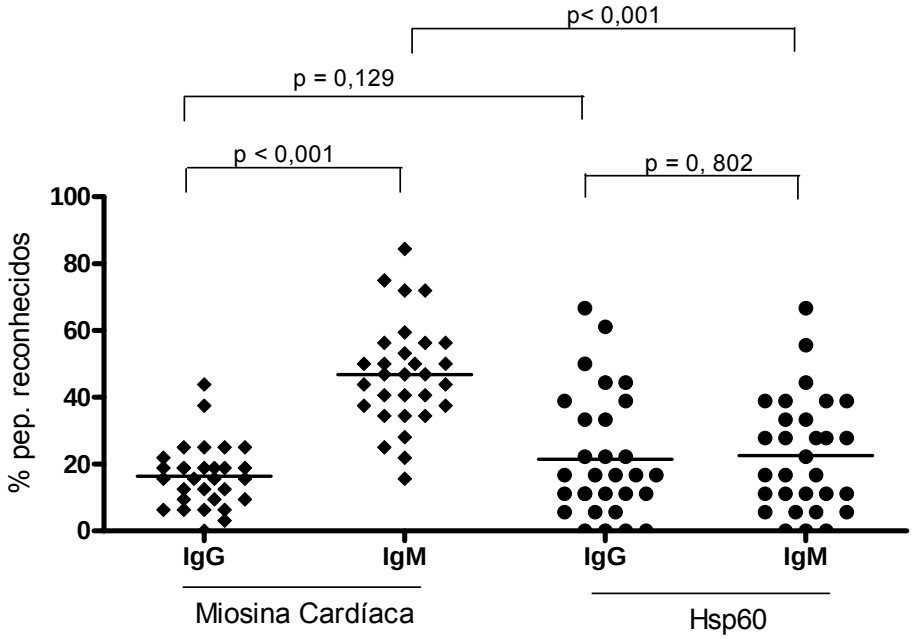


Figura 5. Porcentagens de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos indivíduos sadios: Comparação entre as porcentagens de peptídeos reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e IgM de indivíduos sadios (n=30) dirigidos aos peptídeos da Miosina cardíaca (MC, n=32) e Hsp60 (Hsp, n=18). A linha horizontal representa a média de cada variável. O teste T pareado foi usado para comparação entre os grupos. Nível de significância α=0,05.

4.1.4. Variabilidade da autorreatividade humoral fisiológica

A comparação dos números de peptídeos reconhecidos por indivíduos sadios (n=30) nos três tempos sequenciais foi feita por meio do teste Anova para medidas repetidas (Figura 6). Observou-se que não houve variação estatisticamente significante no número de peptídeos da MC e Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e do IgM no período de um ano: anti-MC IgG (p=0,308), anti-MC IgM (p=0,061), anti-Hsp60 IgG (p=0,428) e anti-Hsp60 IgM (p=0,108).

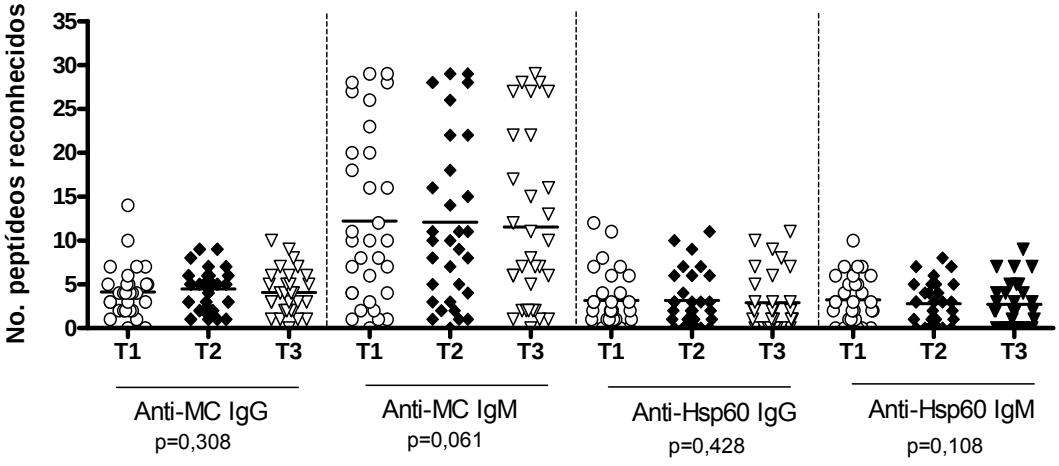


Figura 6. Número de peptídeos da miosina cardíaca e Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM de indivíduos sadios em três tempos sequenciais: Comparação do número de peptídeos da miosina cardíaca (n=32) e da Hsp60 (n=18) reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG ou IgM de 30 indivíduos sadios. A linha horizontal representa a média de cada grupo. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA para as comparações entre os 3 tempos de cada isotipo de anticorpo (α=0,05).

Usando o ponto de corte de DO= 0,170 como critério de positividade, analisamos a variabilidade ao longo do tempo, ou seja, se a amostra do indivíduo que era positiva passou a ser negativa ou vice-versa. Observamos que 93% (28/30) de indivíduos sadios tiveram variação para os anticorpos

anti-MC de ambos os isotipos. A variação foi menor para a reatividade dirigida à Hsp60, observamos 70% (21/30) e 80% (24/30) de frequência para os anticorpos IgG e IgM, respectivamente. Os dados individuais de 30 sujeitos sadios, contendo o número total de peptídeos reconhecidos e os números de peptídeos com variação da intensidade de reatividade estão apresentados segundo os isotipos de anticorpos e as proteínas no Anexo F.

Visto que muitos desses indivíduos tiveram as D.Os. das reatividades bem próximas ao ponto de corte, e que as variações do próprio teste poderiam influenciar na positividade do resultado, outra forma de análise realizada foi considerar um indivíduo positivo para a variação da intensidade de reatividade quando qualquer uma das combinações de dois tempos desse indivíduo apresentasse diferença de D.O. superior a 0,200. Esse valor foi obtido a partir do desvio padrão de 69 repetições de soro controle positivo, testado em placas distintas de ELISA. O valor do desvio padrão obtido foi de 0,138, sendo arredondado para 0,200 (valor arbitrário). Esta outra forma de análise revelou que muitos indivíduos incluídos como positivos anteriormente, tiveram variação de D.O. inferior a 0,200. As porcentagens de indivíduos obtidas nesta análise foram menores do que da análise anterior baseada em ponto de corte; assim, 30% e 53% dos indivíduos sadios tiveram variabilidade para os anticorpos dirigidos à MC do isotipo IgG e IgM, respectivamente. E para os anticorpos IgG e IgM dirigidos à Hsp60, somente 20% e 23% dos indivíduos sadios, respectivamente, tiveram variação na intensidade de autorreatividade ao longo do tempo (Figura 7).

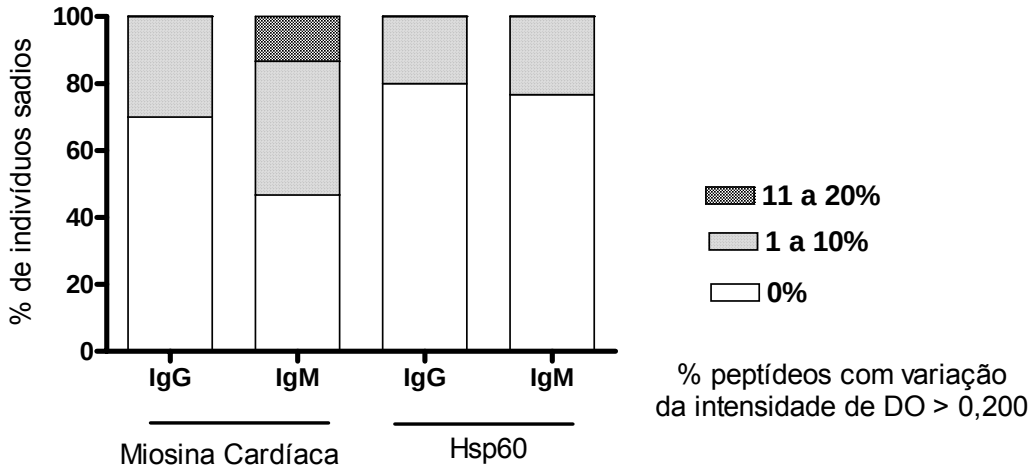


Figura 7. Distribuição da proporção de indivíduos sadios segundo às porcentagens de peptídeos com variação da intensidade de reatividade ao longo do tempo: Número relativo de indivíduos sadios em relação à porcentagem de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 com variação da intensidade de reatividade entre as amostras. Considerou-se que um indivíduo teve variação na intensidade de reatividade dos anticorpos IgG e IgM a um determinado peptídeo, se a diferença entre as D.Os. (densidade óptica) das amostras fosse maior do que 0,200.

4.2. Autorreatividade humoral no transplante cardíaco

Analisamos, conjuntamente, as reatividades dos anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos aos peptídeos da MC e Hsp60 em 65 indivíduos transplantados (n=199 amostras). Considerou-se como indivíduo positivo, quando pelo menos uma de suas amostras de qualquer período de transplante apresentou reatividade acima do ponto de corte (D.O. ≥ 0,170).

4.2.1. Frequência de indivíduos transplantados reativos à miosina cardíaca e à Hsp60

Todos os indivíduos transplantados tiveram reatividade humoral dirigida a pelo menos um peptídeo da MC e/ou da Hsp60 (Tabela 7). Os indivíduos que reconheceram mais de 30% dos peptídeos da MC foi

significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgM (80%, 52/65) do que para o IgG (49%, 32/65); (p=0,0004). No entanto, para a Hsp60, a proporção de indivíduos que reconheceram mais de 30% dos peptídeos da Hsp60 foi maior para o isotipo IgG (45%, 29/65) do que o IgM (25%, 16/65); (p=0,0264).

Com relação à reatividade dirigida aos peptídeos da MC, pôde-se observar que a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos IgM foi significantemente maior do que para os anticorpos IgG (p=0,0147). Ao analisar cada peptídeo testado, observamos que 34% (11/32) e 50% (16/32) dos peptídeos da MC foram reconhecidos, respectivamente, por anticorpos dos isotipos IgG e IgM de mais de 50% dos indivíduos transplantados. Apesar de observarmos no gráfico, vários peptídeos da Hsp60 nitidamente mais reconhecidos pelos anticorpos IgG, a comparação entre as frequências de indivíduos positivos para os dois isotipos de anticorpos não teve diferença estatisticamente significante (p=0,119). As frequências acima de 50% foram observadas para a reatividade do isotipo IgG dirigida aos peptídeos I-2, I-4, I-6 e I-9. Para anticorpos IgM, somente o peptídeos N7 foi reconhecido por mais de 50% dos indivíduos transplantados (Figura 8).

Observamos também a polarização de autoanticorpos para um dos isotipos, por exemplo, a reatividade aos peptídeos S2:10, 22 e 28 da MC e aos peptídeos N10, I-2, I-4, I-9, C4 e C9 polarizou preferencialmente para o isotipo IgG, e os peptídeos S2: 2, 11, 13, 18, 21, 25, 26 e 29 da MC e os peptídeo N7 da Hsp60 para o isotipo IgM (Figura 8).

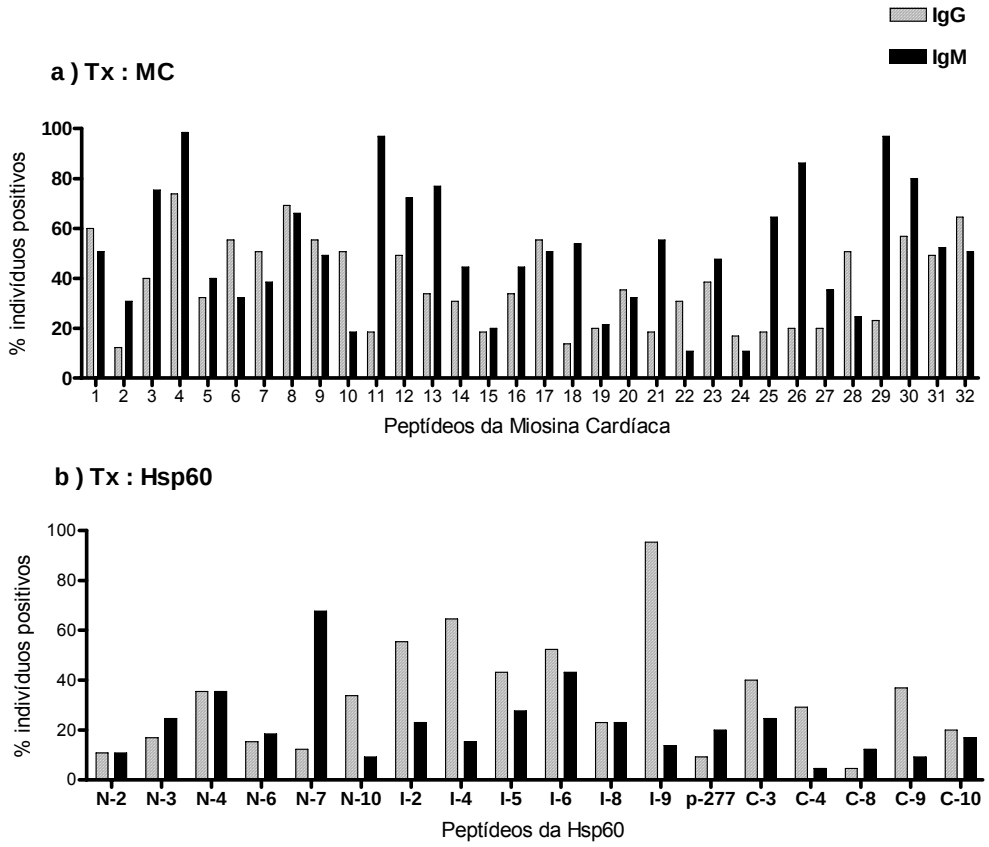


Figura 8. Frequência de indivíduos transplantados positivos para os anticorpos IgG e IgM reativos aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60: Distribuição da frequência de indivíduos transplantados (Tx, n=65) positivos para anticorpos dos isotipos IgG e IgM dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca (a) e da Hsp60 (b). Considerou-se como indivíduo positivo quando pelo menos uma amostra de qualquer período de transplante apresentou densidade ótica (D.O.) ≥ 0,170 (ELISA).

4.2.2. Intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e Hsp60 nos indivíduos transplantados

A autorreatividade humoral dirigida aos peptídeos da MC e da Hsp60 no grupo de indivíduos transplantados foi predominantemente de média e de baixa intensidade. Em comparação com os dois grupos de menor intensidade de reatividade, as reatividades de alta intensidade não foram frequentes tanto para os anticorpos dirigidos à MC quanto à Hsp60 (Figura 9). Analisando individualmente o grupo de Tx, observamos que a maioria

dos indivíduos (80%, 52/65) apresentou alta intensidade de reatividade a pelo menos um peptídeo. Entre esses indivíduos, 15,4% (10/65) reagiram somente com os anticorpos do isotipos IgG, 27,7% (18/65) com o isotipo IgM e, outros 36,9% (24/65) dos indivíduos com os dois isotipos de anticorpos.

É interessante observar que o indivíduo transplantado #31, no período pré-Tx, apresentou anticorpos do isotipo IgG que reconheceram todos os peptídeos da MC com alta intensidade de reatividade. E reconheceu também todos os peptídeos da Hsp60, porém somente a quatro peptídeos (I-2, I-9, C9 e C10) a reatividade foi de alta intensidade. Quanto aos anticorpos do isotipo IgM, esse mesmo indivíduo, no período pré-Tx reconheceu 8 peptídeos da MC com reatividade de baixa intensidade e não reconheceram qualquer peptídeo da Hsp60. Após o primeiro ano de Tx, não foram mais observadas reatividades de alta intensidade neste indivíduo. As reatividades foram predominantemente de baixa intensidade, os anticorpos do isotipo IgG reconheceram 8 peptídeos da MC (S2-3, 4, 8, 9, 11, 17, 30 e 32) e 3 peptídeos da Hsp60 (I-2, I-9 e C3), e os anticorpos do isotipo IgM reconheceram 16 peptídeos da MC e somente o peptídeo I-5 da Hsp60.

As reatividades de alta intensidade foram observadas principalmente para os anticorpos do isotipo IgM, mais frequentemente para os peptídeos S2:3, 4, 8, 26, 29 e 30 da MC, e quase não observadas para os peptídeos da Hsp60 (Figura 9).

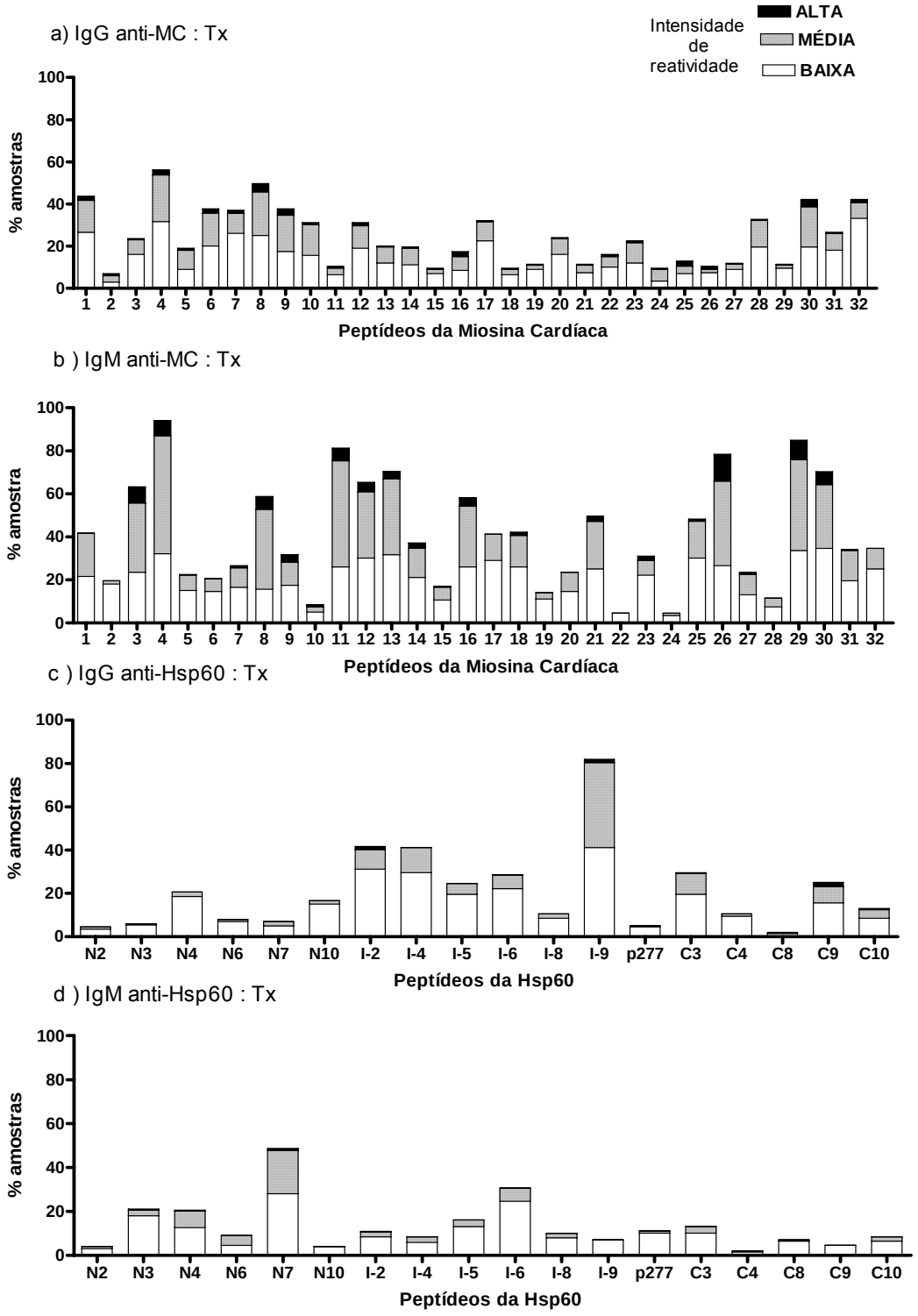


Figura 9. Frequência da intensidade de autorreatividade humoral dirigida à miosina cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos transplantados: Porcentagem de amostras positivas em cada nível de intensidade de reatividade para os anticorpos anti-miosina cardíaca do isotipo IgG e IgM (a e b) e os anticorpos anti-Hsp60 (c e d). O método ELISA foi utilizado para analisar as amostras de soros provenientes de 65 indivíduos transplantados (n=190). As reatividades medidas em densidade óptica (D.O.) foram classificadas em três níveis de intensidade, de acordo com a legenda: baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340), média (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e, alta (D.O. > 0,850).

4.2.3. Número de peptídeos reconhecidos por indivíduos transplantados

Considerando os dois isotipos de anticorpos, simultaneamente, observamos que todos os indivíduos transplantados reconheceram pelo menos um peptídeo da MC e da Hsp60.

Ao analisar separadamente as proteínas e os isotipos de anticorpos envolvidos no reconhecimento desses peptídeos (Tabela 7). Observamos que a proporção de indivíduos transplantados que reconheceram mais de 30% dos peptídeos da MC foi significantemente maior para os anticorpos IgM (80%, 52/65) do que para o isotipo IgG (49%, 32/65), ($p<0,0001$). Em contraste, para a reatividade dirigida aos peptídeos da Hsp60, a proporção de indivíduos que reconheceram mais de 30% dos peptídeos foi significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgG (45%, 29/65) do que para os anticorpos do isotipo IgM (25%, 16/65), ($p=0,0047$). Vale ressaltar que 3 indivíduos transplantados não reconheceram peptídeo algum da Hsp60 por anticorpos IgG e, outros 8 indivíduos não reconheceram peptídeo algum da Hsp60 por seus anticorpos do isotipo IgM.

Observamos também que a média de peptídeos da MC reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgM (17 ± 7, intervalo: 4-30 peptídeos) foi maior do que o isotipo IgG (12 ± 9, intervalo: 1-32 peptídeos). Em contraste, a média de peptídeos da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG (6 ± 4, intervalo: 0-18 peptídeos) foi maior do que para o isotipo IgM (4 ± 4, intervalo: 0-15 peptídeos), (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM em cada indivíduo transplantado cardíaco.

Indivíduos Transplantados n = 65	QUANTIDADE DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS							
	Miosina Cardíaca				Hsp60			
	IgG		IgM		IgG		IgM	
	No. pep.	%	No. pep.	%	No. pep.	%	No. pep.	%
1	1	3,1	**14**	43,8	1	5,6	**6**	33,3
2	5	15,6	**20**	62,5	**8**	44,4	**8**	44,4
3	**11**	34,4	**14**	43,8	**7**	38,9	5	27,8
4	7	21,9	**30**	93,8	3	16,7	3	16,7
5	**32**	100,0	**16**	50,0	**18**	100,0	2	11,1
6	**21**	65,6	**15**	46,9	**13**	72,2	2	11,1
7	**24**	75,0	**19**	59,4	**14**	77,8	**6**	33,3
8	8	25,0	**20**	62,5	**7**	38,9	3	16,7
9	**10**	31,3	**17**	53,1	**6**	33,3	2	11,1
10	9	28,1	**25**	78,1	**9**	50,0	1	5,6
11	6	18,8	**21**	65,6	**6**	33,3	4	22,2
12	**14**	43,8	**14**	43,8	**8**	44,4	4	22,2
13	8	25,0	**21**	65,6	1	5,6	0	0,0
14	**13**	40,6	**25**	78,1	**8**	44,4	4	22,2
15	**10**	31,3	**29**	90,6	4	22,2	**15**	83,3
16	6	18,8	**25**	78,1	2	11,1	4	22,2
17	**14**	43,8	**25**	78,1	**11**	61,1	**9**	50,0
18	6	18,8	**18**	56,3	3	16,7	**6**	33,3
19	4	12,5	**18**	56,3	3	16,7	3	16,7
20	**14**	43,8	**20**	62,5	7	38,9	**11**	61,1
21	**12**	37,5	**20**	62,5	**10**	55,6	4	22,2
22	8	25,0	**21**	65,6	5	27,8	5	27,8
23	8	25,0	8	25,0	2	11,1	0	0,0
24	**13**	40,6	**27**	84,4	**8**	44,4	**9**	50,0
25	**32**	100,0	9	28,1	**16**	88,9	**15**	83,3
26	**32**	100,0	4	12,5	**13**	72,2	0	0,0
27	9	28,1	**18**	56,3	3	16,7	4	22,2
28	**22**	68,8	**18**	56,3	**7**	38,9	4	22,2
29	**30**	93,8	**19**	59,4	**9**	50,0	1	5,6
30	4	12,5	**10**	31,3	3	16,7	2	11,1
31	**32**	100,0	**25**	78,1	**18**	100,0	1	5,6
32	6	18,8	**13**	40,6	4	22,2	2	11,1
33	**30**	93,8	9	28,1	**12**	66,7	2	11,1
34	1	3,1	9	28,1	3	16,7	1	5,6
35	**29**	90,6	**28**	87,5	**6**	33,3	**13**	72,2
36	9	28,1	**14**	43,8	5	27,8	5	27,8
37	9	28,1	**17**	53,1	4	22,2	1	5,6
38	**14**	43,8	9	28,1	**11**	61,1	3	16,7
39	**19**	59,4	**23**	71,9	**12**	66,7	2	11,1
40	8	25,0	**25**	78,1	5	27,8	**9**	50,0
41	**14**	43,8	6	18,8	3	16,7	5	27,8
42	**12**	37,5	**23**	71,9	3	16,7	**14**	77,8
43	**20**	62,5	**11**	34,4	4	22,2	1	5,6
44	**15**	46,9	**24**	75,0	**6**	33,3	**8**	44,4
45	**22**	68,8	9	28,1	4	22,2	0	0,0
46	**11**	34,4	6	18,8	**8**	44,4	1	5,6
47	**14**	43,8	**12**	37,5	**7**	38,9	1	5,6
48	**22**	68,8	**10**	31,3	**15**	83,3	0	0,0
49	4	12,5	**18**	56,3	0	0,0	3	16,7
50	7	21,9	**16**	50,0	3	16,7	3	16,7
51	6	18,8	**10**	31,3	3	16,7	1	5,6
52	5	15,6	**21**	65,6	3	16,7	**6**	33,3
53	7	21,9	**10**	31,3	**9**	50,0	2	11,1
54	6	18,8	7	21,9	3	16,7	1	5,6
55	6	18,8	5	15,6	5	27,8	0	0,0
56	5	15,6	**15**	46,9	4	22,2	3	16,7
57	**10**	31,3	**21**	65,6	2	11,1	**7**	38,9
58	**16**	50,0	**23**	71,9	3	16,7	**8**	44,4
59	5	15,6	**21**	65,6	1	5,6	4	22,2
60	**12**	37,5	7	21,9	1	5,6	0	0,0
61	2	6,3	5	15,6	0	0,0	1	5,6
62	7	21,9	**18**	56,3	3	16,7	4	22,2
63	6	18,8	**11**	34,4	3	16,7	0	0,0
64	1	3,1	**19**	59,4	2	11,1	2	11,1
65	6	18,8	**13**	40,6	0	0,0	4	22,2
Média e Desvio Padrão	**12,2 ± 8,5**		**16,5 ± 6,7**		**6,0 ± 4,4**		**4 ± 3,7**	

* Os números marcados em vermelho: ≥ 30% de peptídeos reconhecidos.

Comparamos as porcentagens de peptídeos da MC reconhecidas por ambos os isotipos de anticorpos, observamos que a mediana foi significantemente maior para anticorpos IgM do para anticorpos IgG (p=0,001). Em contraste, para a reatividade dirigida à Hsp60, a mediana foi significantemente maior para os anticorpos IgG do que para os anticorpos IgM (p=0,009). Observamos também que os anticorpos do isotipo IgM reconheceram mais peptídeos da MC do que Hsp60 (p<0,001). Não houve diferença estatisticamente significante (p=0,120) para a reatividade dos anticorpos do isotipo IgG dirigidos aos peptídeos da MC e da Hsp60 (Figura 10).

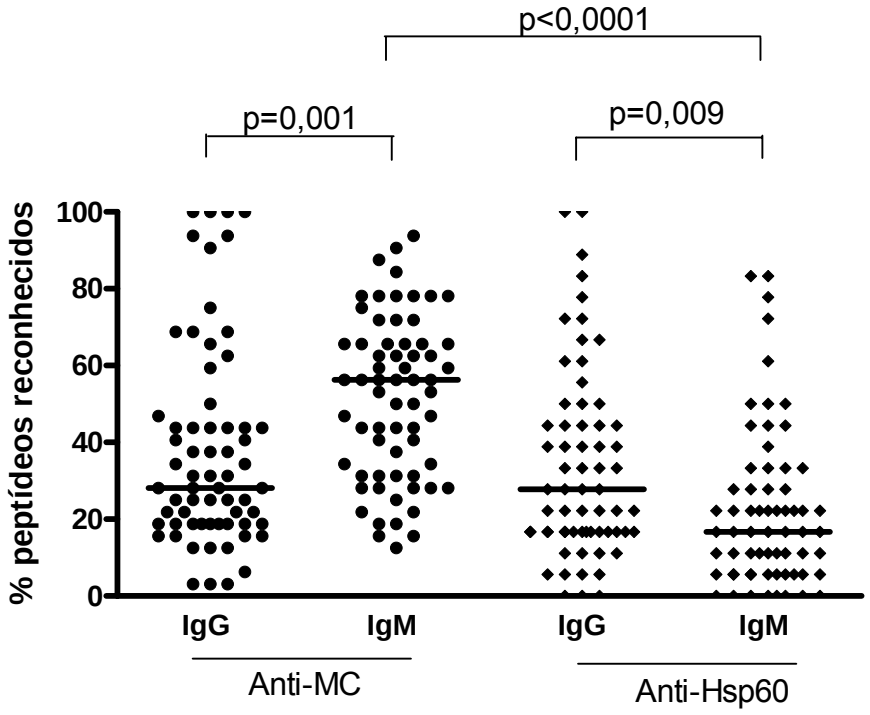


Figura 10. Porcentagem de peptídeos reconhecidos por indivíduos transplantados cardíacos: Comparação entre as medianas das porcentagens de peptídeos da Miosina cardíaca (MC, n=32) e Hsp60 (Hsp, n=18) reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e IgM de indivíduos transplantados cardíacos (n=65). Teste de Wilcoxon α=0,05.

4.2.4. Variabilidade da autorreatividade humoral no transplante

Para avaliar a variabilidade da autorreatividade humoral no processo de transplante, os indivíduos transplantados com a amostra do período de pré-transplante foram selecionados para esta parte da análise (n=41). Os números de peptídeos (MC e Hsp60) reconhecidos por isotipos de anticorpos (IgG e IgM) no período pré e pós-Tx estão apresentados individualmente no anexo G.

Os anticorpos do isotipo IgG de indivíduos no período pré-Tx reconheceram mais peptídeos do que no período de pós-Tx, não só para a reatividade dirigida à MC (p=0,024), mas também para a Hsp60 (p=0,016). Para os anticorpos do isotipo IgM reativos à MC, os indivíduos no período de pós-Tx reconheceram mais peptídeos do que no período pré-Tx (p=0,002), entretanto, não observamos diferença significante na mesma comparação feita para os anticorpos dirigidos à Hsp60 (Figura 11).

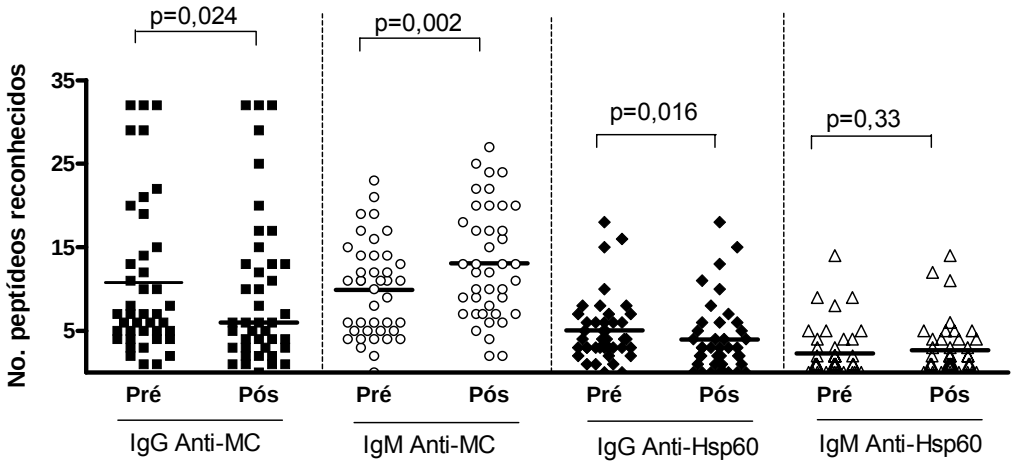


Figura 11. Comparação do número de peptídeos reconhecidos pelos anticorpos do isotipos IgG e IgM de indivíduos transplantados nos períodos pré e pós-transplante: Comparação do número de peptídeos da miosina cardíaca (n=32) e Hsp60 (n=18) reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG ou IgM de 41 indivíduos transplantados. A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Utilizou-se o teste pareado de Wilcoxon para as comparações entre os dois períodos de transplante (α=0,05).

Analisamos 41 indivíduos transplantados em relação ao número de peptídeos reconhecidos nos períodos de pré e pós-transplante (anexo G), comparou-se o número de peptídeos divergentes, ou seja, o número de peptídeos que foram reconhecidos no período pré-transplante e não foram reconhecidos no pós-transplante, ou vice versa (anexo H). Pôde-se observar que 93% dos indivíduos para anticorpos IgG e 98% dos indivíduos para anticorpos IgM tiveram variação para a reatividade dirigida aos peptídeos da MC. As porcentagens discretamente menores foram observadas para a reatividade dirigida à Hsp60, sendo 85% dos indivíduos transplantados para anticorpos IgG e 76% dos indivíduos para os anticorpos IgM tiveram variação no número de peptídeos reconhecidos entre os dois períodos de transplante.

Analisamos, também, a variabilidade da intensidade de reatividade dos anticorpos dirigidos à MC e à Hsp60 nos indivíduos transplantados (n=65). Considerou-se como variação, quando qualquer amostra do mesmo indivíduo em tempos distintos teve diferença superior à D.O. de 0,200.

A proporção de indivíduos transplantados que apresentou variações na intensidade de autorreatividade ao longo do tempo de transplante foi significantemente maior para os dois isotipos de anticorpos dirigidos à MC (IgG: 88% e IgM: 85%), quando comparada àquela dos anticorpos reativos à Hsp60 (IgG: 41% e IgM: 38%); ($p<0,0001$). No entanto, a figura 12 mostra também que a proporção de indivíduos transplantados que tiveram mais de 10% dos peptídeos com variação foi significantemente maior para os anticorpos anti-MC do isotipo IgM do que para o isotipo IgG (55% vs 25%;

p<0,001) e, quando comparada aos anticorpos dirigidos à Hsp60, a proporção também foi significantemente maior para a reatividade dos anticorpos IgM anti-MC (55% vs 20% ou 14%; p<0,001).

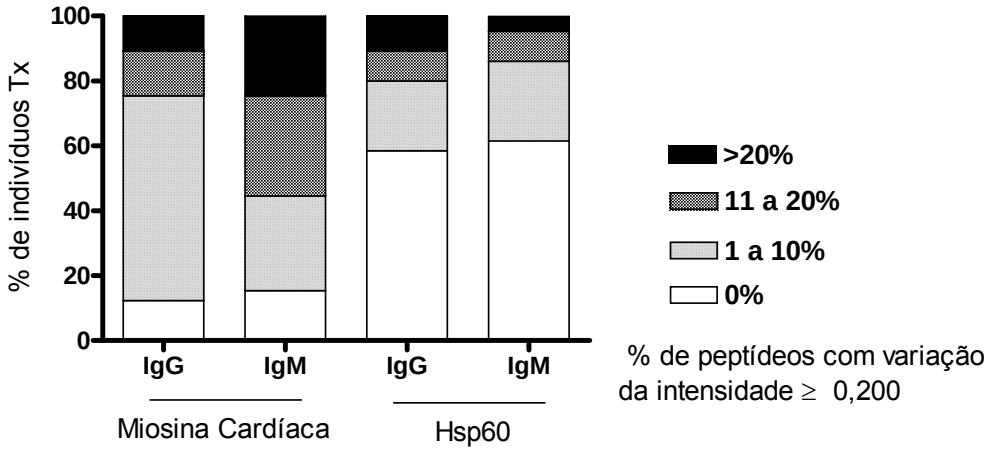


Figura 12. Distribuição da proporção de indivíduos transplantados de acordo com as porcentagens de peptídeos com variação da intensidade de reatividade ao longo do tempo: Número relativo de indivíduos transplantados em relação à porcentagem de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 com variação da intensidade de reatividade entre as amostras. Considerou-se que um indivíduo teve variação na intensidade de reatividade dos anticorpos IgG e IgM a um determinado peptídeo, se a diferença entre as D.Os. (densidade óptica) das amostras fosse maior do que 0,200.

4.2.5. Autorreatividade humoral aos peptídeos selecionados

Foram selecionados para a próxima etapa da análise, 13 peptídeos da MC com reatividade mais relevante (S2: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 16, 17, 19, 20, 29, 31 e 32) e 11 peptídeos da Hsp60 (N3, N7, N10, I-2, I-4, I-5, I-6, I-9, p277, C3 e C9); esses peptídeos estão marcados em retângulo nas Figuras 13 e 14. Os critérios de seleção desses peptídeos foram: i) maior diferença entre a frequência de sadios e dos transplantados; ii) predominância de um dos isotipos de anticorpos; iii) peptídeos que já foram descritos como relevantes na literatura.

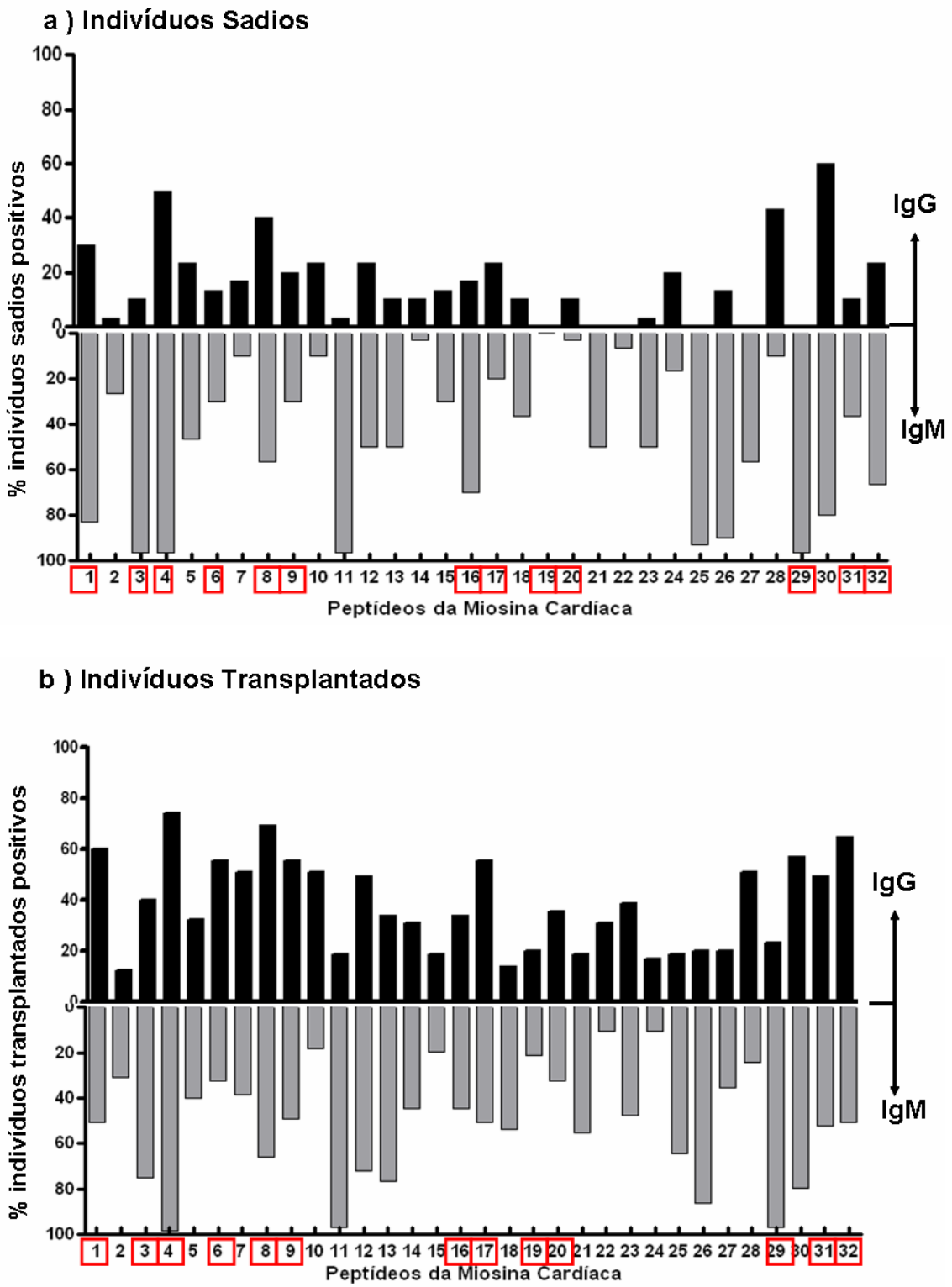


Figura 13. Frequência de indivíduos sadios e transplantados positivos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM reativos aos peptídeos da miosina cardíaca: grupo de indivíduos sadios, n=30 (a) e o grupo de indivíduos transplantados cardíacos, n=65 (b). Os peptídeos marcados com retângulo são os selecionados para a análise mais aprofundada.

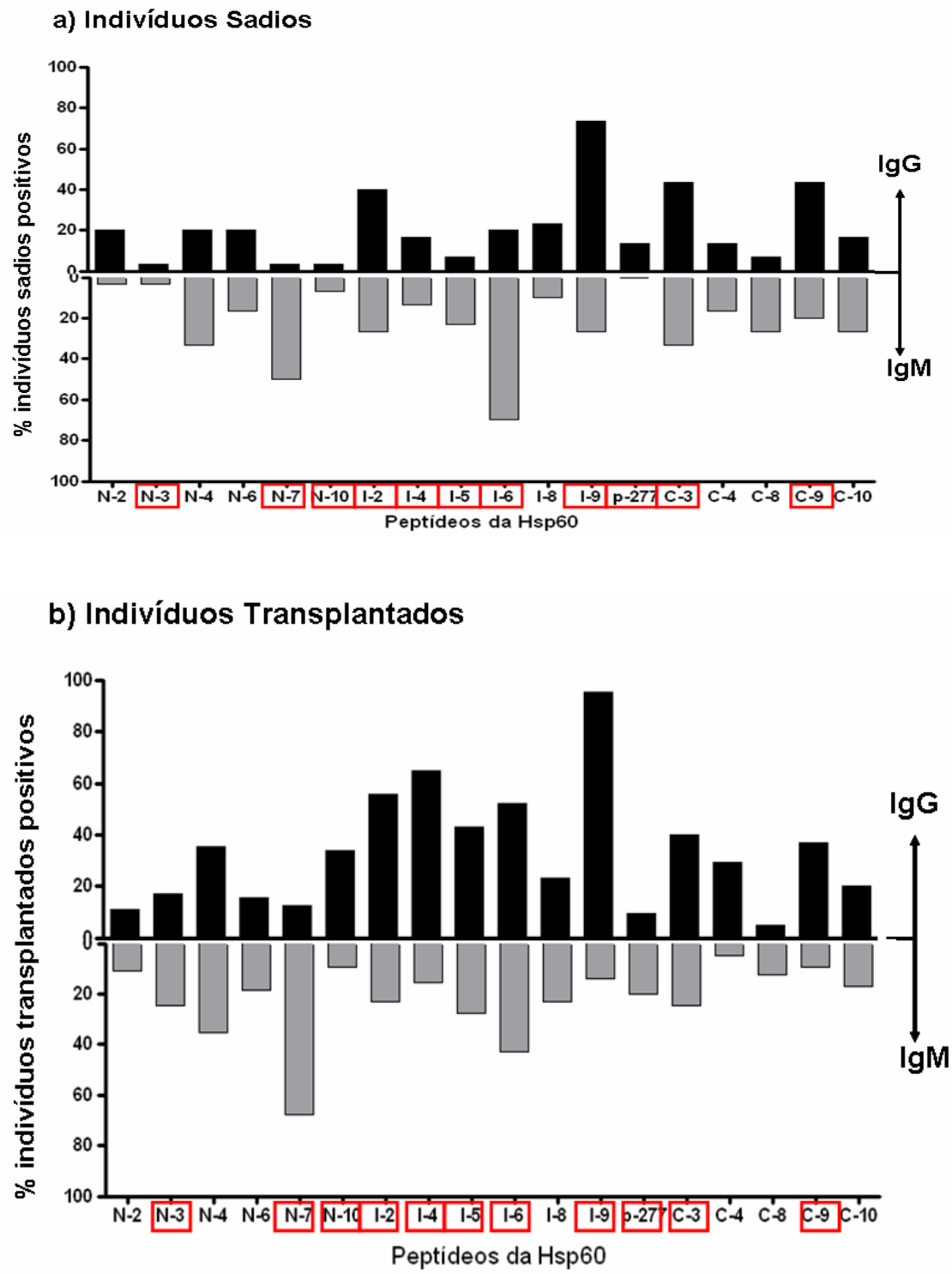


Figura 14. Frequência de indivíduos sadios e transplantados positivos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM reativos aos peptídeos da Hsp60: o grupo de indivíduos sadios, n=30 (a) e o grupo de indivíduos transplantados cardíacos, n=65 (b). Os peptídeos marcados com retângulo são os selecionados para as análises mais aprofundadas.

Frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos selecionados: períodos de transplante

Na análise longitudinal dos anticorpos envolvidos na reatividade aos peptídeos selecionados (Figura 15), observamos que a proporção de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgG no período de Pré-Tx e/ou T1 (<1ano) foi maior do que nos períodos tardios de transplante T2 (1 a 5 anos) e T3 (>5 anos). Pôde-se observar a maior frequência de indivíduos positivos para anticorpos IgG no Pré-Tx e T1 em 92% (12/13) dos peptídeos selecionados da MC e 82% (9/11) dos peptídeos selecionados da Hsp60. Destacamos o peptídeo, S2-20 da MC e os peptídeos I-4 e I-5 da Hsp60 cujas frequências de indivíduos positivos para anticorpos IgG no período Pré-Tx e T1 foi significantemente maior do que no período T2 e T3 do período pós-Tx ($p<0,05$). Em contraste à reatividade dos anticorpos IgG, para os anticorpos IgM, os indivíduos transplantados no período de pós-Tx (T1 e/ou T2) reconheceram mais peptídeos selecionados da MC e da Hsp60 do que no pré-Tx. Pôde-se observar maior frequência de indivíduos positivos para anticorpos IgM nos períodos T1 e/ou T2 em 77% (10/13) dos peptídeos selecionados da MC e 82% (9/11) dos peptídeos selecionados da Hsp60. Vale ressaltar que o peptídeo N7 da Hsp60 foi significantemente mais reconhecido por indivíduos no período T3 do que os indivíduos no pré-Tx e os dois períodos mais recentes de transplante; T1 e T2 de pós-Tx (85% vs 44%, 49% e 49%, $p<0,001$).

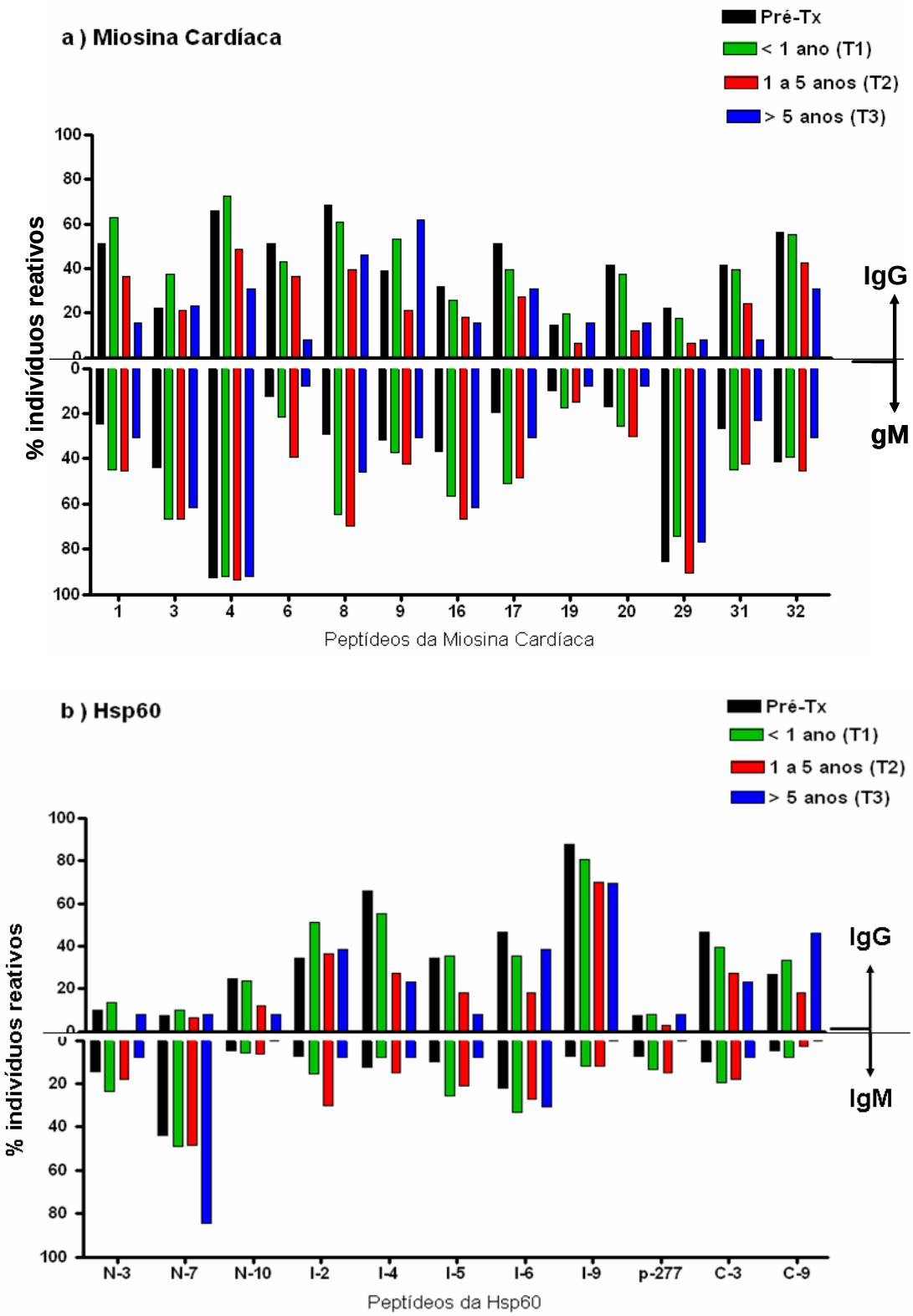
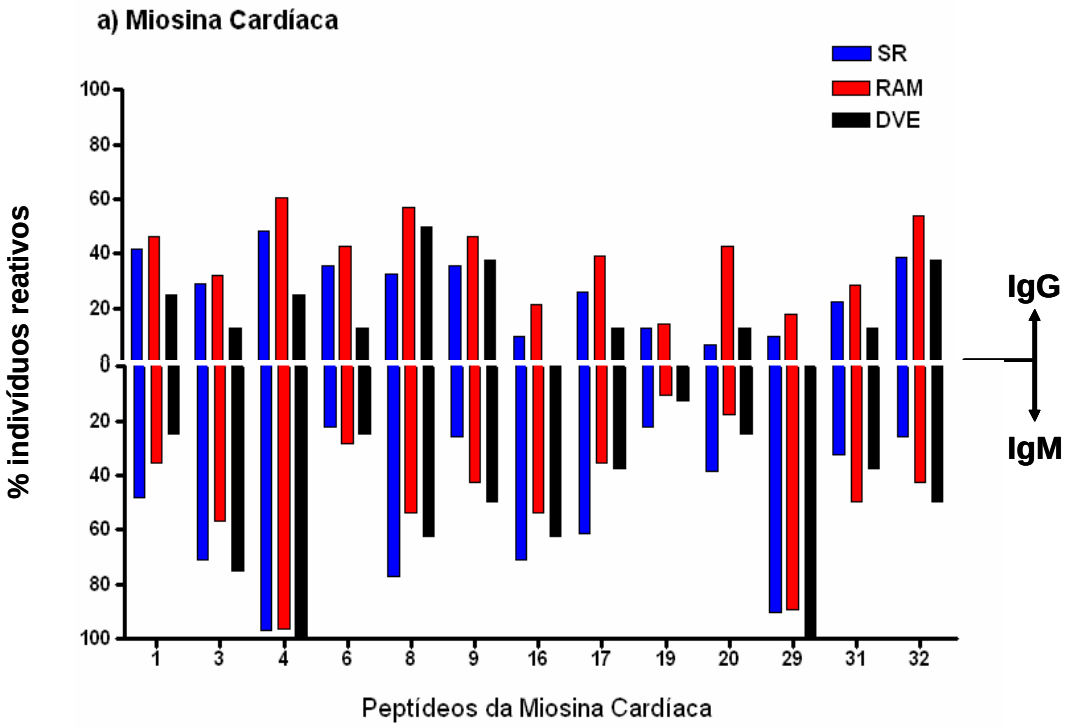


Figura 15. Análise longitudinal da frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos selecionados da miosina cardíaca e da Hsp60: Comparação das frequências de indivíduos transplantados positivos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos aos peptídeos selecionados da Miosina Cardíaca (a) e da Hsp60 (b) nos períodos pré-transplante (Pré-Tx, n=41), T1 (n=51), T2 (n=33) e T3 (n=13).

Frequência de indivíduos reativos aos peptídeos selecionados: tipos de rejeição

Em todos os peptídeos selecionados da MC, observamos que a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos IgG foi maior para o grupo com rejeição aguda moderada (RAM, n=28) do que o grupo de indivíduos sem rejeição (SR, n=31) ou com doença vascular do enxerto (DVE, n=8). Destacamos o peptídeo S2-20 que foi mais reconhecido pelos indivíduos no momento de RAM do que no SR (43% vs 6,5%, p=0,0001). Quanto à frequência de indivíduos positivos para os anticorpos IgM reativos à MC, não observamos diferença estatisticamente significante entre os grupos analisados (p=0,185). Porém, pôde-se observar que alguns peptídeos como: 1, 8, 16, 17 e 20 foram mais reconhecidos pelos indivíduos transplantados no momento SR (Figura 16-a). Em relação aos anticorpos dirigidos aos peptídeos selecionados da Hsp60, não houve diferença estatisticamente significante entre as frequências de indivíduos positivos no momento da rejeição e de não rejeição, tanto para o isotipo IgG (p=0,072) quanto para o isotipo IgM (p=0,056). Porém, vale destacar que os peptídeos I-2 e I-5 foram mais reconhecidos pelos anticorpos IgG de indivíduos no momento SR, 58% e 32%, respectivamente, em comparação com os indivíduos com RAM (35% e 17%) e DVE (37% e 0%). Já o peptídeo C3 foi mais reconhecido pelo grupo da RAM (36%) do que o grupo SR (13%) e DVE (0%). Por outro lado, os peptídeos N3, N7 foram mais reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgM do grupos SR (29% e 65%), e DVE (25% e 62%) do que o grupo de RAM, 14% e 36%, respectivamente (Figura 16-b).



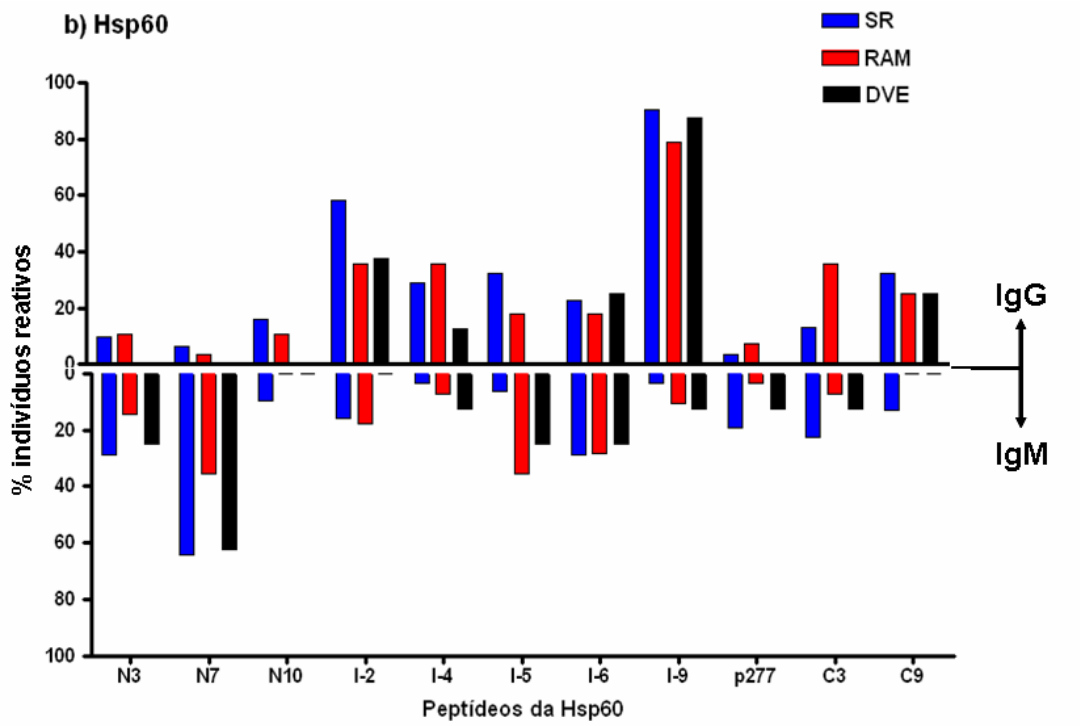


Figura 16. Frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos selecionados da miosina cardíaca e da Hsp60 em relação ao tipo de rejeição: Comparação das frequências de indivíduos reativos aos peptídeos selecionados da Miosina Cardíaca (a) e da Hsp60 (b) para os anticorpos dos isotipos IgG e IgM entre os grupos: sem rejeição (SR, n=31), rejeição aguda moderada (RAM, n=28) e doença vascular do enxerto (DVE, n=8).

Frequência de indivíduos reativos aos peptídeos selecionados: doenças de base

As amostras de soro do período pré-Tx foram classificadas em relação às doenças de base nas cardiopatias: isquêmica (n=12), dilatada (n=16), e chagásica (n=8). Devido ao pequeno número de indivíduos, outros cinco indivíduos foram deixados fora desta análise; são eles: cardiopatia reumática (n=1); restritiva (n=3) e idiopática (n=1).

Os indivíduos com cardiopatia isquêmica apresentaram um repertório de autoanticorpos dirigidos à MC predominantemente do isotipo IgG. No entanto, para a cardiopatia dilatada e chagásica, observamos bastante semelhança entre a frequência de positividade para os dois isotipos de anticorpos. É interessante ressaltar que o peptídeo S2-4 da MC foi imunodominante para as três cardiopatias, e o peptídeo S2-1 foi reconhecido preferencialmente pelo grupo de cardiopatia chagásica (Figura 17-a).

Os três grupos de cardiopatias analisados apresentaram padrões de autorreatividade aos peptídeos da Hsp60 bastante semelhantes, com o predomínio dos anticorpos do isotipo IgG. Os peptídeos da região intermediária da proteína foram mais reconhecidos pelos três grupos. Porém, observamos que alguns desses peptídeos (I-4, I-5, I-6 e I-9) foram reconhecidos principalmente pelos grupos de cardiopatias dilatada e chagásica. A baixa frequência de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgM foi observada em quase todos os peptídeos da Hsp60, exceto para o peptídeo N7, que foi reconhecido por 50% dos indivíduos com cardiopatia dilatada (Figura 17-b).

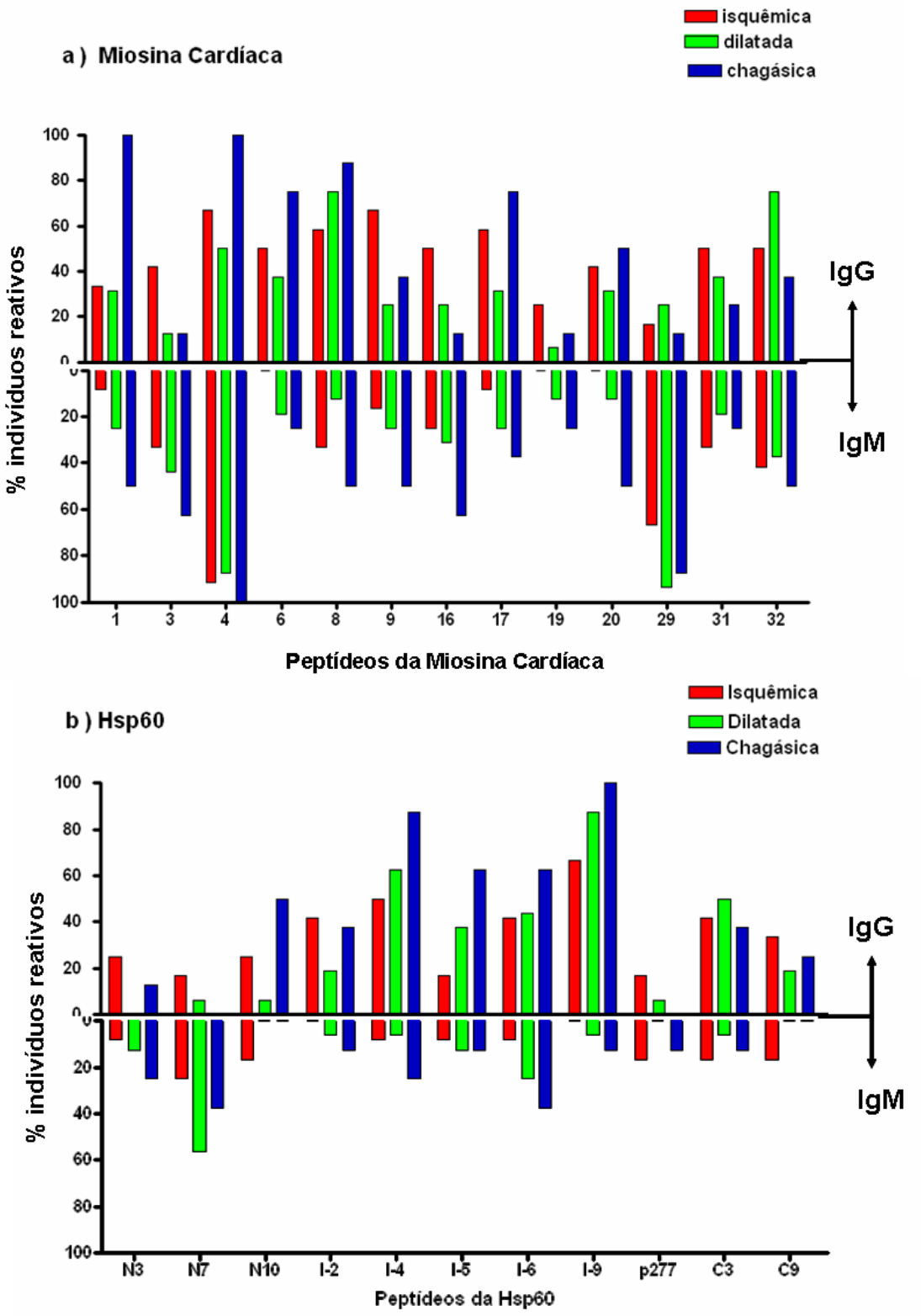


Figura 17. Frequência de indivíduos transplantados reativos aos peptídeos selecionados da miosina cardíaca e Hsp60 em relação à doença cardíaca de base: Foram consideradas somente as amostras do período pré transplante para a comparação das frequências de indivíduos reativos para os anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos aos peptídeos selecionados da Miosina Cardíaca (a) e da Hsp60 (b) entre os grupos de diferentes doenças cardíacas de base: isquêmica (n=12); dilatada (n=16) e chagásica (n=8).

4.2.6. Número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados cardíacos

Número de peptídeos reconhecidos: tempo de transplante

Nos períodos pré-Tx e T1 os números de peptídeos da MC reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG foram semelhantes. No entanto, nos dois períodos mais tardios do transplante (T2 e T3) houve uma diminuição significante no número de peptídeos reconhecidos ($p<0,05$). Em contraste com o isotipo IgG, observamos que os anticorpos do isotipo IgM de indivíduos no período pré-Tx reconheceram um menor número de peptídeos da MC do que nos períodos T1 e T2 ($p<0,05$). No período T3 do transplante, o número de peptídeos da MC reconhecidos foi semelhante ao do período pré-Tx (Figura 18).

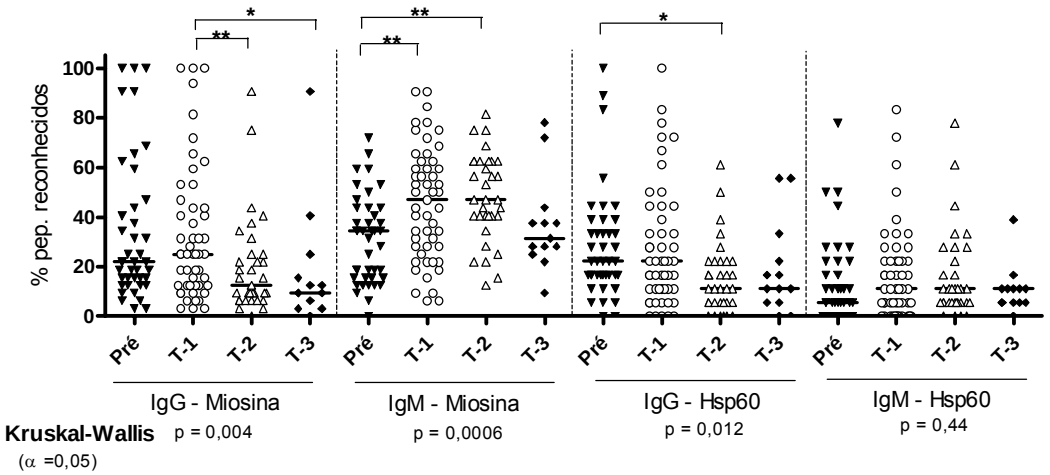


Figura 18. Porcentagem de peptídeos da miosina cardíaca e de Hsp60 reconhecidos pelos indivíduos transplantados nos diferentes períodos de evolução do transplante: Percentagem de peptídeos reconhecidos pelos pacientes nos períodos de pré-transplante (Pré, n=41); < 1 ano de Tx (T1, n=51); 1 a 5 anos de Tx (T2, n=33); > 5 anos de Tx (T3, n=13). Os anticorpos dos isotipos IgG e IgM foram detectados pelo método imunoenzimárico (ELISA). O teste estatístico aplicado: Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn (α=0,05).

Para os anticorpos reativos à Hsp60 do isotipo IgG, os indivíduos no pré-Tx reconheceram mais peptídeos do que nos outros períodos de pós-Tx, no entanto, a diferença estatística foi detectada somente entre o período pré-Tx e o período T2 de transplante ($p<0,05$). Quanto aos anticorpos do isotipo IgM reativos à Hsp60, os números de peptídeos que os indivíduos transplantados reconheceram, foram bastante semelhantes em diferentes períodos de transplante (Figura 18).

Número de peptídeos reconhecidos: tipos de rejeição

Comparou-se o número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados com a ocorrência de rejeição no mesmo período da amostra de soro. Não houve diferença significante entre os grupos comparados (sem rejeição vs diferentes tipos de rejeição) para ambos os isotipos de anticorpos dirigidos às duas proteínas estudadas (Figura 19). No entanto, pôde-se observar uma tendência de maior reconhecimento para os anticorpos do isotipo IgG reativos à MC nos momentos de rejeição aguda leve (RAL) e moderada (RAM). Em contraste, os anticorpos do isotipo IgM dos indivíduos transplantados no momento sem rejeição (SR) reconheceram mais peptídeos da MC do que nos momentos da rejeição. Os indivíduos transplantados com doença vascular do enxerto (DVE) reconheceram um número de peptídeos da MC semelhante ao momento SR. Não houve diferença significante na mesma comparação feita para os anticorpos, tanto do isotipo IgG ($p=0,55$) quanto do IgM ($p=0,30$) dirigidos à Hsp60 (Figura 19).

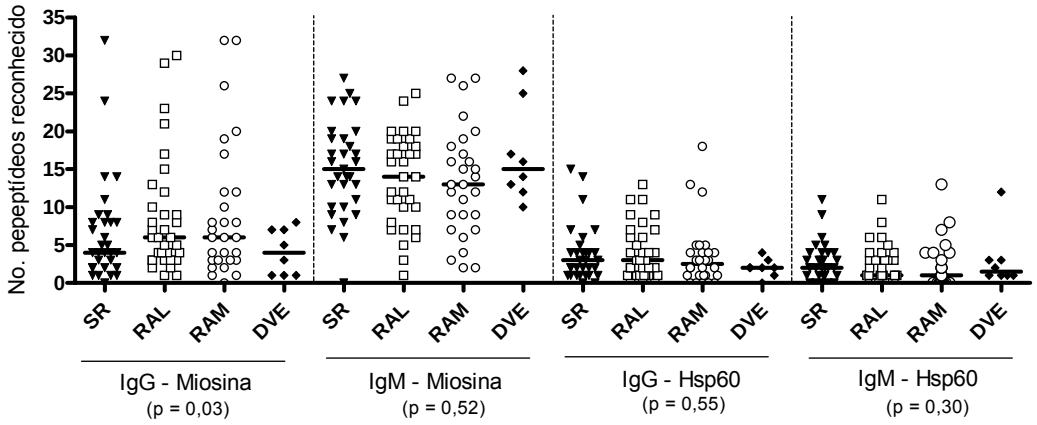


Figura 19. Comparação do número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados na ausência de rejeição e nos diferentes tipos de rejeição: O número de peptídeos da Miosina cardíaca (n=32) e da Hsp60 (n=18) reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM de indivíduos portadores de transplante cardíaco no momento da ausência de rejeição (SR, n=31); rejeição aguda leve ou grau 1 de *ISHLT* (RAL, n=33); rejeição aguda moderada ou grau 3 de *ISHLT* (RAM, n=28) e doença vascular do enxerto ou vasculopatia do transplante (DVE, n=8). Teste de Kruskal-Wallis (α=0,05).

Número de peptídeos reconhecidos: episódios de rejeição no primeiro ano de transplante

Com base no número de episódios de rejeição celular aguda moderada (grau 3 da *ISHLT*) no primeiro ano de transplante, os indivíduos transplantados cardíacos foram classificados em três grupos: 0 episódio de rejeição (n=8), 1 ou 2 episódios de rejeição (n=36) e, 3 ou 4 episódios de rejeição (n=11). Outros 10 indivíduos foram excluídos nesta parte da análise, por não ter amostras e/ou laudos de biópsias no primeiro ano de transplante. Comparou-se o número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados com a frequência de episódios de rejeição no primeiro ano de Tx. Pôde-se observar que não houve diferença estatisticamente significante para os anticorpos IgG dirigidos à MC entre os três grupos comparados (p=0,7980). No entanto, para os anticorpos do isotipo IgM reativos à MC, o grupo com maior número de rejeição (3 ou 4) reconheceu significantemente

maior número de peptídeos do que o grupo que não teve rejeição (p<0,05). Apesar de não haver diferença estatística para os anticorpos dos isotipos IgG (0,2391) e IgM (0,0783) dirigidos à Hsp60, pôde-se observar que houve uma tendência para menor reconhecimento do isotipo IgG e maior reconhecimento do isotipo IgM no grupo de indivíduos transplantados com maior número de episódios de rejeição no primeiro ano de transplante (Figura 20).

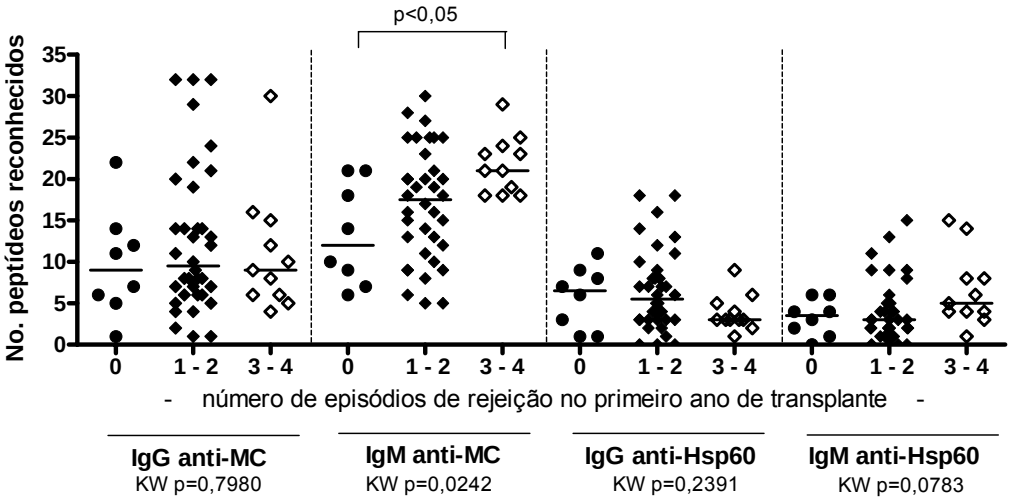


Figura 20. Comparação do número de peptídeos reconhecidos em relação ao número de episódios de rejeição no primeiro ano de transplante: O número de peptídeos da miosina cardíaca (n=32) e da Hsp60 (n=18) reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM de indivíduos no primeiro ano de transplante. Os indivíduos transplantados foram classificados de acordo com o número de episódios de rejeição moderada (RAM) ou grau 3 da classificação da *ISHLT* que tiveram no primeiro ano de transplante em: 0 (sem rejeição, n=8); 1 ou 2 episódios de rejeição (n=36) e 3 ou 4 episódios de rejeição (n=11).

Número de peptídeos reconhecidos: doenças de base

Os indivíduos que tiveram amostras de soro antes do transplante cardíaco foram agrupados em três grupos, segundo as cardiopatias de base: isquêmica (n=12), dilatada (n=16) e chagásica (n=8) e, comparamos os

números de peptídeos reconhecidos entre os três grupos. Não houve diferença estatisticamente significante em qualquer uma das comparações para ambos os isotipos de anticorpos dirigidos à MC e Hsp60. Porém, observamos uma tendência dos anticorpos do isotipo IgM de indivíduos com cardiopatia isquêmica reconhecendo menos peptídeos da MC (p=0,0505) e da Hsp60 (p=0,1629), quando foram comparados àqueles com cardiopatia dilatada e chagásica (Figura 21).

Com o objetivo de conhecer se o número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos antes do transplante tem relação com a evolução do transplante. Nós identificamos com círculos os números de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos com mais de três episódios de rejeição, ou com rejeição persistente no primeiro ano de Tx (Figura 21). Observamos que a frequência de indivíduos com pior quadro de rejeição foi semelhante nas três cardiopatias, ou seja, 3 ou 4 casos em todos os três grupos. O maior reconhecimento de autoantígenos antes do transplante parece não estar associado a maior número de episódios de rejeição e/ou rejeição persistente. Além disso, 12 indivíduos do período pré-Tx em que os anticorpos IgG desses indivíduos reconheceram mais de 15 peptídeos da MC, somente 2 (17%) tiveram mais de 3 episódios de RAM no primeiro ano de Tx. Vale ressaltar que a amostra pequena é um viés importante a ser considerado.

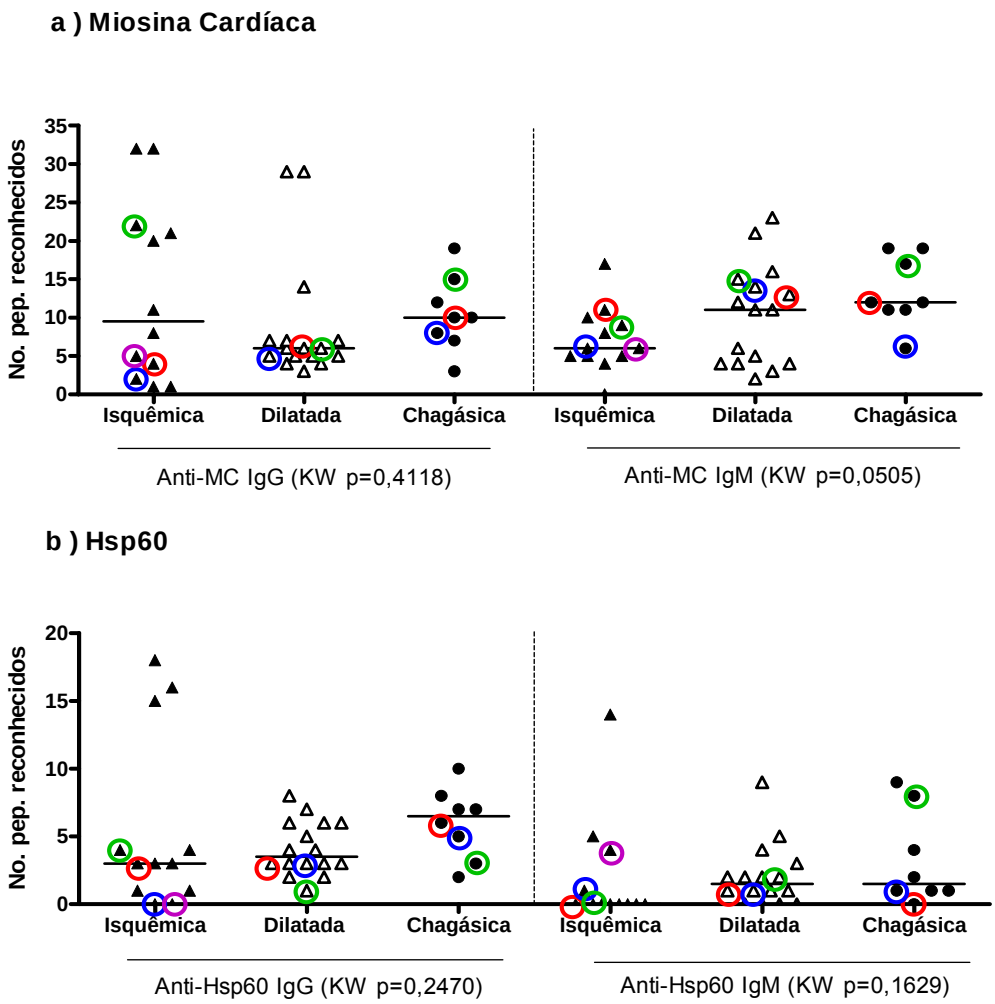


Figura 21. Número de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos dos isotipos IgG e IgM nas doenças cardíacas de base: O número de peptídeos reconhecidos pelos anticorpos (IgG e IgM) dirigidos à miosina cardíaca (a) e Hsp60 (b) no período pré-transplante. Os grupos classificados segundo as cardiopatias em: isquêmica (n=12); dilatada (n=16) e chagásica (n=8). A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado nas múltiplas comparações (α=0,05). Os indivíduos que tiveram mais de 3 episódios de rejeição moderada (grau 3 da classificação da ISHLT) no primeiro ano de transplante estão marcados com círculo.

4.3. Autorreatividade humoral fisiológica e no transplante cardíaco

4.3.1. Frequência de indivíduos reativos

Foram comparadas, as frequências de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgG e do IgM dirigidos às proteínas da MC e da Hsp60

do grupo de indivíduos sadios com o grupo de indivíduos transplantados cardíacos (Figuras 13 e 14). No gráfico de indivíduos sadios, observamos uma nítida assimetria entre as frequências de indivíduos reativos para os dois isotipos de anticorpos. Essa assimetria é devido à predominância de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgM, e uma baixa frequência para os anticorpos IgG. Em contraste, a frequência de positividade no grupo de indivíduos transplantados foi semelhante para os dois isotipos de anticorpos, pôde-se observar o envolvimento dos dois isotipos de anticorpos no reconhecimento de todos os peptídeos.

Entre os peptídeos da MC, seis peptídeos não foram reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG de indivíduos sadios (S2: 19, 21, 22, 25, 27, 29), porém, todos desses peptídeos foram reconhecidos por aproximadamente 20% dos indivíduos transplantados. Para a análise seguinte, incluímos também o peptídeo S2-23, porque este peptídeo foi reconhecido somente por um indivíduo sadio, entretanto, foi reconhecido por 38% (25/65) dos indivíduos transplantados. Em relação aos anticorpos do isotipo IgG reativos a esses sete peptídeos da MC, considerando todos os períodos de Tx, observamos que 60% (39/65) dos indivíduos transplantados reconheceram pelo menos um dos sete peptídeos, entre esses indivíduos, 36% (14/39) tiveram 3 ou 4 episódios de rejeição ou rejeição persistente (3 diagnósticos de RAM em 3 meses seguidos). O mesmo critério de análise foi realizado para outros 26 indivíduos transplantados que não reconheceram peptídeo algum, observamos que nesse grupo, 30% (7/26) dos indivíduos tiveram mais de 3 episódios de rejeição. Por tanto, as proporções de

indivíduos que tiveram mais de 3 episódios de rejeição foram semelhantes nos dois grupos comparados (p=0,5898). Também analisamos 20 indivíduos que tiveram 3 ou 4 episódios de rejeição e/ou rejeição persistente, quanto à reatividade dos anticorpos IgG dirigidos àqueles sete peptídeos da MC que não foram reconhecidos pelos indivíduos sadios. Observamos que 85% (17/20) dos indivíduos reconheceram até 2 peptídeos e somente 3 indivíduos reconheceram mais de 3 peptídeos. É interessante observar que dos 6 indivíduos que reconheceram mais de 5 daqueles 7 peptídeos no período pré-Tx, dois indivíduos não tiveram rejeição e outros quatro tiveram somente 1 ou 2 episódios de rejeição; vale ressaltar que nenhum dos seis indivíduos teve rejeição persistente.

Com relação à frequência de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgG reativos à MC, observamos que no pré-Tx e o grupo de RAM a frequência de reatividade foi maior do que no grupo de indivíduos sadios (p<0,01). A mesma comparação foi feita para os anticorpos do isotipo IgM, porém não observamos diferença significante entre os grupos (p=0,052). Destacamos os peptídeos S2-14, 16 e 20, que foram mais reconhecidos pelos anticorpos IgG dos indivíduos no período pré-Tx (34%, 32% e 42%, respectivamente), e também nos momentos com RAM (29%, 21% e 43%). Porém, esses peptídeos foram pouco reconhecidos pelos indivíduos sadios (10%, 17% e 10%) e pelos indivíduos transplantados no momento SR (13%, 10%, 13%). É interessante observar que esses mesmos peptídeos foram mais reconhecidos pelos anticorpos IgM de indivíduos sadios e/ou no momento SR (Figura 22-a).

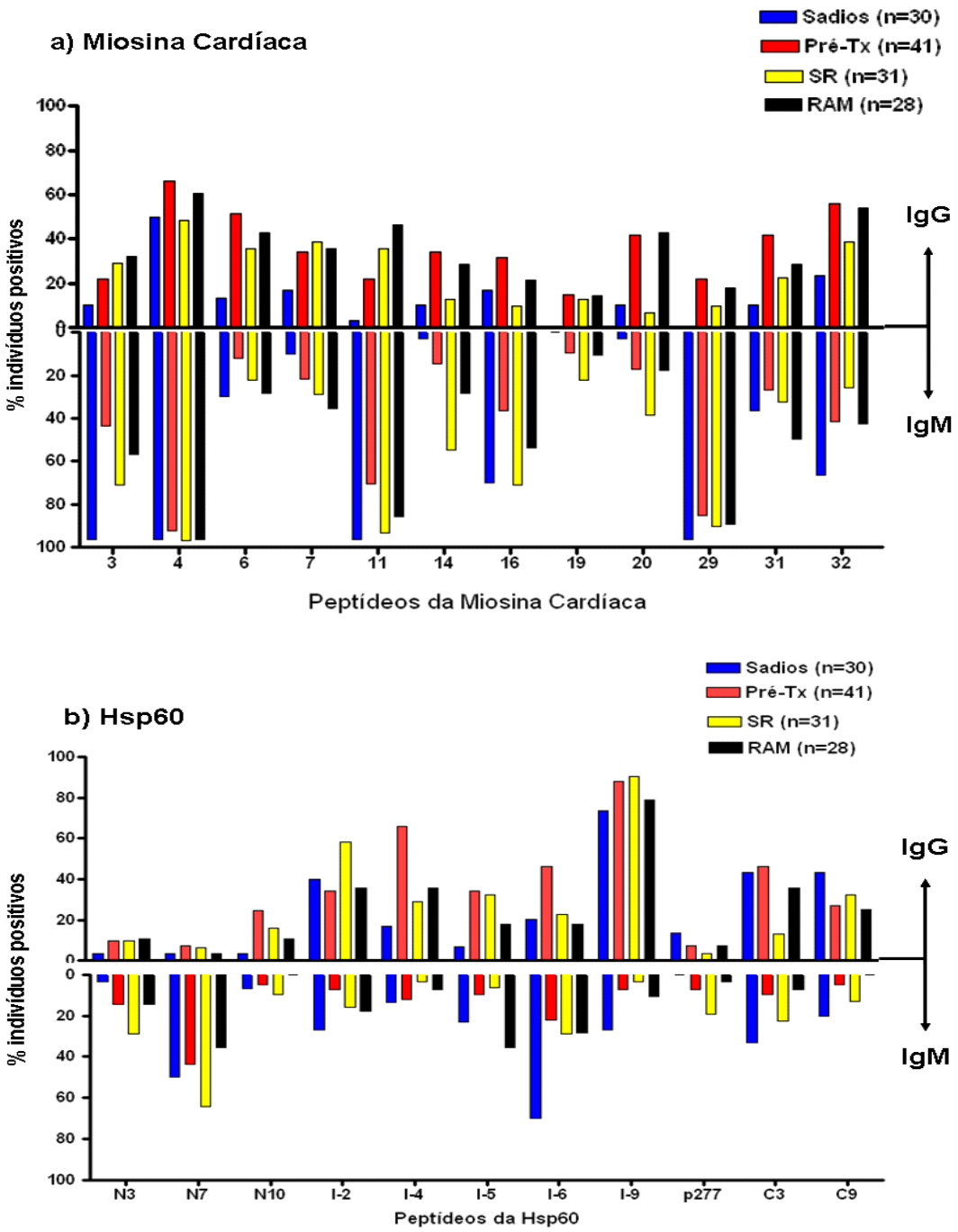


Figura 22. Frequências de reatividade aos peptídeos selecionados no grupo de indivíduos sadios e nos grupos de diferentes estados clínicos do transplante: Comparação das frequências de positividade dos anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos aos peptídeos selecionados da Miosina Cardíaca (a) e da Hsp60 (b) entre os grupos de indivíduos sadios (n=30), pré-transplante (n=41), momento sem rejeição (n=31) e rejeição aguda moderada ou grau 3 da ISHLT (n=28).

Para a reatividade dirigida à Hsp60, não observamos diferença significante entre os grupos comparados para anticorpos do isotipo IgG (p=0,072) e do IgM (p=0,056). Porém, destacamos o peptídeo I-2, que foi reconhecido pelos anticorpos IgG de 58% dos indivíduos no momento SR, enquanto nos outros grupos as frequências foram menores: sadios (40%), Pré-Tx (34%) e RAM (36%). Outros peptídeos I-4, I-6 e C3 foram mais reconhecidos no período pré-Tx e/ou no momento da RAM (± 50%), em contraste, somente ± 20% de indivíduos nos outros grupos. Em relação à reatividade dos anticorpos do isotipo IgM, destaca-se o peptídeo I-6, que foi reconhecido por 70% dos indivíduos sadios e somente por ± 30% de indivíduos dos outros grupos. Os peptídeos N3, N7 e p277 foram mais reconhecidos pelos indivíduos transplantados no momento SR do que na RAM (Figura 22-b).

4.3.2. Número de peptídeos reconhecidos

Analisamos as reatividades dos anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos aos 50 peptídeos da MC e Hsp60 em 30 indivíduos sadios e em 65 indivíduos transplantados subdivididos em: Pré-Tx (n=41), T1 (< 1 ano de Tx, n=51), T2 (1 a 5 anos de Tx, n=33) e T3 (>5 anos de Tx, n=13).

Nos períodos Pré-Tx e T1, os anticorpos IgG dos indivíduos desses dois grupos reconheceram um maior número de peptídeos do que nos tempos tardios de transplante (T2 e T3) e do grupo de indivíduos sadios (p<0,05). Nos períodos T2 e T3 do transplante, os indivíduos transplantados

reconheceram um número de peptídeos semelhante aos indivíduos sadios (Figura 23).

Quanto aos anticorpos do isotipo IgM, o grupo de indivíduos sadios reconheceu muito mais peptídeos do que o grupo de indivíduos Pré-Tx (p<0,001). Nos tempos T1 e T2, os indivíduos transplantados reconheceram um número de peptídeos bastante semelhante ao grupo de sadios, portanto, também significantemente maior do que o período Pré-Tx (p<0,05).

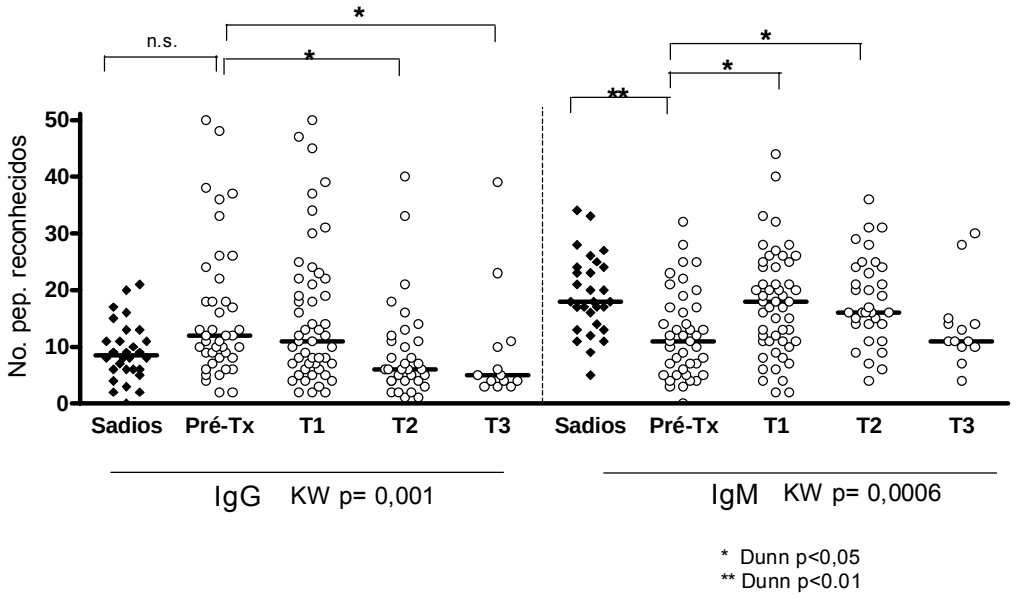


Figura 23. Número total de peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgM de indivíduos sadios e nos diferentes períodos de evolução do transplante: Os números de peptídeos (n=50) reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos à miosina cardíaca e Hsp60. Comparação entre os grupos de indivíduos sadios (n=30), Pré-Tx (n=41), T1 (n=51), T2 (n=33) e T3 (n=13). A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado nas múltiplas comparações e Dunn para as duplas comparações (α=0,05).

4.3.3. Isotipos de anticorpos envolvidos no reconhecimento dos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60: Sadios e Transplantados

Os indivíduos reativos aos peptídeos da MC e Hsp60 foram classificados de acordo com os anticorpos envolvidos no reconhecimento desses peptídeos em: IgG, IgM ou ambos os isotipos. Para cada isotipo de anticorpo, as porcentagens de indivíduos sadios reativos foram comparadas com as de transplantados cardíacos. Observamos que 65% (21/32) dos peptídeos da MC e 39% (7/18) dos peptídeos da Hsp60, a porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos IgG e/ou IgG+IgM foi significantemente maior no grupo de transplantados do que nos indivíduos sadios ($p<0,05$). Vale ressaltar que desses sete peptídeos da Hsp60 mais reconhecidos pelos anticorpos IgG de indivíduos transplantados, quatro pertencem à região intermediária da Hsp60 (Figuras 24 e 25).

Em contraste, para os anticorpos IgM, 34% (11/32) dos peptídeos da MC e 17% (3/18) dos peptídeos da Hsp60 a proporção de indivíduos positivos foi maior no grupo de indivíduos sadios do que nos indivíduos transplantados ($p<0,05$). Somente em três peptídeos da Hsp60 (N3, I8 e p277), observamos que a porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos IgM foi significantemente maior no grupo de transplantados cardíacos do que no grupo de indivíduos sadios ($p<0,05$).

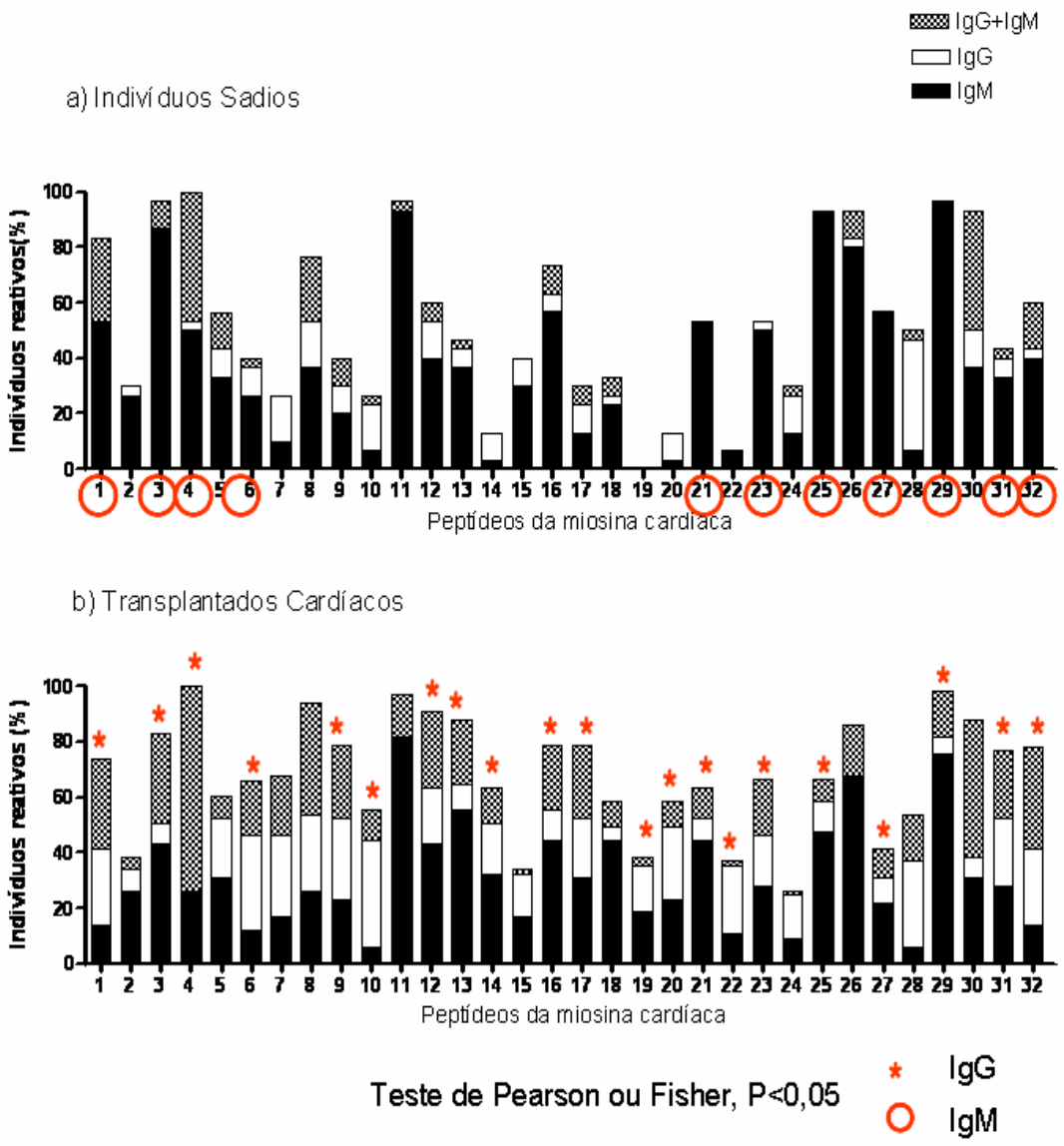


Figura 24. Porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos IgG reativos aos peptídeos da miosina cardíaca foi maior do que o IgM no grupo de indivíduos transplantados cardíacos: Os gráficos mostram as porcentagens de indivíduos positivos para os isotipos de anticorpos IgG, IgM ou ambos os isotipos no grupo de indivíduos sadios, n=30 (a) e no grupo de indivíduos transplantados, n=65 (b) em cada peptídeo da miosina cardíaca estudado (n=32). Nos peptídeos marcados com asterisco observa-se uma porcentagem de indivíduos transplantados significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgG ou IgM+IgG e os peptídeos marcados em círculos, a porcentagem de indivíduos sadios significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgM (Teste Chi-Qadrado de Pearson ou Fisher, p<0,05).

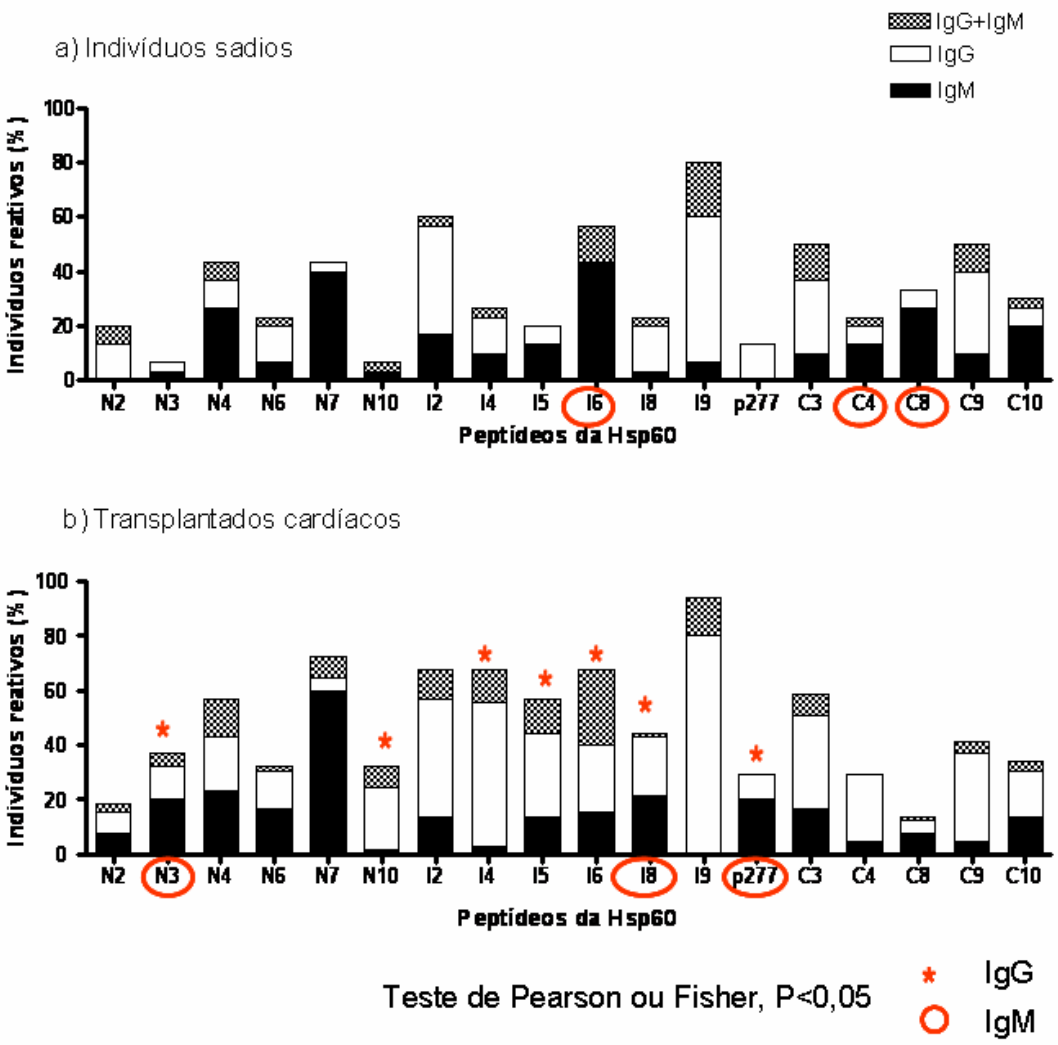


Figura 25. Porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos IgG reativos aos peptídeos da Hsp60 foi maior no grupo de indivíduos transplantados cardíacos: Os gráficos mostram as porcentagens de indivíduos positivos para os isotipos de anticorpos IgG, IgM ou ambos os isotipos no grupo de indivíduos sadios, n=30 (a) e no grupo de indivíduos transplantados, n=65 (b) em cada peptídeo da Hsp60 estudado (n=18). Nos peptídeos marcados com asterisco observa-se uma porcentagem de indivíduos transplantados significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgG ou IgM+IgG. Os peptídeos marcado em círculo apresentaram porcentagem de indivíduos positivos para os anticorpos do isoitpo IgM significantemente maior no grupo de transplantados ou indivíduos sadios (Teste Chi-Qadrado de Pearson ou Fisher, p<0,05).

4.3.4. Variação individual da intensidade de autorreatividade

Dois peptídeos foram escolhidos para a análise da variação individual (S2-20 da MC e C3 da Hsp60), devido a maior reconhecimento desses peptídeos pelos anticorpos IgG do grupo de transplantados cardíacos no momento da rejeição. Analisou-se individualmente a reatividade dos autoanticorpos ao longo do tempo no grupo de indivíduos sadios e nos indivíduos transplantados cardíacos. Observamos que a intensidade de autorreatividade humoral do grupo de indivíduos sadios foi estável ao longo de um ano (3 tempos), não só para os anticorpos do isotipo IgG, mas também para o isotipo IgM (Figura 26). Para o grupo de indivíduos transplantados cardíacos, a variabilidade da autorreatividade foi avaliada apenas graficamente, devido ao número de amostras muito heterogêneos entre os indivíduos que impossibilitou a análise estatística. No entanto, pôde-se observar que a variação da intensidade de reatividade foi maior nesse grupo (Figura 27). Comparamos as intensidades de autorreatividade contra os peptídeos S2-20 da MC e C3 da Hsp60 entre o momento de rejeição e de não rejeição do enxerto. Observamos que no momento da rejeição houve uma maior intensidade de autorreatividade para os anticorpos do isotipo IgG ($p<0,05$). Para os anticorpos do isotipo IgM, a mesma comparação foi realizada para os dois peptídeos, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 28).

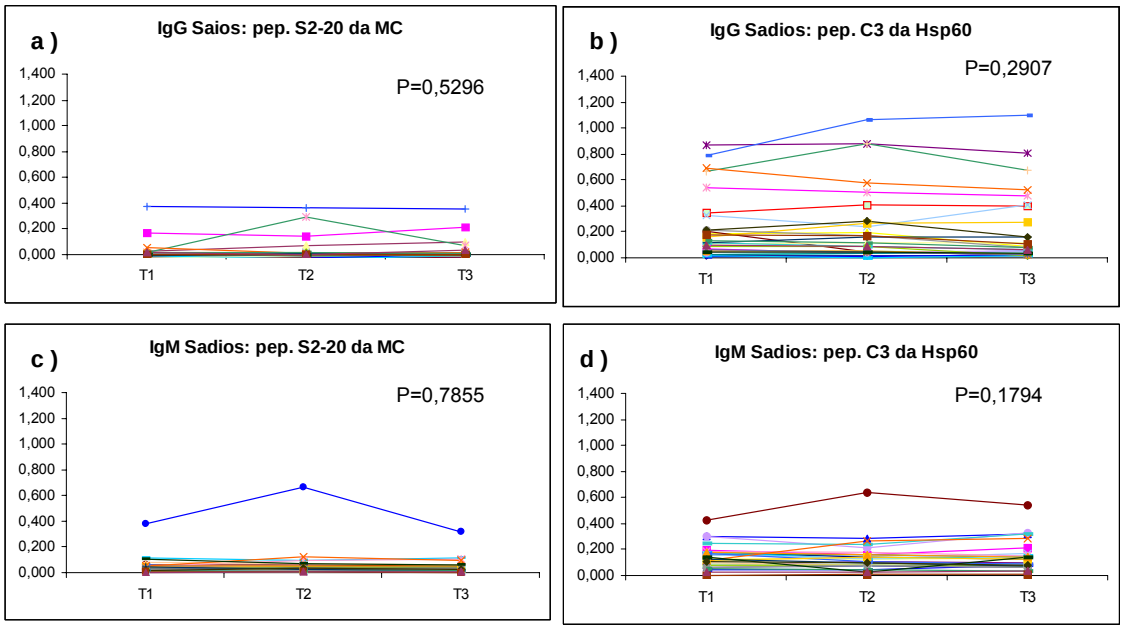


Figura 26. Variação da intensidade de autorreatividade humoral individual no grupo de indivíduos sadios ao longo do tempo: Os gráficos mostram as variações da intensidade de reatividade dos anticorpos IgG (a e b) e dos anticorpos IgM (c e d) reativos ao peptídeo S2-20 da miosina cardíaca e o peptídeo C3 da Hsp60 no grupo de indivíduos sadios (n=30) em três tempos sequenciais (T1, T2 e T3) com intervalo de seis meses entre os tempos. Os indivíduos com intensidade de reatividades maiores estão destacados com os respectivos números. Teste de Friedman α=0,05.

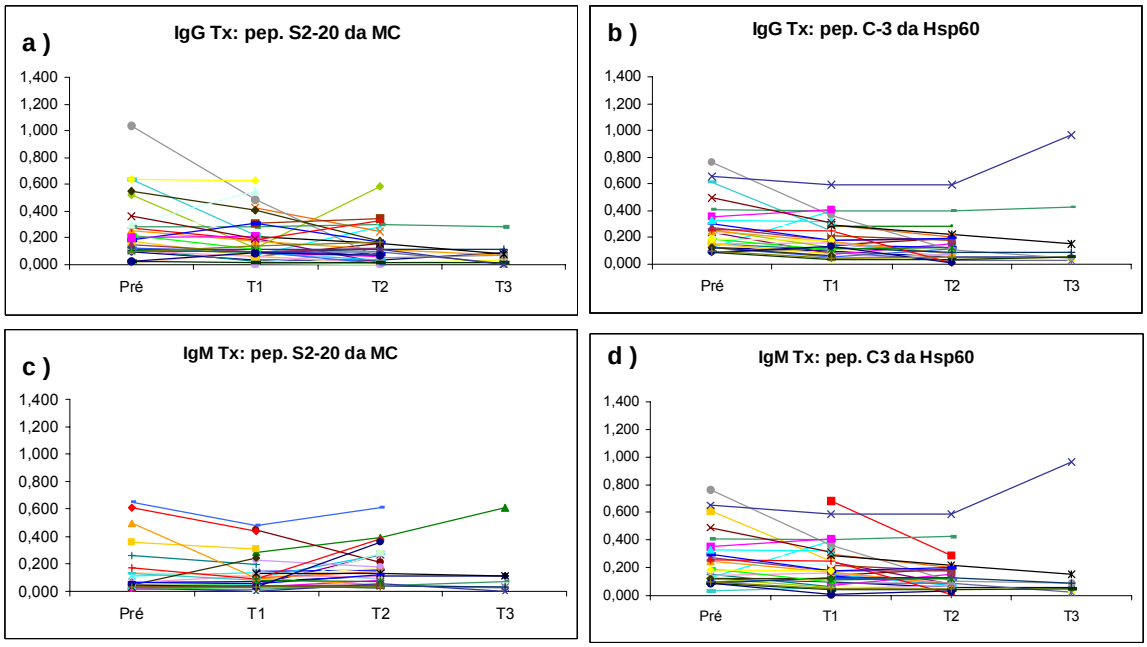


Figura 27. Variação da intensidade de autorreatividade humoral individual no grupo de indivíduos transplantados cardíacos ao longo do tempo: Os gráficos mostram as variações da intensidade de reatividade dos anticorpos IgG (a e b) e dos anticorpos IgM (c e d) reativos ao peptídeo S2-20 da miosina cardíaca e o peptídeo C3 da Hsp60 no grupo de indivíduos transplantados (n=44) no período de pré transplante e em três tempos de pós transplante: T1 (<1ano), T2 (1 a 5 anos) e T3 (>5 anos).

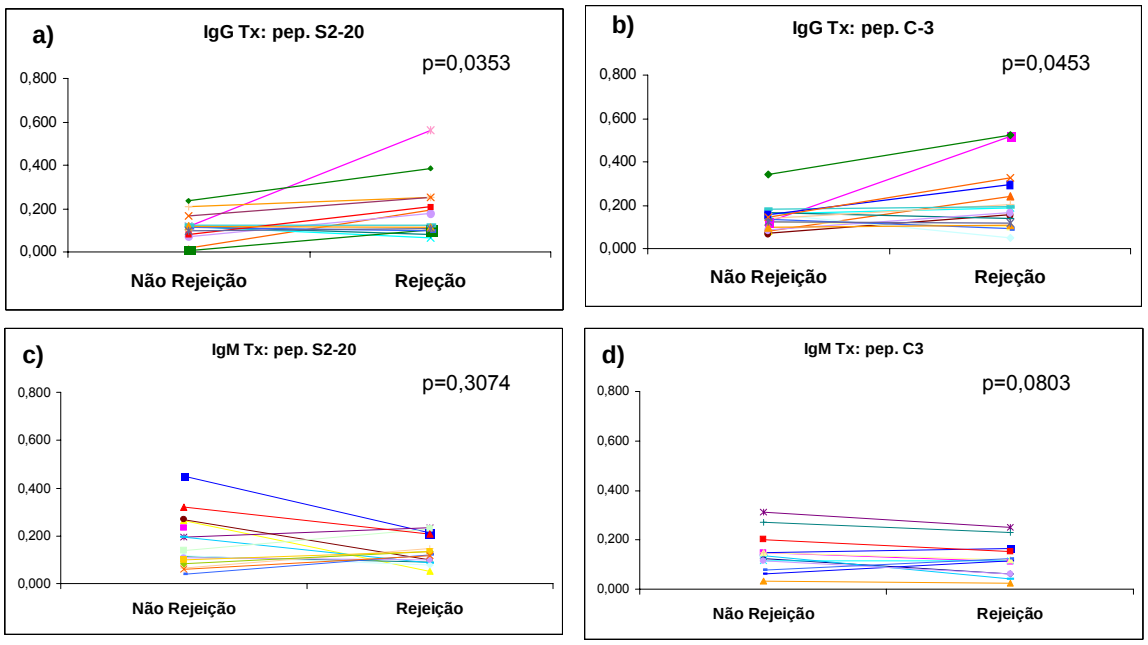


Figura 28. Comparação individual da intensidade de autorreatividade humoral entre o momento da rejeição e o momento de não rejeição do enxerto cardíaco: Os gráficos mostram as variações da intensidade de reatividade dos anticorpos IgG (a e b) e dos anticorpos IgM (c e d) dirigidos ao peptídeo S2-20 da miosina cardíaca e peptídeo C3 da Hsp60 nos dois momentos de estado clínico do indivíduo transplantado cardíaco (rejeição e não rejeição do enxerto) baseado no laudo da biópsia endomiocárdica. Teste de Wilcoxon α=0,05.

5 - DISCUSSÃO

No sentido de melhor compreender a autorreatividade humoral no estado fisiológico e no contexto do transplante, analisou-se, sequencialmente, o repertório de autoanticorpos dirigido aos peptídeos da miosina cardíaca e da Hsp60 no soro de indivíduos sadios (estudo prospectivo) e nos indivíduos transplantados cardíacos (estudo retrospectivo).

Vários grupos têm estudado o repertório de autoanticorpos utilizando diferentes ferramentas de pesquisa, dentre essas, a técnica de *Immunoblot* modificada ou Panamá blot, que permite a identificação de autoanticorpos que se ligam a proteínas de vários extratos de tecidos humanos (Nobrega et. al., 1993; Haury et. al., 1994). O uso de ferramentas de bioinformática, com "*immuno-chips*" contendo cerca de 100 autoantígenos pré-fixados, tem permitido identificação de padrões de autorreatividade dirigidos a determinados grupos de autoantígenos, e a diferenciação de padrões de reatividade associados com diabetes tipo I em relação a indivíduos saudáveis (Quintana et. al., 2003; Quintana et. al., 2004b). Nessas duas abordagens, a reatividade de autoanticorpos foi testada contra a proteína inteira e também contra peptídeos. Em trabalho anterior do nosso grupo, mostrou-se que a reatividade dirigida a diferentes epitopos da Hsp60, pôde permitir a identificação de respostas associadas com inflamação quanto aquelas potencialmente imunorreguladoras (Granja et. al., 2004). Por isso, no presente trabalho, os peptídeos da MC e da Hsp60 foram usados para determinar a reatividade dos autoanticorpos por meio da técnica de ELISA, a fim de identificar padrões de autorreatividade que possam auxiliar no

entendimento da resposta humoral no contexto de alotransplante e identificar peptídeos com potencial de aplicação para as pesquisas futuras.

A técnica de ELISA é relativamente fácil de ser executada, porém é muito importante garantir a sua validação. Para isso, foram utilizados os peptídeos com grau de pureza superior a 75% e, todos preencheram os critérios internos para a liberação dos peptídeos para o uso *"in vitro"* descrito em material e métodos. Utilizaram-se também diversos controles em todas as placas de ELISA. Além disso, as amostras de um mesmo indivíduo foram testadas em uma mesma placa para minimizar a variação interensaio.

Nos ensaios de ELISA, em geral, utilizam-se as proteínas para bloquear os espaços livres dos orifícios das placas após a sua sensibilização com o peptídeo de estudo, evitando-se assim, eventuais reatividades inespecíficas (Vogt, Jr. et. al., 1987). Nesse trabalho, a gelatina comercial proveniente da pele de porco foi utilizada para esta finalidade. Observamos que aproximadamente 10% dos indivíduos estudados tiveram reatividade de baixa intensidade à gelatina, tanto de IgG como de IgM (Anexo E). Em experimentos realizados com camundongos, visando testar a biossegurança das partículas magnéticas recobertas com gelatina de porco para fins terapêuticos na clínica, foi observado que os soros de animais que não tinham sido sensibilizados com estas partículas também tiveram reatividade à gelatina. Isto sugere que esses anticorpos fazem parte do repertório de anticorpos naturais, que provavelmente reagem cruzadamente com autoanticorpos (Ziv O et. al., 2008). Outros autores relatam que uma pequena porcentagem de crianças que receberam vacinas contendo a

gelatina como estabilizador, desenvolveram anticorpos IgG e IgE reativos à gelatina, podendo esses anticorpos causar o choque anafilático por hipersensibilidade (Sakaguchi et. al., 2000; Pool et. al., 2002). É possível que os anticorpos reativos à gelatina detectados em alguns indivíduos que participaram deste trabalho sejam os anticorpos naturais, ou mesmo provenientes da resposta à gelatina decorrente da vacina que recebeu na infância. Vale ressaltar que neste estudo, todas as amostras analisadas que tiveram reatividade à gelatina tiveram seus valores descontados dessas reatividades interferentes para se obter o valor específico da reatividade dirigida ao peptídeo testado.

Neste trabalho, observamos que todos os sujeitos de pesquisa reconheceram pelo menos um dos peptídeos da MC e da Hsp60 analisados (Tabelas 6 e 7). Os indivíduos sadios apresentaram os anticorpos dos isotipos IgG e IgM que reagiram não só aos peptídeos da Hsp60, mas também da MC, indicando que a resposta a estas proteínas faz parte do repertório fisiológico da autorreatividade. Nossos resultados, assim como aqueles de vários outros grupos de pesquisadores (Nobrega et. al., 1993; Coutinho et. al., 1995; Schwartz et. al., 2000; Quintana et. al., 2004a) refutam a teoria clássica da seleção clonal proposta por Burnet e o conceito de "*horror autotoxicus*" do Ehrlich. O primeiro, postula que a tolerância ao próprio ocorre graças à eliminação total de clones de linfócitos autorreativos e que a autoimunidade é indesejada em um organismo saudável (Burnet, 1959). O segundo postula que as respostas imunes contra as estruturas

próprias é um fenômeno patológico, sempre prejudicial ao organismo (Ehrlich et. al., 1957).

As moléculas conservadas na escala da evolução e expressas de forma ubiquitária são alvos de mimetismo molecular, ou seja, do reconhecimento cruzado entre as moléculas próprias e moléculas de patógenos, pelo sistema imunológico de um indivíduo (Kerner et. al., 1991; Shikhman et al., 1993; Mertz et al., 1994). Tem sido descrita na literatura a reatividade cruzada entre a miosina cardíaca e proteína M do *Streptococo* no contexto de doença cardíaca reumática (Guilherme et. al., 1995; Fae KC et. al., 2006), e com proteína B13 do *Tripanosmoma cruzi* no contexto da doença de Chagas (Cunha-Neto et. al., 1995; Iwai LK et. al., 2005) e vírus *Coxsackie* (Gauntt et. al., 1995). Alguns peptídeos da MC, como o peptídeo S2-11, 25 e 29, testados neste trabalho, foram reconhecidos por anticorpos do isotipo IgM de mais de 90% dos indivíduos sadios e transplantados (Figuras 3 e 8). Talvez a característica polirreativa dos anticorpos IgM (Haury et. al., 1997; Boes, 2000; Manson et. al., 2005) e provável homologia de sequência com micoorganismos tenham contribuído para a alta frequência de indivíduos reativos observada nos nossos resultados. A proteína Hsp60 tem homologia de sequência (score >50%) com inúmeros autoantígenos, como por exemplo: mieloperoxidase, citocromo p450, tireoglobulina, citoqueratina, miosina cardíaca, laminina, ácido glutâmicocomo (Jones DB et. al., 1993), e também com a proteína Hsp65 de microorganismos (Perschinka et. al., 2003). É possível que os anticorpos que reconheceram os nossos peptídeos também reconheçam cruzadamente outros antígenos

próprios ou de microorganismos. A propriedade polirreativa dos anticorpos faz parte do repertório de autoanticorpos fisiológico de um indivíduo, como já apontado por outros pesquisadores (Chen et al. 1995; Sercarz et. al., 2004)

Há a possibilidade que os autoanticorpos observados por nós neste trabalho, sejam anticorpos naturais. Os dados da literatura apontam os linfócitos B1 CD5+ como os principais produtores de anticorpos naturais (Hardy et. al., 2000; Boes, 2000a; Hardy, 2006). Há também um consenso de que essas células respondem fracamente a estímulos mediados pelo receptor (BCR) e que, raramente, passam por maturação de afinidade, produzindo principalmente os anticorpos do isotipo IgM (Baumgarth et. al., 2005). Em nosso trabalho, os indivíduos sadios apresentaram não só autoanticorpos do isotipo IgM, mas também IgG contra os peptídeos analisados, sugerindo que outras subpopulações de linfócitos B, além de B1 podem estar envolvidas. Há dados na literatura nos quais é sugerido que as células B efetoras comuns também podem produzir autoanticorpos (Avrameas et. al., 2007). Em trabalho realizado com clones de linfócitos B isolados de linfonodo de indivíduos sadios, foi mostrado que esses clones secretam anticorpos do isotipos IgM, IgG e IgA, "in vitro", e que esses anticorpos foram capazes de reagir contra um grande número de antígenos próprios e não próprios (Avrameas et. al., 2007). A outra população de células B com capacidade imunorreguladora (Breg) tem despertado interesse de pesquisadores da área de imunorregulação (Revisada por Mizoguchi et. A., 2006; Mauri et.al. 2008). Os dados existentes, até o momento, sobre Breg são baseados em modelos animais. Apesar de não

haver consenso entre os pesquisadores sobre o fenótipo dessas células, a maioria aceita que as Breg apresentam alta expressão da molécula CD1d de superfície e produzem IL-10 e/ou TGFβ com capacidade de regular negativamente o processo inflamatório em modelos experimentais de doenças autoimunes como: EAE (do inglês: *experimental autoimmune encephalomyelitis*); (Matsushita et. al., 2008), NOD (do inglês: *non-obese diabetic*); (Tian et. al., 2001) e CIA (do inglês: *collagen induced arthritis*); (Mauri et. al., 2003; Nakamura et. al., 2004). Pouco se sabe sobre a atividade funcional dos anticorpos produzidos pelas células Breg, alguns pesquisadores defendem que os anticorpos produzidos pelas células Breg são capazes de se ligar ao receptor FcγRIIB e sinalizam via ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), inibindo a atividade de apresentação do antígeno nas células dendríticas (Liu et. al., 2006). Em nosso trabalho, desconhecemos as células produtoras desses autoanticorpos e também não verificamos as atividades funcionais dos autoanticorpos detectados. No entanto, levando em consideração a alta frequência de reconhecimento dos peptídeos da MC e da Hsp60 pelo grupo de indivíduos sadios, pode ser que esses autoanticorpos que detectamos tenham um papel na manutenção da homeostase fisiológica e sejam importantes para a regulação do processo inflamatório no caso dos indivíduos transplantados cardíacos.

Observamos que a frequência de indivíduos positivos foi maior para os anticorpos reativos à MC do que para a Hsp60 nos dois grupos do estudo. Para discutir esses resultados, levantamos o seguinte: A Hsp60 é

uma proteína amplamente expressa em todos os tipos celulares do organismo, sendo constantemente liberada para a circulação pelas células em estresse ou células em apoptose (Hickman-Miller et. al., 2004). É possível que os anticorpos reativos à Hsp60 se liguem aos Hsps solúveis, diminuindo a frequência de anticorpos passíveis de detecção no teste de ELISA. A miosina cardíaca, por sua vez, é uma proteína intracelular, liberada somente quando ocorre lise do cardiomiócito. Por isso, no estado fisiológico, pouco antígeno circulante tornaria maior disponibilidade dos autoanticorpos ou anticorpos naturais com sítios de ligação livres, possibilitando a maior frequência de detecção desses anticorpos.

Observamos uma frequência de indivíduos sadios reativos à MC maior para os anticorpos do isotipo IgM do que para o isotipo IgG (Figura 3-a). Em contraste, no grupo de indivíduos transplantados, as frequências foram semelhantes para os dois isotipos anticorpos (Figura 8-a). Além disso, os peptídeos da MC que não foram reconhecidos pelos anticorpos IgG dos indivíduos sadios (S2: 19, 21, 22, 25, 27 e 29) foram todos reconhecidos pelos indivíduos transplantados. Quanto à reatividade dirigida à Hsp60, a frequência de reatividade dos anticorpos IgG e IgM foram semelhantes no grupo de indivíduos sadios (Figura 3-b). Porém, no grupo de indivíduos transplantados, a frequência de reconhecimento foi significantemente maior para os anticorpos do isotipo IgG dirigidos principalmente aos peptídeos da região intermediária da Hsp60, do que para o isotipo IgM (Figura 8-b). A literatura científica pode nos ajudar a interpretar esses resultados. Por exemplo, os clones de linfócitos B obtidos de tecidos linfóides de

camundongos na fase fetal produzem espontaneamente os anticorpos naturais do isotipo IgM, enquanto os anticorpos do isotipo IgG são obtidos somente a partir de linfócitos B do baço de camundongos adultos, após a administração de um ativador policlonal (Avrameas et. al., 2007). Vale lembrar que os antígenos conhecidos como T dependentes necessitam de sinais e citocinas fornecidas pelos linfócitos T ativados para a mudança do isotipo (Geha et. al., 2003). No contexto do transplante, outro trabalho em que os autores analisaram a mudança de isotipo no repertório de anticorpos dirigidos às moléculas HLA classe II nos indivíduos transplantados cardíacos, observaram que a mudança dos anticorpos do isotipo IgM para o IgG estava associada ao maior risco de rejeição celular e doença arterial coronariana (Lietz et. al., 2005). Em nossos resultados, observamos que a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgG ou IgG+IgM foi maior no grupo de transplantados para a maioria dos peptídeos da MC e da Hsp60. Em contraste, a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos do isotipo IgM foi maior no grupo de indivíduo sadios, principalmente, para a reatividade dirigida aos peptídeos da MC (Figuras 24 e 25). Com base no conjunto desses dados, sugerimos que houve um intenso processo de mudança de isotipo no grupo de transplantados. Uma possível explicação para estes resultados pode ser elaborada da seguinte maneira. O processo do transplante, como o ato cirúrgico e a exposição dos aloantígenos do doador geram um microambiente inflamatório que quebram a tolerância de linfócitos T e B autorreativos ao antígeno próprio. Estes, ao reconhecerem peptídeos derivados das proteínas alvo, montariam uma

resposta imunológica que culminaria na mudança do isotipo IgM, predominante no estado fisiológico, para o isotipo IgG, predominante no quadro de inflamação como ocorre no processo da rejeição do enxerto.

A intensidade de reatividade de anticorpos detectada no teste de ELISA sugere, indiretamente, a concentração de anticorpos no soro reativos àquele peptídeo. No estado fisiológico, observamos alta intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgM que reconheceram principalmente os peptídeos S2: 3 e 11 da MC (Figura 4-b e Anexo I). No entanto, para outros peptídeos da MC a intensidade de reatividade dos isotipos IgG e IgM foi maior nos indivíduos transplantados (Anexos J e K). Não observamos diferenças significantes na intensidade de reatividade dirigida aos peptídeos da Hsp60 entre os indivíduos sadios e transplantados (Figuras 4 e 9; Anexos L e M). Era de se esperar que os indivíduos transplantados tivessem mais reatividade contra a miosina cardíaca, devido às doenças cardíacas que esses indivíduos tiveram antes do transplante e, ao próprio procedimento do transplante e/ou eventos de rejeição que contribuem ainda mais para a exposição da proteína da MC ao sistema imune. Há registro na literatura, em que os pesquisadores analisaram os tecidos cardíacos obtidos da biópsia endomiocárdica por meio da eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE) e da espectrometria de massa, observaram que os indivíduos transplantados com rejeição celular grau 3 apresentaram maior expressão da cadeia pesada da miosina β em relação aos indivíduos que não tinham rejeição (Yamani et al., 2002).

Na análise da variabilidade do repertório de autoanticorpos, observamos que os indivíduos sadios não tiveram variação no número de peptídeos reconhecidos ao longo de um ano de observação (Figura 6). No entanto, no grupo de indivíduos transplantados, os anticorpos do isotipo IgG reconheceram mais peptídeos da MC nos períodos de pré-Tx. Após o transplante foram os anticorpos do isotipo IgM que reconheceram mais peptídeos. Não houve variação significante no número de peptídeos da Hsp60 reconhecidos nos dois períodos de transplante (Figura 11). Com relação à variabilidade da intensidade de reatividade dos autoanticorpos, observamos que a variação foi maior para a reatividade dirigida à MC; aproximadamente 50% e 80% dos indivíduos tiveram variação, para os indivíduos sadios e transplantados, respectivamente. Em contraste, 20% e 40% dos indivíduos tiveram variação na intensidade de reatividade dirigida à Hsp60 (Figuras 7 e 12). Escolhemos dois peptídeos: S2-20 da MC e C3 da Hsp60 que foram os mais reconhecidos pelos indivíduos transplantados no momento da rejeição para avaliar individualmente a intensidade de reatividade dos autoanticorpos em função do tempo. Observamos que a maioria dos indivíduos sadios apresentou autorreatividade humoral bastante estável ao longo de um ano de acompanhamento, porém, alguns indivíduos sadios tiveram alguma variação na intensidade da autorreatividade (Figura 26). Em contraste, no grupo de indivíduos transplantados, observamos maior variação na intensidade de autorreatividade (Figura 27). Essa variação da intensidade de autorreatividade indica, indiretamente, a variação da quantidade de anticorpos circulantes, e esta intensidade pode estar

associada ao processo de rejeição (Figura 28). Esses resultados nos permitem observar que o sistema imune está em constante ajuste no processo de manutenção do estado fisiológico. O procedimento do transplante expõe maior quantidade de autoantígenos que induz maior ativação da resposta imune, tanto celular quanto humoral, provavelmente, induzindo uma maior variação no repertório de autoanticorpos no grupo de indivíduos transplantados.

Na análise da frequência de indivíduos reativos em diferentes períodos de transplante, avaliamos o efeito da imunossupressão sobre o repertório de autoanticorpos junto com o efeito do estímulo por aloantígenos do doador e do processo inflamatório do transplante. As drogas imunossupressoras usadas pelos indivíduos transplantados para evitar rejeição foram: ciclosporina (inibidor de calcineurina), azatioprina (inibidor da síntese de ácidos nucléicos) e Prednisona (corticóide de ação antiinflamatória e imunossupressora). Esses medicamentos levam à deleção e ou inativação da população de linfócitos T (Mueller, 2004; Chan et. al., 2007). Sabe-se também, que a participação dos linfócitos T no processo de mudança de isotipo é muito importante, como já foi discutido na introdução. Por isso, é de se esperar que haja uma diminuição na frequência de indivíduos reativos aos peptídeos testados no período de pós-transplante. No entanto, nossos resultados mostram que as frequências de reatividade foram bastante semelhantes entre o período pré-Tx e os três períodos de pós-transplante, não só para os anticorpos do isotipo IgG, mas também para o isotipo IgM (Figura 15). Com base nesses resultados, sugerimos que o

esquema tríplice de imunossupressão utilizado pelos pacientes, deste estudo, pouco afetou a população de células B produtoras de autoanticorpos dirigidos a esses autoantígenos. É possível que a produção de autoanticorpos seja independente de células T, ou que os linfócitos B de memória que estejam atuando.

Observamos que a frequência de indivíduos reativos à MC foi maior no grupo com rejeição moderada do que o grupo de indivíduos sem rejeição (Figuras 16). Além disso, os anticorpos do isotipo IgG de indivíduos durante a rejeição também reconheceram mais peptídeos da MC do que no momento de não rejeição (Figura 19). Destacamos os peptídeos S2-20 da MC e C3 da Hsp60 que foram os mais reconhecidos por indivíduos no período pré-Tx e no momento de rejeição moderada. Comparando a intensidade da reatividade dos autoanticorpos contra esses dois peptídeos nos momentos da rejeição e de não rejeição, observamos uma intensidade de reatividade do isotipo IgG significantemente maior no momento da rejeição (Figura 28). Com base nessas observações, sugerimos que durante o processo de rejeição, ocorre uma maior ativação do sistema imune que leva também à maior mudança do repertório de autoanticorpos, principalmente para a reatividade dirigida à MC. Alguns autores sugerem o papel patológico dos autoanticorpos anti-MC na miocardite (Li et. al., 2006; Warraich et. al., 2006). Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de que parte desses anticorpos tenha alguma atividade imunorreguladora, como já discutido anteriormente para os anticorpos produzidos pelas células B reguladoras (Mizoguchi et. al., 2006) ou anticorpos naturais (Manson et.

al., 2005b; Mizoguchi et. al., 2006). A atividade funcional dos autoanticorpos reativos a esses peptídeos ainda é desconhecida, podendo ser o objeto de pesquisas futuras.

O grupo de indivíduos com doença vascular do enxerto (DVE) reconheceu um número de peptídeos diferente dos grupos com rejeição aguda (RAL e/ou RAM), no entanto, semelhante aos indivíduos sadios (Figuras 16 e 19). Devemos lembrar que o pequeno tamanho da amostra nesse grupo pode ser um viés e deve ser considerado. Mesmo assim, os dois tipos de rejeição analisados, neste trabalho, parecem possuir padrões de autoanticorpos diferentes. Acreditamos que a patogenia peculiar da DVE pode estar relacionada com a modificação do repertório de autoanticorpos de modo diferente da RAM que é caracterizado pelo infiltrado celular pró-inflamatórias no tecido cardíaco (Stewart et. al., 2005). Nesse sentido, é importante salientar que os processos patológicos da aterosclerose e da DVE têm muitas similaridades, como por exemplo, a lesão vascular com espessamento da camada íntima e proliferação das células musculares lisas (Libby et. al., 2001). Além disso, o mimetismo molecular entre a Hsp60 autóloga e a Hsp65 de micobactéria tem sido apontado como envolvido no desenvolvimento da aterosclerose através do desencadeamento de respostas autoimunes pró-inflamatórias (Afek et. al., 2000; Perschinka et. al., 2003; Wick et. al., 2004).

Na análise da autorreatividade humoral dos indivíduos no período pré-Tx considerando-se as cardiopatias de base, observamos que a frequência de indivíduos positivos para os anticorpos dirigidos à MC foi maior no grupo

de indivíduos com cardiopatia chagásica do que nos outros grupos. No entanto, não houve diferença significante na mesma comparação feita para a reatividade dirigida à Hsp60 (Figura 17). Em comparação com os grupos de cardiopatias dilatada e isquêmica, os indivíduos com cardiopatia chagásica mostraram ter tendência para maior frequência de reconhecimento de peptídeos da MC pelos anticorpos IgM e, os peptídeos da Hsp60 por anticorpos IgG (Figura 21). Com base nessas observações, sugerimos que a fisiopatologia de cada cardiopatia pode levar a uma resposta humoral diferenciada a esses autoantígenos. E o repertório de autoanticorpos que o indivíduo apresenta antes do transplante pode influenciar na evolução do transplante, favorecendo ou prejudicando a aceitação enxerto pelo organismo do indivíduo transplantado. Em um trabalho multicêntrico no qual se analisou a sobrevida de 720 indivíduos que foram submetidos ao transplante ortotópico de coração, os autores observaram que o grupo de indivíduos que tinham cardiopatia chagásica antes do transplante teve melhor sobrevida do que o grupo de cardiopatia isquêmica que recebeu o mesmo protocolo de imunossupressão (Bocchi et. al., 2001). É possível que a melhor evolução do transplante cardíaco, observada nos indivíduos chagásicos, esteja associada a maior mobilização dos componentes do sistema imune contra a parasita e, talvez, favorecendo a produção de algum tipo de citocina (Zhang et. al., 1996; Cunha-Neto et. al., 1998) que atua na regulação do processo de rejeição do transplante.

Comparamos o número de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos sadios e indivíduos transplantados em vários períodos do Tx (Figura 23).

Observamos que no estado fisiológico, os anticorpos do isotipo IgM reconheceram mais peptídeos do que do isotipo IgG. No entanto, no período pré-Tx que corresponde à fase de maior gravidade da doença cardíaca, observamos que houve uma inversão do isotipo, ou seja, os anticorpos do isotipo IgG reconheceram mais peptídeos do que o isotipo IgM. No T1 (<1 ano de Tx) observamos que os dois isotipos de anticorpos reconhecem um número semelhante de peptídeos. No tempo T2 (1 a 5 anos de Tx) o padrão de reconhecimento foi semelhante ao grupo de indivíduos sadios. É Interessante observar que no período T3 (> 5 anos de Tx), quando a maioria dos indivíduos transplantados desse tempo teve a DVE, o padrão de reconhecimento foi semelhante àquele do Pré-Tx. Esses resultados confirmam, mais uma vez, que o repertório de autoanticorpos dirigidos à miosina cardíaca e à Hsp60 é predominantemente do isotipo IgM no estado fisiológico. No estado da doença cardíaca e durante a rejeição do enxerto ocorre uma maior mudança de classe de isotipo para IgG.

Em relação aos peptídeos imunodominantes da MC reconhecidos pelos anticorpos do isotipo IgG, nós identificamos o peptídeo S2-30, o qual foi reconhecido por 60% dos indivíduos sadios (Figura 3) e, o peptídeo S2-4 foi reconhecido por 74% dos indivíduos transplantados (Figura 8). No modelo murino experimental de miocardite, o peptídeo S2-28 foi descrito como sendo imunodominante (Li al., 2004). No nosso trabalho, o peptídeo S2-28 foi reconhecido de modo semelhante pelos indivíduos sadios e transplantados (± 40% dos indivíduos). Acreditamos que essa diferença seja devido à variação genética entre as espécies. No mesmo trabalho

anteriormente citado, o peptídeo S2-16 foi identificado como capaz de induzir miocardite em rato Lewis, sugerindo ser capaz de desencadear uma resposta imune pró-inflamatória. Em nossos resultados, observamos que o peptídeo S2-16 foi reconhecido por 17% dos indivíduos sadios e 34% dos indivíduos transplantados. Quando analisamos a frequência de indivíduos reativos ao peptídeo S2-16 em relação ao tipo de rejeição, pôde-se observar que esse peptídeo foi reconhecido por 21% dos indivíduos com RAM, pouco reconhecido pelos indivíduos SR (9%) e não foi reconhecido pelo grupo com DVE (Figura 16). Com base nesses dados, podemos sugerir uma possível participação dos linfócitos T e B reativos ao peptídeo S2-16 no processo da rejeição aguda do enxerto cardíaco. Considerando que a produção de anticorpos IgG é predominantemente dependente de linfócitos T, podemos sugerir que também os linfócitos T autorreativos estejam envolvidos.

Em nosso grupo, o peptídeo I-9 da Hsp60 foi apontado como peptídeo com potencial imunorregulador por induzir maior produção de IL-10 por PBMC de pacientes transplantados renais em cultura (Caldas et. al., 2006). No presente trabalho, observamos que este peptídeo foi imunodominante para os anticorpos do isotipo IgG, não só no grupo de indivíduos sadios (73%) como também no grupo de indivíduos transplantados (95%). Vale lembrar que no nosso trabalho analisamos IgG total. Assim, pode ser que as subclasses de IgG sejam diferentes entre os dois grupos, visto que as citocinas do microambiente podem favorecer a mudança de diferentes subclasses de anticorpos, como já descrito na introdução dessa dissertação (Spiegelberg et al.,1991; Harriman et al., 1993; Paul et al., 1994). Caldas e

colaboradores também observaram que a fração da região C-terminal da Hsp60 foi capaz de induzir a produção de citocinas IL-10 na cultura de PBMC autóloga (Caldas et al., 2006). No presente trabalho, a frequência de indivíduos reativos aos peptídeos do fragmento C-terminal da Hsp60 foi semelhante entre os indivíduos sadios e transplantados (Figura 14).

Entre as várias funções biológicas dos anticorpos do isotipo IgM, a mais conhecida é a sua capacidade de eliminar os patógenos no início de uma infecção (Boes, 2000). Mais recentemente, tem sido discutida também a sua capacidade de regular processos inflamatórios, como em doenças autoimunes (Manson et. al., 2005). Nós observamos que o peptídeo N7 da Hsp60 foi reconhecido preferencialmente pelos anticorpos do isotipo IgM, sendo 50% e 67% dos indivíduos positivos nos grupos de sadios e transplantados, respectivamente. O peptídeo N7 foi muito pouco reconhecido pelos anticorpos IgG, ou seja, foi reconhecido somente por 3,3% dos indivíduos sadios e 12,3% dos indivíduos transplantados. Além disso, somente 6% dos indivíduos transplantados tiveram anticorpos de ambos os isotipos reativos ao peptídeo N7. Outro peptídeo da Hsp60 (I-6) foi reconhecido por anticorpos IgM de 70% dos indivíduos sadios, e somente por 18% dos indivíduos no momento da rejeição (Figura 22-b). Com base nesses resultados, sugerimos que os peptídeos N7 e I-6 sejam fracos indutores de mudança de isotipo de anticorpo, podendo ser interessante investigar o seu papel imunorregulador em pesquisas futuras.

No presente trabalho, nós contribuímos para um melhor conhecimento sobre o repertório de autoanticorpos dirigidos à MC e à Hsp60 no contexto

fisiológico e no transplante. Observamos que o repertório de autoanticorpos está em constante ajuste para manter o equilíbrio do organismo. Observamos que a variação da autorreatividade é menor no estado fisiológico do que na doença cardíaco ou na rejeição, não só em relação à intensidade de reatividade, mas também em relação ao número de peptídeos reconhecidos. Nossos resultados apontam um padrão de autoanticorpos predominantemente do isotipo IgM no estado fisiológico e, do isotipo IgG em cardiopatias ou na rejeição do aloenxerto. Com base nos nossos resultados, sugerimos que um dos mecanismos do sistema imune para a manutenção da homeostase é a ativação dos linfócitos B quiescentes produtores de anticorpos IgM, mediados pelos linfócitos T. Esses linfócitos B ativados sofrem processo de mudança de isotipo de anticorpo, passando a produzir os anticorpos do isotipo IgG. Os anticorpos IgG, além da ação efetora também teriam o efeito inibitório sobre o sistema imune. No entanto, a função biológica desses autoanticorpos não foi investigada.

Identificamos alguns peptídeos da MC (S2:19, 21, 22, 25, 27 e 29) que foram reconhecidos exclusivamente pelos anticorpos IgG de indivíduos após a lesão cardíaca. Alguns peptídeos com reatividades mais relevantes também foram identificados, por exemplo, os peptídeos: N7 e I-6 da Hsp60, que foram reconhecidos preferencialmente pelos anticorpos IgM de indivíduos sadios. Levando em consideração o papel imunorregulador dos autoanticorpos IgM, esses peptídeos podem ter papel importante na manutenção da homeostase. Outros dois peptídeos, S2-20 da MC e C3 da Hsp60 destacam-se por serem mais reconhecidos pelos indivíduos

transplantados no período pré-Tx e no momento de rejeição moderada do que no momento de não rejeição do enxerto. Na continuidade desse estudo, será importante analisar as características funcionais desses anticorpos, se são patogênicos ou possuem capacidade de regular negativamente uma resposta inflamatória.

6 - CONCLUSÕES

1. Autoanticorpos dirigidos a diferentes peptídeos da miosina cardíaca e à Hsp60 foram detectados em indivíduo sadios, indicando a existência de autorreatividade fisiológica dirigida a essas duas proteínas.
2. A frequência de positividade e os números de peptídeos reconhecidos pelos indivíduos transplantados diferiram daqueles observados nos indivíduos sadios, indicando que o repertório de autoanticorpos dirigidos a esses antígenos se modifica com o estado de doença do indivíduo.
3. A predominância de indivíduos positivos para os anticorpos IgM nos indivíduos sadios e, os anticorpos IgM e IgG ou somente IgG nos transplantados cardíacos, nos permite interpretar que no transplante, ocorre ativação de linfócitos T e B autorreativos que leva à troca de isotipo.
4. Os indivíduos transplantados reconheceram todos os peptídeos testados, inclusive os peptídeos que não foram reconhecidos pelos anticorpos IgG de indivíduos sadios (S2: 19, 21, 22, 25, 27, e 29). Esse resultado nos permite sugerir que o processo de transplante expõe antígenos ao sistema imune que não são reconhecidos no estado fisiológico.
5. A observação de que a reatividade aos peptídeos da Hsp60 (N7) e da MC (S2: 11, 25, 26 e 29) foi predominantemente do isotipo IgM nos leva a sugerir que os linfócitos B produtores desses peptídeos quase não sofreram mudança de isotipo e, talvez esses linfócitos B possam exercer atividade imunorreguladora.

7 – ANEXO

Anexo A: Perfil demográfico do grupo de indivíduos sadios (n=30).

Nº.	Iniciais	Sexo	Cor	Idade na 1ª. Coleta* (anos)
1	SRS	F	Br	23
2	WS	M	Ng	31
3	CRB	M	Br	58
4	GPM	F	Br	25
5	CL	F	Br	25
6	ASS	M	P	30
7	CSV	M	Br	36
8	MLM	F	Br	42
9	DC	M	Br	35
10	EP	M	Br	38
11	FFS	M	Br	24
12	LCFT	F	Br	27
13	FTH	M	Am	26
14	SF	F	Br	40
15	JCSS	M	P	30
16	CC	F	Br	29
17	BSS	F	Br	30
18	VLC	F	Br	23
19	RMS	F	P	27
20	NGM	F	Br	23
21	SMM	F	Br	37
22	RMO	F	P	27
23	SP	F	Br	56
24	CA	F	Br	33
25	REA	F	Br	26
26	CEP	M	P	25
27	SEO	F	Am	34
28	LHT	F	Am	43
29	CROP	M	Br	36
30	LAL	M	P	46

F, feminino; M, masculino; Br, branca; Ng, negra; P, parda; Am, amarela.

* Em cada indivíduo sadio foram coletadas 3 amostras seqüências, com intervalo de 6 meses entre as coletas.

Anexo B: Perfil demográfico dos indivíduos transplantados cardíacos (n=65)

Nº.	Iniciais	Sexo	Idade no Tx (anos)	óbito*	Doença de Base	No. de amostras disponíveis	Soro Pré-Tx disponível	Laudos de biópsias disponíveis
1	CMSM	M	62	Sim	Dilatada	2	Sim	RAM
2	CLS	M	43	Sim	Dilatada	2	Não	RAL, SR
3	GMF	M	45	Sim	Dilatada	2	Sim	SR
4	GNV	M	27	Sim	Dilatada	2	Não	RAL, SR
5	GMN	M	38	Sim	Dilatada	2	Não	RAM, RAL
6	HMN	F	60	Sim	Dilatada	6	Não	SR
7	IMA	F	NT	Sim	Dilatada	3	Não	RAM, RAM, DVE
8	IFA	M	45	Sim	Dilatada	6	Não	SR, RAL
9	JEH	M	44	Sim	Dilatada	2	Não	SR
10	MCA	F	48	Sim	Dilatada	5	Não	SR, RAL
11	NSA	M	53	Sim	Dilatada	2	Não	RAL, SR
12	RB	M	40	Sim	Dilatada	2	Sim	RAL
13	SS	M	35	Sim	Dilatada	3	Não	RAL, SR, RAM
14	SOV	F	50	Sim	Dilatada	2	Não	RAM
15	AG	M	48	Não	Dilatada	4	Sim	RAL, RAM
16	ACJ	M	38	Não	Dilatada	3	Sim	RAL
17	JEC	M	51	Não	Dilatada	3	Sim	RAL
18	MMF	F	11	Não	Dilatada	3	Sim	RAM, RAM
19	BVB	M	21	Não	Dilatada	2	Sim	RAM
20	GA	M	46	Não	Dilatada	2	Não	RAM, SR
21	HAS	M	51	Não	Dilatada	2	Sim	SR

*óbito (informação obtido em janeiro de 2004). NT,Não tem esta informação.
Tx, transplante; M, masculino; F, feminino; SR, sem rejeição; RAL, rejeição aguda leve ou grau 1; RAM, rejeição aguda moderada ou grau 3; DVE, doença vascular do enxerto.

Anexo B: Continuação

Nº.	Iniciais	Sexo	Idade no Tx (anos)	óbito*	Doença de Base	No. de amostras disponíveis	Soro Pré-Tx disponível	Laudos de biópsias disponíveis
22	SRF	M	46	Não	Dilatada	3	Sim	DVE, DVE
23	JLF	M	60	Não	Dilatada	3	Sim	RAL, DVE
24	JF	M	62	Não	Dilatada	3	Sim	SR
25	LMP	F	38	Não	Dilatada	4	Sim	RAL, SR, RAM
26	LA	M	66	Não	Dilatada	2	Sim	RAM
27	MO	M	41	Não	Dilatada	2	Sim	RAM
28	MES	F	59	Não	Dilatada	4	Sim	RAL, RAM
29	CF	M	49	Sim	Isquêmica	3	Não	SR, RAL
30	CV	M	58	Sim	Isquêmica	4	Não	RAL, RAM, SR, DVE
31	ES	M	49	Sim	Isquêmica	3	Sim	SR
32	FAB	M	48	Sim	Isquêmica	3	Não	RAL, SR
33	JCCG	M	41	Sim	Isquêmica	2	Não	SR
34	JCSA	M	47	Sim	Isquêmica	5	Sim	SR, RAL, RAM
35	PBS	M	33	Sim	Isquêmica	2	Sim	RAL
36	VB	M	38	Não	Isquêmica	7	Sim	SR, RAL, DVE
37	LCF	M	40	Não	Isquêmica	3	Sim	SR
38	AEA	M	NT	Não	Isquêmica	2	Não	RAL, RAM
39	CAS	M	56	Não	Isquêmica	3	Sim	RAM, RAL
40	DRSM	M	68	Não	Isquêmica	2	Sim	RAM
41	GP	M	62	Não	Isquêmica	2	Sim	RAL
42	MF	M	59	Não	Isquêmica	2	Sim	NT

*óbito (informação obtido em janeiro de 2004). NT,Não tem esta informação.
Tx, transplante; M, masculino; F, feminino; SR, sem rejeição; RAL, rejeição aguda leve ou grau 1; RAM, rejeição aguda moderada ou grau 3; DVE, doença vascular do enxerto.

Anexo B: Continuação

Nº.	Iniciais	Sexo	Idade no Tx (anos)	Óbito*	Doença de Base	No. de amostras disponíveis	Soro Pré-Tx disponível	Laudos de biópsia disponíveis
43	OV	M	42	Não	Isquêmica	3	Sim	RAL
44	RF	M	42	Não	Isquêmica	4	Sim	RAL, SR, DVE
45	JF	M	52	Não	Isquêmica	2	Sim	NT
46	EM	M	46	Sim	Chagásica	4	Sim	SR, RAM
47	LJS	M	11	Sim	Chagásica	2	Sim	RAM
48	OMV	M	43	Sim	Chagásica	4	Sim	SR
49	BP	M	39	Não	Chagásica	4	Não	RAM
50	SCS	M	32	Sim	Chagásica	5	Sim	RAM, SR
51	CJAJ	M	34	Não	Chagásica	5	Sim	RAM, RAM
52	EOV	F	31	Não	Chagásica	2	Sim	RAL
53	MOF	M	31	Não	Chagásica	3	Sim	RAL
54	MCS	F	41	Não	Chagásica	2	Sim	RAM
55	RAF	M	50	Não	Chagásica	3	Não	RAL, SR
56	CKH	M	20	Sim	Reumática	6	Não	SR, RAL
57	JSV	M	57	Sim	Reumática	4	Não	RAL, SR
58	AF	M	50	Sim	Reumática	2	Não	SR
59	CAO	M	35	Sim	Reumática	4	Sim	RAL, RAL, RAL
60	EAS	M	18	Não	Restritiva	3	Sim	RAL
61	RVQL	M	9	Não	Restritiva	3	Sim	RAL, DVE
62	RVS	M	14	Sim	Restritiva	4	Sim	SR, RAM, RAM
63	MCM	F	47	Não	Idiopática	3	Sim	SR, DVE
64	ACM	M	NT	Não	Idiopática	2	Não	RAM
65	CASCS	F	30	Não	C.Periparto	3	Não	RAL

*óbito (informação obtido em janeiro de 2004). NT,Não tem esta informação.
Tx, transplante; M, masculino; F, feminino; SR, sem rejeição; RAL, rejeição aguda leve ou grau 1; RAM, rejeição aguda moderada ou grau 3; DVE, doença vascular do enxerto.

Anexo C: Localização dos 18 peptídeos da Hsp60 estudados no presente trabalho.

```
MLRLPTVFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAGDGTTTATVLARSIAKE
               RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
               N2 (16-35)       KFGADARALMLQGVDLLADA
                                 N3 (31-50)     LLADAVAVTMGPKGRTVIIE
                                                 N4 (46-65)
                                                                          DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
                                                                          N6 (76-95)  KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
                                                                                        N7 (87-110)

GFEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKFDRGYISPYFINTSKGQKCEFQDAYVLLSEKKIS

         NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL                                                                  YISPYFINTSKGQKCEFQDA
             N10 (136-155)                                                                       I-2 (223-242)

SIQSIVPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEGLTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQL
                KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
                I-4 (269-289)     TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD
                                      I-5 (285-307)                 GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH
                                                                    I-6 (321-340)
                                                                                          DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
                                                                                           I-8 (353-372)      QEIIEQL

DVTTSEYEKEKLNERLAKLSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLGGGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYD
DVTTSEYEKEKLN
  I-9 (372-391)
                                                                    PALDSLTPANEDQKIGIEII
                                                                    C3 (449-468)      GIEIIKRTLKIPAMTIAKNA
                                                                                       C4 (464-483)
                                                        VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED
                                                                  p277 (437-460)

AMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAAGVASLLTTAEVVVTEIPKEEKDPGMGAMGGMGGGMGGGMF

                PTKVVRTALLDAAGVASLLTTAE
                  C8 (521-543)      LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM
                                     C9 (539-558)    KDPGMGAMGGMGGGMGGGMF
                                                      C10 (554-573)
```

Em preto: seqüência polipeptídica da hsp60 humana; em verde: peptídeos estudados, e em vermelho destacam-se as sobreposições entre as seqüências peptídicas.

Anexo D : Padronização da técnica de ELISA

Obtenção do soro controle anti-S2-10

Escolhemos o peptídeo S2-10 para a padronização da técnica de ELISA, pois cerca de 30% dos indivíduos sadios reconhecem esse peptídeo, de acordo com a informação fornecida pela pesquisadora colaboradora deste trabalho, Dra. Madaleine Cunningham (University of Oklahoma Health Sciences Center, Okalahoma, USA). Com base nessa informação, fizemos uma triagem de 90 amostras de soros de indivíduos sadios frente ao peptídeo S2-10 e, desse modo, identificamos sete indivíduos do grupo de sadios (23,3%), em um total de 19 amostras positivas. Com esta estratégia, foram feitos dois "*pools*" de 10 soros, um positivo e outro negativo que foram usados, posteriormente, como controles do ensaio de ELISA.

Diluição ótima de soro

Utilizamos a concentração de 4 µM do peptídeo S2-10, que corresponde a aproximadamente 10 µg/ml, para sensibilizar as placas, por esta concentração ser mais comumente usada no ensaio de ELISA (Lauer,1994; Cohen,2003; Cunningham,2004). Uma vez definida a concentração do peptídeo, testamos cinco soros de indivíduos sadios positivos para o peptídeo S2-10 em diluições seriadas (1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400).

A diluição ótima encontra-se entre 1/25 a 1/100, portanto, optamos pela diluição de 1/100 por esta diluição ser mais usada na literatura

pertinente e, pela limitação de material biológico de algumas amostras dos indivíduos transplantados (Figura 1).

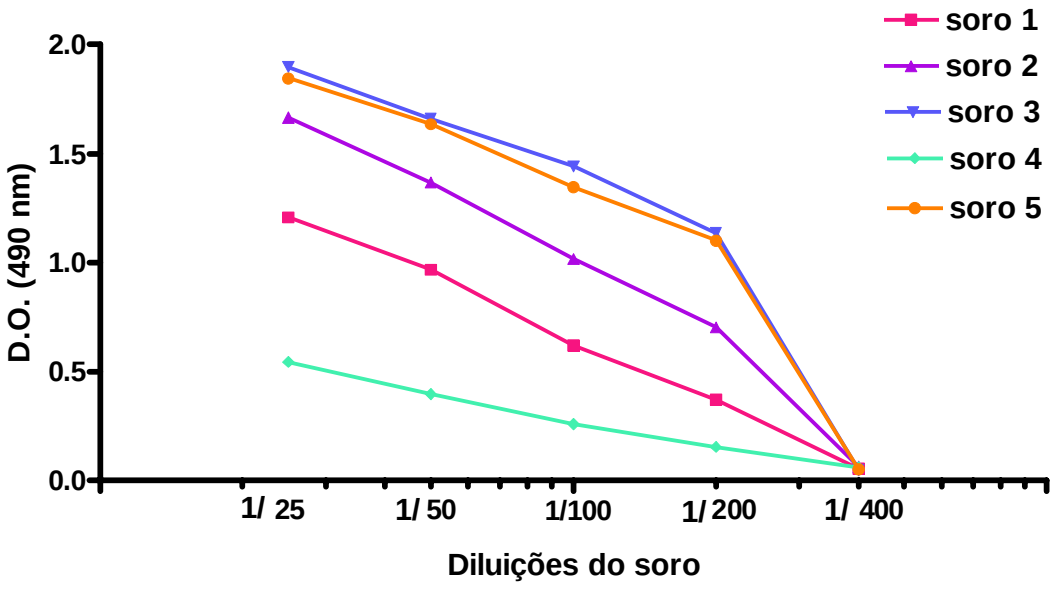


Figura 1. Determinação da diluição ótima de soro anti S2-10 no ELISA: O teste foi realizado com cinco soros de indivíduos sadios nas diluições de 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400 na placa sensibilizada com 4 µM do peptídeo S2-10 da miosina cardíaca. Após a adição do conjugado e do substrato, a intensidade da reação foi medida na leitora de ELISA a 490 nm.

Concentração ótima de Peptídeo

Para facilitar a solubilidade, os peptídeos liofilizados foram diluídos inicialmente com 200 µl de dimetil-sulfóxido (Merk, Darmstadt, Alemanha), sendo depois completados com o volume suficiente de tampão PBS para se obter uma solução de estoque de 300 µM.

As concentrações de 0,4; 2; 4 e 40 µM do peptídeo S2-10 foram usadas para sensibilizar as placas de ELISA, com a finalidade de determinar a sua concentração ideal para o sistema. Subseqüentemente, as placas foram testadas contra cinco soros de indivíduos sadios positivos para o peptídeo S2-10 na diluição de 1/100. A concentração de 4 µM do peptídeo

mostrou-se adequada para a máxima reatividade dos soros, inclusive de um soro (#4) com baixo título de anticorpos (Figura 2).

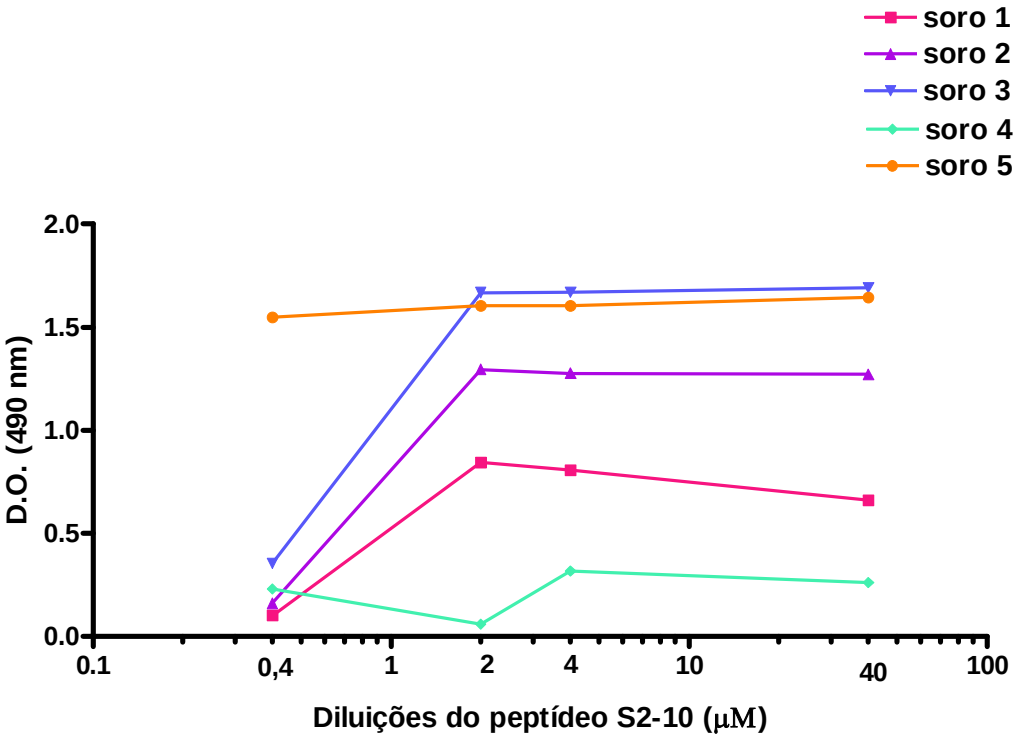


Figura 2. Determinação da concentração ótima do peptídeo para ELISA: Os soros diluídos 1/100 foram testados contra o peptídeo S2-10 da miosina cardíaca nas concentrações de 0,4, 2, 4 e 40 μM. As leituras das densidades óticas foram realizadas no leitor de ELISA a 490 nm.

Titulação dos conjugados imunoenzimáticos

Os conjugados imunoenzimáticos utilizados neste trabalho foram os anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanas marcados com peroxidase produzidos em coelhos (lote 9839, Sang Stat, Menlon Park, CA, EUA) e (lote A-4290, Sigma, Steinhein, Alemanha), respectivamente. Para a sua titulação, diluições seriadas dos conjugados imunoenzimáticos foram adicionadas às placas previamente sensibilizadas com 4 μM do peptídeo S2-10 e incubadas com o soro positivo diluído 1/100. O título do conjugado anti-

IgG ficou definido em 1/60.000 e do IgM 1:2.500 por apresentarem D.O. próximas de 2,0 conforme orientação dos fabricantes (Figuras 3 e 4).

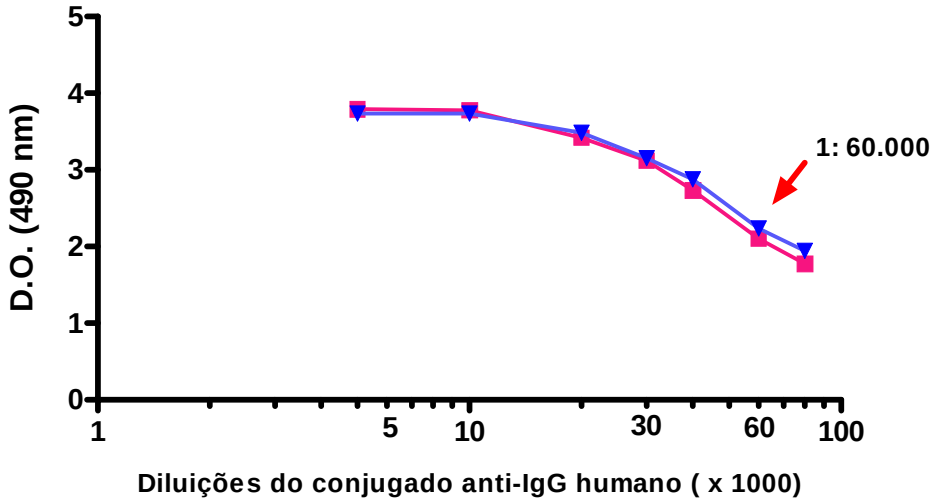


Figura 3. Titulação do conjugado anti-IgG humano: as diluições seriadas de 1/5.000 a 1/ 80.000 do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase foram testadas por ensaio de ELISA. Diluição ótima: 1:60.000.

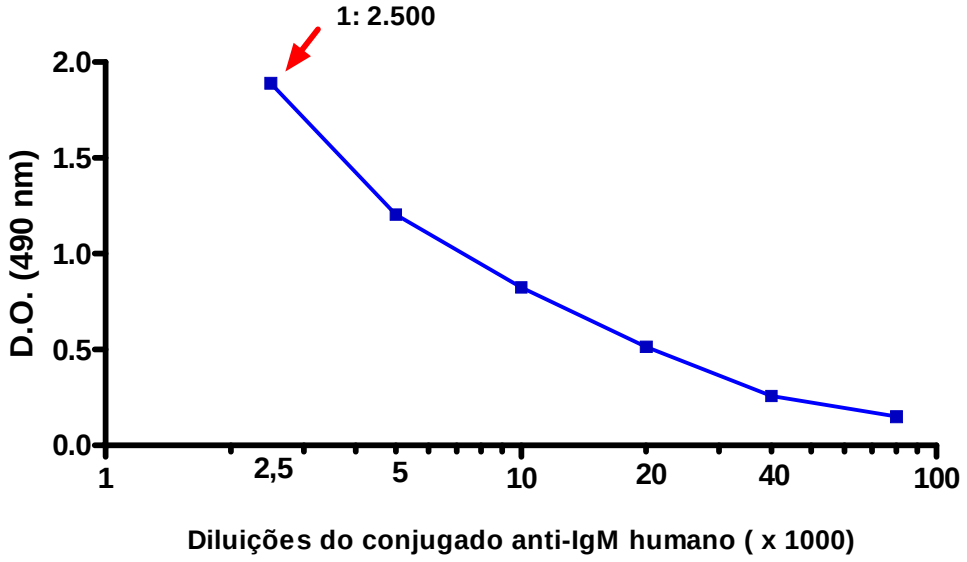


Figura 4 - Titulação do conjugado anti-IgM humano: as diluições seriadas de 1/ 2.500 a 1/ 80.000 do conjugado anti-IgM humano marcado com peroxidase foram testadas por ensaio de ELISA. Diluição ótima: 1:2.500.

Anexo E: Reatividade à gelatina

A reatividade à gelatina foi verificada com o objetivo de avaliarmos o grau de interferência de anticorpos reativos à gelatina no ensaio de ELISA, ou seja, ligações inespecíficas que poderiam falsamente aumentar a reatividade de anticorpos de interesse. Para isso, as amostras de soro foram testadas em duplicata nas placas sensibilizadas apenas com a gelatina e repetidos em três rotinas distintas.

Quanto às freqüências de indivíduos reativos à gelatina, considerou-se como indivíduo positivo para os anticorpos reativos à gelatina se ao menos uma das amostras do indivíduo apresentasse reatividade superior à D.O. de 0,170.

Com relação ao isotipo IgG reativos à gelatina, observamos que 13,3% (4/30) dos pacientes avaliados foram positivos, enquanto nenhum indivíduo sadio apresentou anticorpos IgG contra a gelatina. As frequências de indivíduos positivos para IgM anti-gelatina no grupo de transplantados cardíacos foi discretamente maior do que no grupo de sadios; observamos que 10,8% (7/65) dos indivíduos transplantados cardíacos e apenas 6,7 % (2/30) dos indivíduos sadios apresentaram a reatividade dos anticorpos IgM contra a gelatina.

Em média, aproximadamente 10% dos indivíduos analisados apresentaram anticorpos IgG e/ou IgM contra a gelatina extraída de pele de porco. No entanto, essa reatividade foi de baixa intensidade, pois as D.Os. nas 6 amostras de pacientes positivos para os anticorpos IgG variaram entre 0,185 a 0,249. A reatividade de IgM anti-gelatina das 16 amostras positivas

(3 amostras de indivíduos sadios e 13 amostras de pacientes) variou entre D.O. de 0,180 a 0,365 (Figura 5).

Neste trabalho, as amostras que apresentaram reatividade dirigida à gelatina superior à D.O. de 0,100 tiveram seus valores obtidos em condições testadas com os peptídeos descontados do valor obtido na gelatina, a fim de se obter resultados mais fidedignos. Assim sendo, na análise dos resultados, a reatividade dos anticorpos do isotipo IgG: 30,2% (52/172) das amostras e IgM: 24,2% (70/289) das amostras tiveram os valores descontados das reatividades contra a gelatina, para se obter o valor mais específico da reatividade dirigida ao peptídeo.

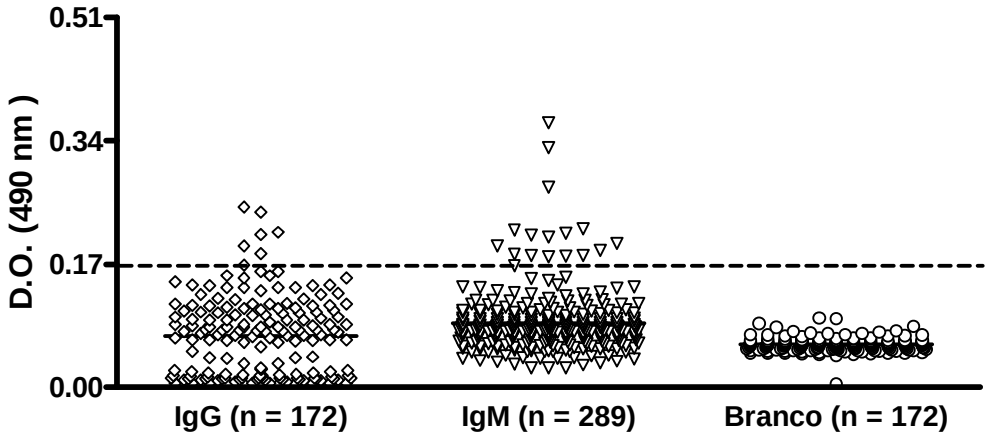


Figura 5. Reatividade à gelatina: Dispersão das amostras segundo a reatividade dos soros (D.Os) contra a gelatina proveniente de pele de porco (Sigma, Steinhein, Alemanha) usada na solução de bloqueio do teste de ELISA. Os grupos foram classificados segundo os isotipos (IgG ou IgM) e o controle do branco corresponde à condição do ensaio sem adição de soro. O número de amostras de cada grupo está entre parênteses. Os números e as percentagens das amostras positivas (D.O. acima de 0,170) foram: IgG = 6 amostras (3,5%) pertencentes a 4 indivíduos e IgM = 16 amostras (5,5%) pertencentes a 9 indivíduos. Todos os controles brancos tiveram reatividade inferior à D.O. de 0,100.

Anexo F

Números de peptídeos reconhecidos e números de peptídeos com variação da intensidade de reatividade dos 30 indivíduos sadios distribuídos de acordo com os anticorpos dirigidos à miosina cardíaca ou Hsp60 e isotipos IgG ou IgM envolvidos.

No. Sadios	**IgG anti-MC** No. peptídeos		**IgM anti-MC** No. peptídeos		**IgG anti-Hsp60** No. peptídeos		**IgM anti-Hsp60** No. peptídeos	
	Rec.	Var.	Rec.	Var.	Rec.	Var.	Rec.	Var.
1	2	0	27	**6**	0	0	6	0
2	6	0	15	0	2	0	3	0
3	6	0	7	0	4	0	5	0
4	4	0	11	0	3	0	0	0
5	1	0	13	**1**	12	0	0	0
6	6	**3**	23	**3**	2	**1**	4	0
7	8	**2**	23	**1**	3	0	5	**1**
8	2	**2**	14	**2**	4	**3**	2	0
9	8	**3**	11	**3**	3	0	2	0
10	6	0	9	0	2	0	2	**2**
11	8	**3**	13	0	7	0	1	0
12	3	**1**	16	**1**	2	0	1	0
13	12	0	16	**4**	8	0	2	0
14	7	0	12	0	9	0	5	0
15	8	0	24	**4**	1	0	10	0
16	14	0	11	0	7	**1**	7	0
17	6	**1**	12	0	11	0	12	**3**
18	2	0	17	0	2	**1**	7	0
19	6	0	18	0	3	0	8	0
20	3	0	19	**1**	6	0	6	**1**
21	2	0	16	**2**	0	0	7	**2**
22	5	0	18	**4**	8	**2**	5	0
23	5	**1**	18	**1**	1	0	3	0
24	4	0	15	**1**	4	0	2	**1**
25	4	0	16	**1**	2	**1**	1	0
26	6	**1**	14	**1**	3	0	3	0
27	0	0	13	0	0	0	7	0
28	5	0	15	0	6	0	5	0
29	5	0	5	0	1	0	0	0
30	3	0	8	0	0	0	1	**1**

MC, miosina cardíaca; Hsp60, proteína de choque térmico 60; Rec, número de peptídeos reconhecidos; Var, número de peptídeos com variação na intensidade de reatividade.

- Os números de indivíduos em negrito são indivíduos que tiveram variação da intensidade de reatividade ao longo do tempo em mais de um peptídeo.

- Considerou-se como variação da intensidade de reatividade dos anticorpos dirigidos a um determinado peptídeo, quando as densidades óticas (D.O.) das amostras do mesmo indivíduo tiverem diferenças superiores a 0,200.

Anexo G

Número de peptídeos da Miosina Cardíaca e Hsp60 reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgM de indivíduos transplantados (n=41) no período de pré e pós-transplante.

No. paciente	**Miosina Cardíaca** (No. peptídeos reconhecidos)				**Hsp60** (No. peptídeos reconhecidos)			
	IgG		**IgM**		**IgG**		**IgM**	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
2	4	5	14	18	8	3	5	6
5	6	32	11	15	7	18	2	0
8	3	6	12	20	7	2	2	3
11	6	5	21	20	6	6	4	4
18	4	1	11	10	3	2	0	0
21	12	6	19	13	10	1	4	0
24	10	13	19	24	8	5	9	5
25	32	15	6	7	16	4	14	11
26	32	32	4	2	6	13	0	0
27	7	3	13	17	3	2	1	3
28	19	17	12	7	7	5	1	0
31	32	32	8	25	18	15	0	1
32	6	1	6	12	4	4	2	2
33	29	29	2	9	8	11	1	2
34	1	0	0	8	3	3	0	1
35	29	25	23	27	4	4	9	12
37	7	3	12	16	4	3	0	1
38	3	13	3	7	6	10	0	2
41	14	4	4	6	3	2	3	5
42	8	10	17	22	3	2	5	14
43	20	12	5	11	4	0	0	1
44	10	11	11	24	6	4	0	5
45	22	20	9	9	4	3	0	0
46	8	10	6	5	5	8	1	1
47	13	13	11	10	5	6	1	0
48	21	17	10	6	15	7	0	0
50	6	2	14	13	3	0	2	2
51	5	5	6	10	3	1	1	1
52	4	2	16	20	2	2	5	5
53	7	4	4	9	6	6	1	2
54	4	6	4	7	2	1	0	1
55	5	4	5	2	5	3	0	0
56	5	3	11	13	3	3	2	1
57	7	6	11	17	2	1	1	4
58	15	8	17	22	3	0	8	4
59	5	3	15	20	1	0	2	3
60	11	2	5	7	1	0	0	0
61	2	1	5	4	0	0	1	0
62	2	7	14	13	3	0	3	4
64	1	1	4	17	1	2	0	2
65	5	4	6	12	0	0	4	1

Anexo H Número de peptídeos dos indivíduos transplantados cuja reatividade variou na comparação entre os períodos pré e pós-transplante.

No. paciente	**Miosina Cardíaca** (peptídeos reconhecidos somente no período)				**Hsp60** (peptídeos reconhecidos somente no período)			
	IgG		**IgM**		**IgG**		**IgM**	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
2	0	1	1	6	5	0	0	3
5	0	26	1	5	0	11	2	0
8	1	5	0	7	5	0	0	1
11	1	0	1	0	**0**	**0**	**0**	**0**
18	4	1	3	2	1	0	**0**	**0**
21	6	0	7	1	9	0	4	0
24	0	3	1	8	3	0	4	0
25	17	0	2	3	12	0	4	1
26	**0**	**0**	2	0	0	6	**0**	**0**
27	6	2	1	5	1	0	1	3
28	4	2	6	1	2	0	1	0
31	**0**	**0**	0	17	3	0	0	1
32	5	0	0	7	**0**	**0**	**0**	**0**
33	1	1	0	7	1	4	0	1
34	1	0	0	9	**0**	**0**	0	1
35	3	0	1	5	1	1	0	4
37	4	1	1	5	1	0	0	1
38	0	11	1	6	1	5	0	3
41	10	0	0	2	1	0	0	2
42	1	4	0	6	**0**	**0**	0	9
43	8	0	0	6	4	0	0	1
44	1	5	0	13	2	0	0	8
45	2	0	**0**	**0**	1	0	**0**	**0**
46	1	3	1	0	0	3	**0**	**0**
47	1	1	2	1	1	2	1	0
48	5	1	4	0	8	0	**0**	**0**
50	5	1	3	2	3	0	1	1
51	1	1	0	4	2	0	**0**	**0**
52	3	1	1	5	1	1	1	1
53	2	0	0	6	2	3	0	1
54	0	2	0	3	1	1	0	1
55	2	1	3	0	2	0	**0**	**0**
56	2	0	3	5	1	1	2	1
57	3	3	3	10	1	0	1	6
58	9	0	1	6	3	0	4	0
59	2	0	1	6	1	0	1	2
60	10	1	0	2	1	0	**0**	**0**
61	1	0	1	0	**0**	**0**	1	0
62	0	5	4	4	0	1	0	1
64	**0**	**0**	0	15	3	0	0	1
65	2	1	1	7	**0**	**0**	3	0
% indivíduo com variação	93% (38/41)		98%(40/41)		85% (35/41)		76%(31/41)	

*Foram analisados somente indivíduos que tinham amostra no período do pré transplante (n=41). A tabela mostra os números de peptídeos reconhecidos somente no período Pré ou Pós transplante. Quando nos dois períodos tiverem zero indica que não houve variação no número de peptídeos reconhecidos ao longo do tempo.

Anexo I

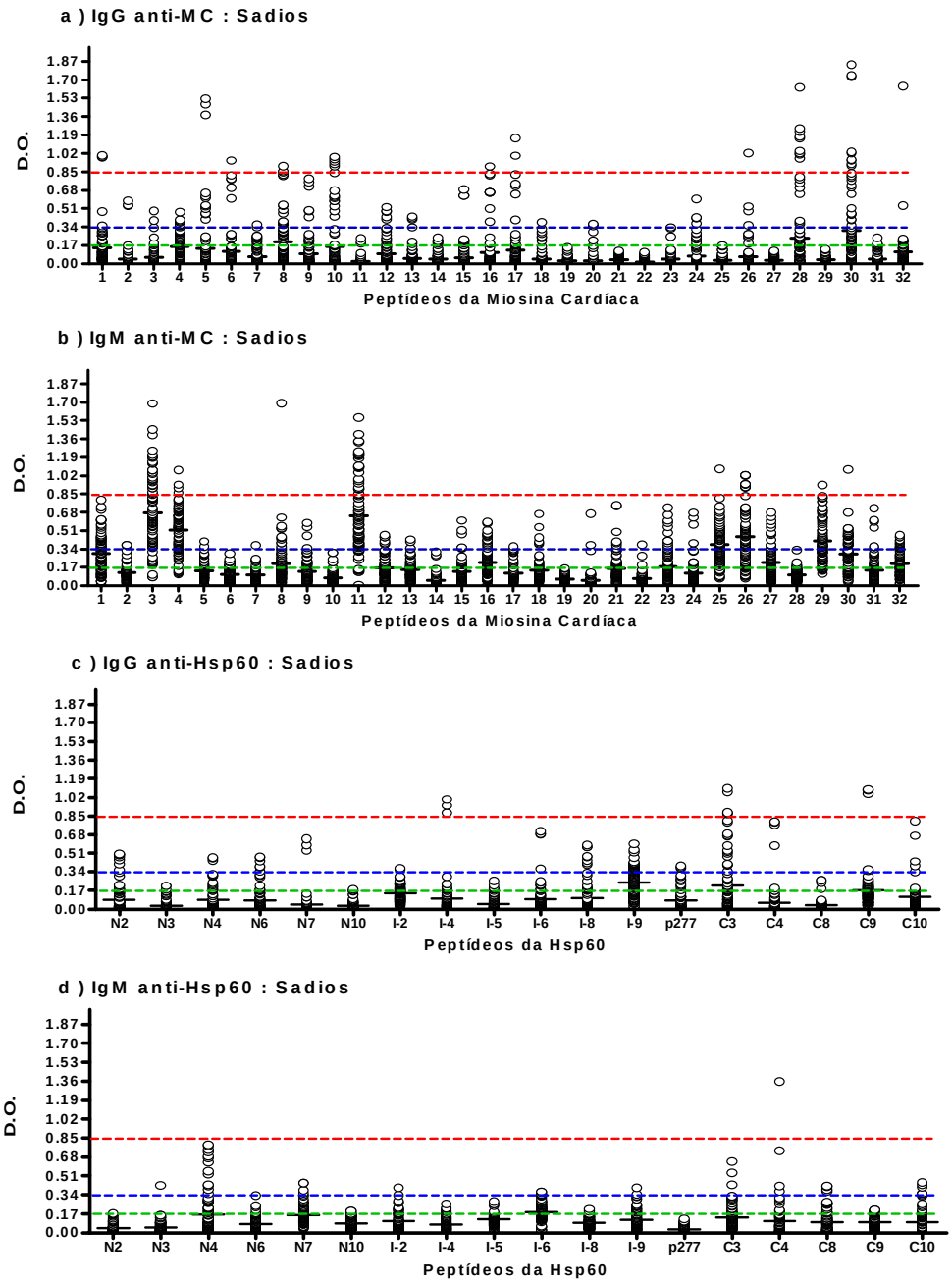


Figura 6. Intensidade de auto-reatividade humoral dirigida à Miosina Cardíaca e à Hsp60 nos indivíduos sadios: Dispersão da intensidade de reatividade dos anticorpos anti-miosina cardíaca do isotipo IgG e IgM (a e b) e dos anticorpos anti-Hsp60 (c e d). As linhas pontilhadas dividem as reatividades em três níveis de intensidade: baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340), intermediária (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e alta (D.O. > 0,850). As 90 amostras provenientes de três tempos seqüenciais (intervalos de 6 meses) de 30 indivíduos sadios foram analisadas pelo método de ELISA. As densidades óticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada peptídeo representa a mediana do grupo.

Anexo J

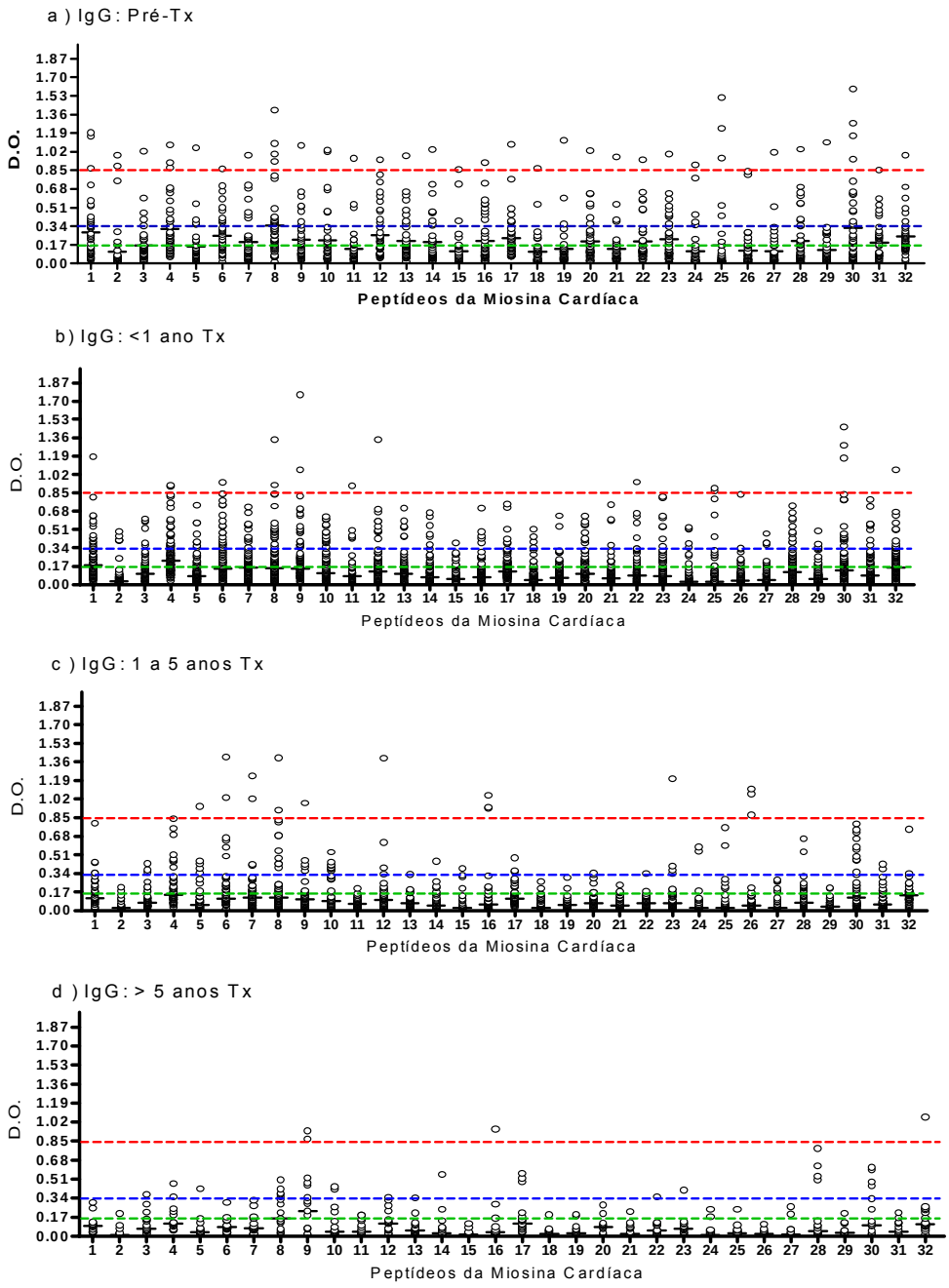


Figura 7. Intensidade da reatividade dos anticorpos do isotipo IgG dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca em diferentes períodos do transplante: Os gráficos mostram a intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgG dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca no período de pré-transplante (Pré-Tx n=41), e nos períodos de pós-transplante: < 1 ano de Tx (T1, n= 93), 1 a 5 anos de Tx (T2, n= 48) e > 5 anos de Tx (T3, n= 17). As reatividades foram medidas em densidade óptica (D.O.) pelo método de ELISA e classificadas em três níveis de intensidade: alta (D.O. > 0,850), intermediária (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340).

Anexo K

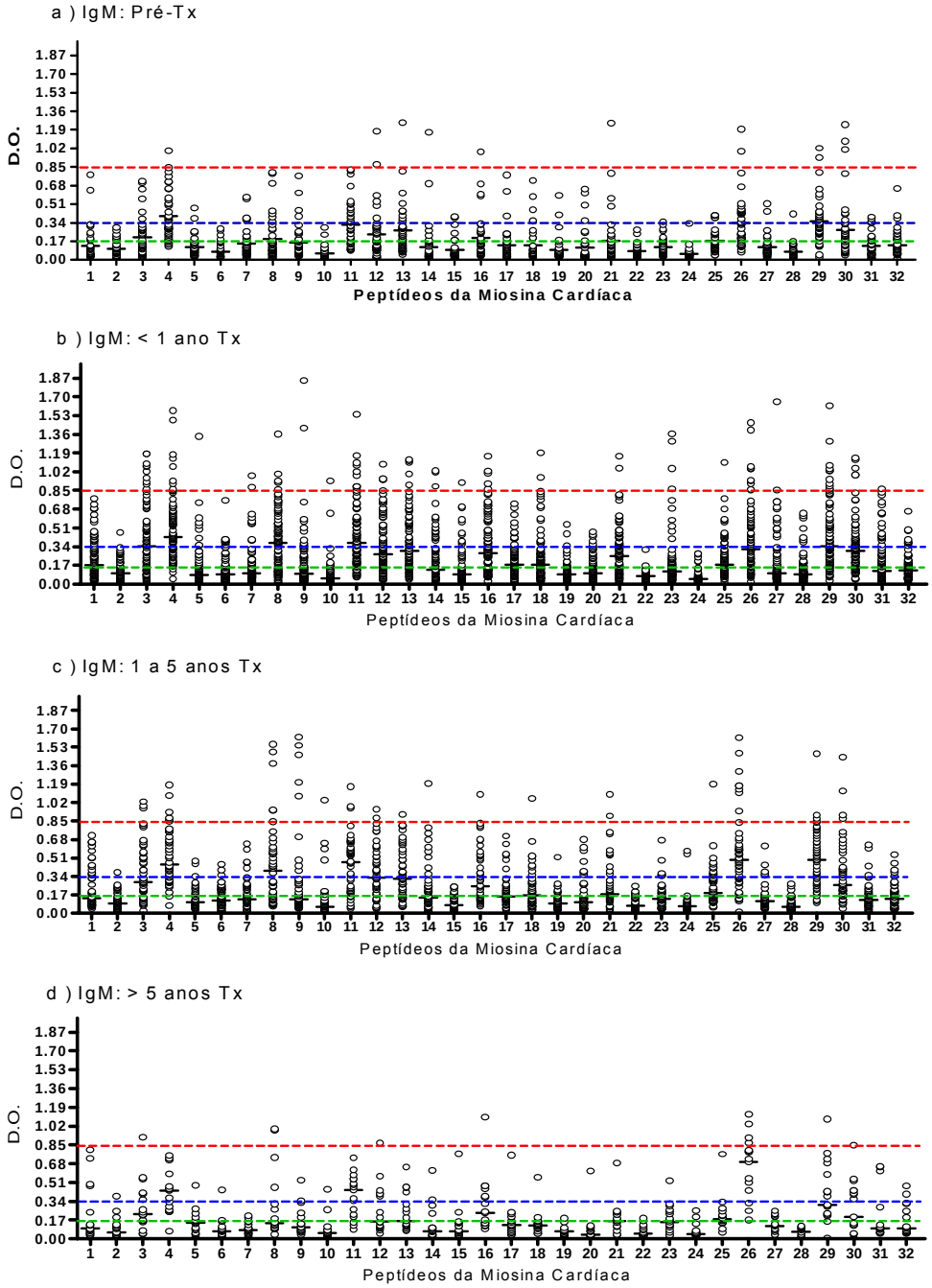


Figura 8. Intensidade da reatividade dos anticorpos do isotipo IgM dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca em diferentes períodos do transplante: Os gráficos mostram a intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgM dirigidos aos peptídeos da miosina cardíaca no período de pré-transplante (Pré-Tx n=41), e nos períodos de pós-transplante: < 1 ano de Tx (T1, n= 93), 1 a 5 anos de Tx (T2, n= 48) e > 5 anos de Tx (T3, n= 17). As reatividades foram medidas em densidade óptica (D.O.) pelo método de ELISA e classificadas em três níveis de intensidade: alta (D.O. > 0,850), intermediária (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340).

Anexo L

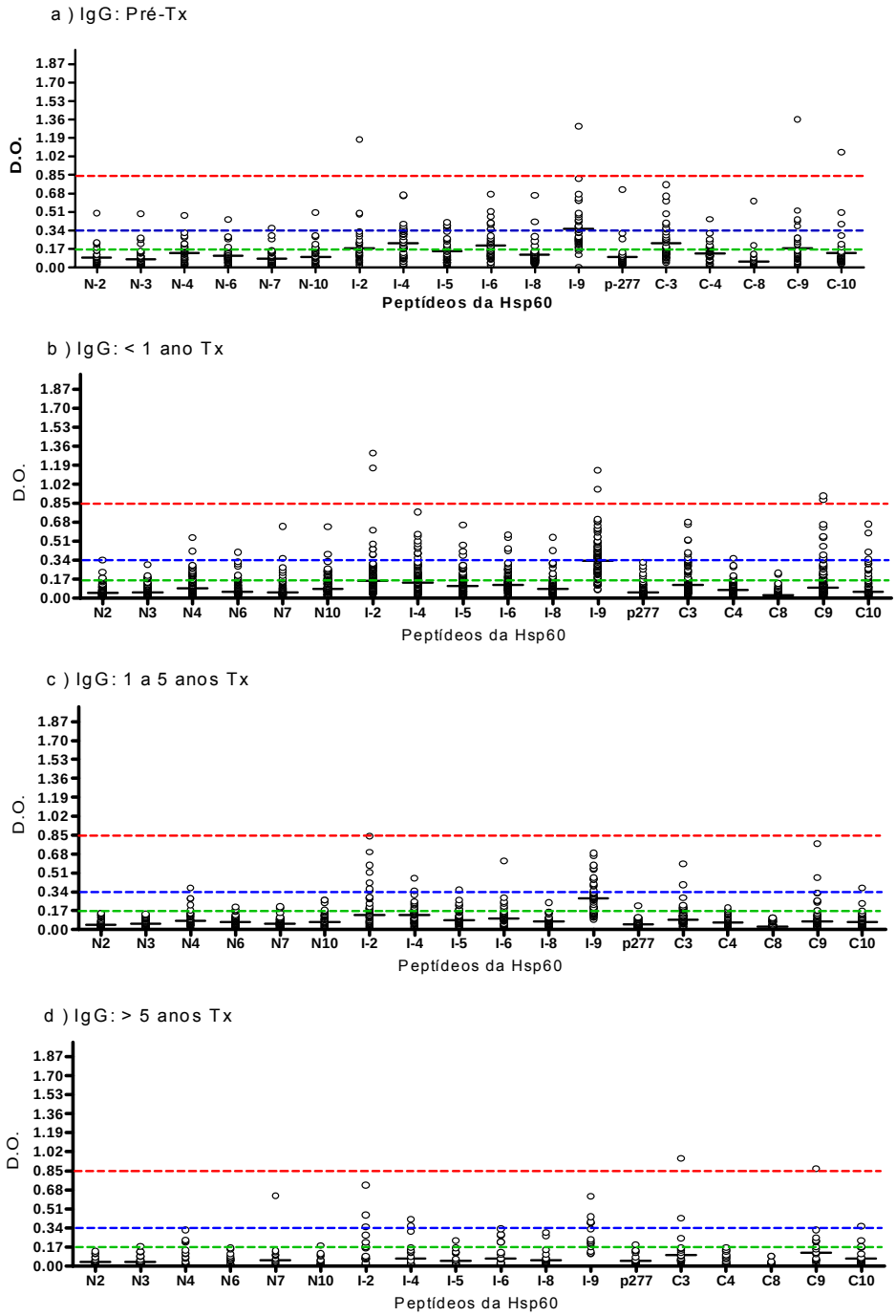


Figura 9. Intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgG dirigidos aos peptídeos da Hsp60 em diferentes períodos do transplante: Os gráficos mostram a intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgG dirigidos aos peptídeos da Hsp60, no período de pré-transplante (Pré-Tx n=41) e, nos períodos de pós-transplante: < 1 ano de Tx (T1, n= 93), 1 a 5 anos de Tx (T2, n= 48) e > 5 anos de Tx (T3, n= 17). As reatividades foram medidas em densidade óptica (D.O.) pelo método de ELISA e classificadas em três níveis de intensidade: alta (D.O. > 0,850), intermediária (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340).

Anexo M

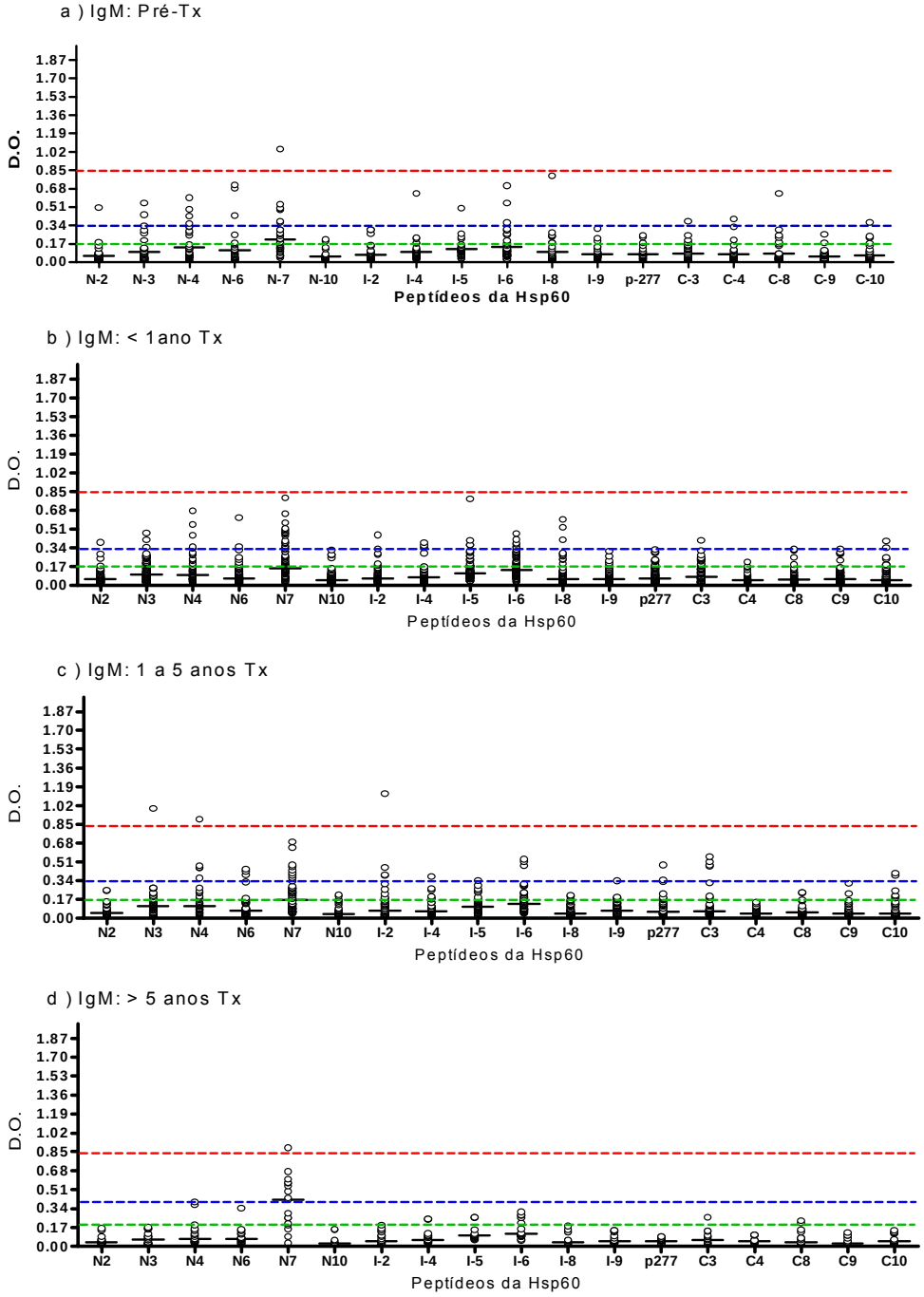


Figura 10. Intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgM dirigidos aos peptídeos da Hsp60 em diferentes períodos do transplante: Os gráficos mostram a intensidade de reatividade dos anticorpos do isotipo IgM dirigidos aos peptídeos da Hsp60, no período de pré-transplante (Pré-Tx n=41) e nos períodos de pós-transplante: < 1 ano de Tx (T1, n= 93), 1 a 5 anos de Tx (T2, n= 48) e > 5 anos de Tx (T3, n= 17). As reatividades foram medidas em densidade óptica (D.O.) pelo método de ELISA e classificadas em três níveis de intensidade: alta (D.O. > 0,850), intermediária (D.O. > 0,340 e ≤ 0,850) e baixa (D.O. ≥ 0,170 e ≤ 0,340).

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AK, Lichtman, AH. Imunologia celular e Molecular. 5a. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; **2005**. Cap. 9, p.197-224: Ativação da célula B e produção de anticorpos.

Afek,A, George,J, Gilburd,B, Rauova,L, Goldberg,I, Kopolovic,J, Harats,D, and Shoenfeld,Y. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. J.Autoimmun. **2000**; 14(2):115-121.

Álvarez-Marquez,A, Aguilera,I, Blanco,RM, Pascual,D, Encarnacion-Carrizosa,M, varez-Lopez,MR, Wichmann,I, and Nunez-Roldan,A. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. Hum Immunol **2008**; 69(3):143-148.

Avrameas,S, Ternynck,T, Tsonis,I, and Lymberi,P. Naturally occurring B-cell autoreactivity: A critical overview. J Autoimmunity **2007**; 29:213-218.

Bacal,F, Sodre,GL, Fernandes,DA, Aiello,VD, Stolf,N, Bocchi,E, and Bellotti,G. Methotrexate in acute persistent humoral rejection: an option for graft rescue. Ann.Thorac.Surg. **2003**; 76(2):607-610.

Baida,H, Biselli,PJ, Juvenale,M, Del Negro,GM, Mendes-Giannini,MJ, Duarte,AJ, and Benard,G. Differential antibody isotype expression to the major Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. Microbes.Infect. **1999**; 1(4):273-278.

Baumgarth,N, Tung,J, and Herzenberg,L. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin.Immunopathol. **2005**; 26:347-362.

Bayry,J, Lacroix-Desmazes,S, Kazatchkine,M, Hermine,O, Tough,D, and Kaveri,S. Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes. J.Immunol **2005**; 175:15-20.

Benichou G, Alessandrini A, Charrad RS, and Wilkes DS. Induction of autoimmunity after allotransplantation. Front Biosci **2007**; 12:4362-4369.

Bernard,A, Coitot,S, Bremont,A, and Bernard,G. T and B cell cooperation: a dance of life and death. Transplantation **2005**; 79(3 Suppl):S8-S11.

Bian,H, Reidhaar-Olson,J, and Hammer,J. The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. Methods. **2003**; 29(3):299-309.

Binder,RJ, Harris,ML, Menoret,A, and Srivastava,PK. Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. J.Immunol. **2000**; 165(5):2582-2587.

Birk,OS, Gur,SL, Elias,D, Margalit,R, Mor,F, Carmi,P, Bockova,J, Altmann,DM, and Cohen,IR. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **1999**; 96(9):5159-5163.

Bocchi,E, Fiorelli,A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by trypanosoma cruzi. Ann Thorac Surg **2001**; 71:1833-1838.

Boes,M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol.Immunol. **2000**; 37(18):1141-1149.

Bos,NA, Meeuwsen,CG, Hooijkaas,H, Benner,R, Wostmann,BS, and Pleasants,JR. Early development of Ig-secreting cells in young of germ-free BALB/c mice fed a chemically defined ultrafiltered diet. Cell Immunol **1987**; 105(1):235-245.

bulafia-Lapid,R, Gillis,D, Yosef,O, Atlan,H, and Cohen,IR. T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children. J Autoimmun. **2003**; 20(4):313-321.

Burnet,FM. The clonal selection theory of acquired Immunity. Cambrige University **1959**.

Caforio,AL, Grazzini,M, Mann,JM, Keeling,PJ, Bottazzo,GF, McKenna,WJ, and Schiaffino,S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. Circulation **1992**; 85(5):1734-1742.

Caforio,AL, Goldman,JH, Haven,AJ, Baig,KM, Libera,LD, and McKenna,WJ. Circulating cardiac-specific autoantibodies as markers of autoimmunity in clinical and biopsy-proven myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. Eur.Heart J. **1997**; 18(2):270-275.

Caldas,CA. Estudo seqüencial da auto-reatividade celular à proteína de choque térmico 60 em pacientes transplantados renais e indivíduos sadios: busca de epitopos potencialmente reguladores [tese-doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas - USP. **2005**.

Caldas,C, Luna,E, Spadafora-Ferreira,M, Porto,G, Iwai,LK, Oshiro,SE, Monteiro,SM, Fonseca,JA, Lemos,F, Hammer,J, Ho,PL, Kalil,J, and Coelho,V. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. Clin.Exp.Immunol **2006**; 146(1):66-75.

Chan,M, Pearson,G. New advances in antirejection therapy. Curr Opin Cardiol **2007**; 22(2):117-122.

Chen,Z, Wheeler,J, and Notkins,A. Antigen-binding B cells and polyreactive antibodies. Eur J Immunol **1995**; 25:579-586.

Cohen,IR,Young,DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol Today **1991**; 12(4):105-110.

Cohen,IR. Peptide therapy for Type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. Diabetologia **2002**; 45(10):1468-1474.

Cohen IR. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. J Autoimmun **2007**; 29(4):246-249.

Cohen-Sfady,M, Nussbaum,G, Pevsner-Fischer,M, Mor,F, Carmi,P, Zanin-Zhorov,A, Lider,O, and Cohen,IR. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. J Immunol **2005**; 175(6):3594-3602.

Coutinho,A, Kazatchkine,MD, and Avrameas,S. Natural autoantibodies. Curr.Opin.Immunol. **1995**; 7(6):812-818.

Cunha-Neto,E, Duranti,M, Gruber,A, Zingales,B, De,M, I, Stolf,N, Bellotti,G, Patarroyo,ME, Pilleggi,F, and Kalil,J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **1995**; 92(8):3541-3545.

Cunha-Neto,E, Rizzo,LV, Albuquerque,F, Abel,L, Guilherme,L, Bocchi,E, Bacal,F, Carrara,D, Ianni,B, Mady,C, and Kalil,J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res. **1998**; 31(1):133-137.

Currie,RW. Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts. J Mol.Cell Cardiol **1987**; 19(8):795-808.

Danke,NA, Koelle,DM, Yee,C, Beheray,S, and Kwok,WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol **2004**; 172(10):5967-5972.

Delneste,Y, Magistrelli,G, Gauchat,J, Haeuw,J, Aubry,J, Nakamura,K, Kawakami-Honda,N, Goetsch,L, Sawamura,T, Bonnefoy,J, and Jeannin,P. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. Immunity. **2002**; 17(3):353-362.

Diederich,KW, Eisele,I, Ried,T, Jaenicke,T, Lichter,P, and Vosberg,HP. Isolation and characterization of the complete human beta-myosin heavy chain gene. Hum Genet **1989**; 81(3):214-220.

Duddy,ME, Alter,A, and Bar-Or,A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? J Immunol **2004**; 172(6):3422-3427.

Dunn,MJ, Rose,ML, Latif,N, Bradd,S, Lovegrove,C, Seymour,C, Pomerance,A, and Yacoub,MH. Demonstration by western blotting of antiheart antibodies before and after cardiac transplantation. Transplantation **1991**; 51(4):806-812.

Ehrlich,P, Morgenroth,J. Horror autotoxicus. New York: Pergamon; **1957**. Vol. 2: Collected papers of Paul Ehrlich.

Eisen,HJ, Tuzcu,EM, Dorent,R, Kobashigawa,J, Mancini,D, Valantine-von Kaeppler,HA, Starling,RC, Sorensen,K, Hummel,M, Lind,JM, Abeywickrama,KH, and Bernhardt,P. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. N.Engl.J Med **2003**; 349(9):847-858.

Fae KC, da Silva DD, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Douay C, Charron D, Toubert A, Cunningham MW, Kalil J, and Guilherme L. Mimicry in recognition of cardiac myosin peptides by heart-intralesional T cell clones from rheumatic heart disease. J Immunol **2006**; 176(9):5662-5670.

Fang,JC, Kinlay,S, Behrendt,D, Hikita,H, Witztum,JL, Selwyn,AP, and Ganz,P. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with impaired coronary endothelial function after cardiac transplantation. Arterioscler.Thromb.Vasc Biol. **2002**; 22(12):2044-2048.

Fedoseyeva,E, Tam,R, Popov,I, Orr,P, Garovoy,M, and Benichou,G. Induction of T cell responses to a self-antigen following allotransplantation. Transplantation **1996**; 61(5):679-683.

Fedoseyeva,EV, Zhang,F, Orr,PL, Levin,D, Buncke,HJ, and Benichou,G. De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process. J Immunol **1999**; 162(11):6836-6842.

Fedoseyeva,EV, Kishimoto,K, Rolls,HK, Illigens,BM, Dong,VM, Valujskikh,A, Heeger,PS, Sayegh,MH, and Benichou,G. Modulation of tissue-specific immune response to cardiac myosin can prolong survival of allogeneic heart transplants. J.Immunol. **2002**; 169(3):1168-1174.

Fedoseyeva,E, Zwierzchoniewska,M, and Robbins,R. Transplantation autoimmunity: the rediscovery of self. Curr.opin.organ transpl **2005**; 10(1):9-14.

Fehr T,Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. Transpl Immunol **2004**; 13:117-130.

Ferguson,A, Youd,M, and Corley,R. Marginal zone B cells transort and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. Internat Immunol **2004**; 16(10):1411-1422.

Fields ML,Erikson J. The regulation of lupus-associated autoantibodies: immunoglobulin transgenic models. Curr Opin Immunol **2003**; 15(6):709-717.

Filion,MC, Proulx,C, Bradley,AJ, Devine,DV, Sekaly,RP, Decary,F, and Chartrand,P. Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. Blood **1996**; 88(6):2144-2150.

Gauntt,CJ, Arizpe HM, Higdon AL, Wiid HJ, Bowers DF, Rozek MM, and Crawley R. Molecular mimicry anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies and myocarditis. J Immunol **1995**; 154:2983-2995.

Geha,R, Jabara,H, and Brodeur,R. The regulation of immunoglobulin e class-switch recombination. Nat.Rev.Immunol. **2003**; 3:721-723.

Granja,C. Estudo seqüencial da resposta celular anti-proteínas de choque térmico humanas no transplante renal [Tese-doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, **2000**.

Granja,C, Moliterno,R, Ferreira,M, Fonseca,J, Kalil,J, and Coelho,V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. Hum Immunol **2004**; 65(2):124-134.

Guilherme,L, Cunha-Neto,E, Coelho,V, Snitcowsky,R, Pomerantzeff,PM, Assis,RV, Pedra,F, Neumann,J, Goldberg,A, Patarroyo,ME, and . Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. Circulation **1995**; 92(3):415-420.

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, and 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):5345-5351.

Hammer,J, Sturniolo,T, and Sinigaglia,F. HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. Adv Immunol. **1997**; 66:67-100.

Hardy,RR, Wasserman,R, Li,YS, Shinton,SA, and Hayakawa,K. Response by B cell precursors to pre-B receptor assembly: differences between fetal liver and bone marrow. Curr.Top.Microbiol.Immunol **2000**; 252:25-30.

Hardy,RR,Hayakawa,K. B cell development pathways. Annu.Rev Immunol **2001**; 19:595-621.

Hardy,RR. B-1 B cells development. J Immunol **2006**; 177:2749-2754.

Harriman,W, Volk,H, Defranoux,N, and Wabl,M. Immunoglobulin class switch recombination. Annu.Rev Immunol **1993**; 11:361-384.

Haury,M, Grandien,A, Sundblad,A, Coutinho,A, and Nobrega,A. Global analysis of antibody repertoires. 1. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities. Scand.J Immunol **1994**; 39(1):79-87.

Haury,M, Sundblad,A, Grandien,A, Barreau,C, Coutinho,A, and Nobrega,A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. Eur.J Immunol **1997**; 27(6):1557-1563.

Hayakawa,K, Asano,M, Shinton,SA, Gui,M, Allman,D, Stewart,CL, Silver,J, and Hardy,RR. Positive selection of natural autoreactive B cells. Science **1999**; 285(5424):113-116.

Hickman-Miller,HD,Hildebrand,WH. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. Trends Immunol **2004**; 25(8):427-433.

Holmberg,D, Freitas,AA, Portnoi,D, Jacquemart,F, Avrameas,S, and Coutinho,A. Antibody repertoires of normal BALB/c mice: B lymphocyte populations defined by state of activation. Immunol Rev **1986**; 93:147-169.

Huston,DP. The biology of the immune system. JAMA **1997**; 278(22):1804-1814.

Iwai,L, Juliano,M, Juliano,L, Kalil,J, and Cunha-Neto,E. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between Trypanosoma cruzi B13 and cardiac myosin heavy chain. J Autoimmun **2005**; 24(2):111-117.

Jindal,S, Dudani,AK, Singh,B, Harley,CB, and Gupta,RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. Mol Cell Biol **1989**; 9(5):2279-2283.

Jones DB, Coulson AF, and Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. Immunol Today **1993**; 14(3):115-118.

Jurcevic,S, Ainsworth,ME, Pomerance,A, Smith,JD, Robinson,DR, Dunn,MJ, Yacoub,MH, and Rose,ML. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. Transplantation **2001**; 71(7):886-892.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol **2003**; 3:984-993.

Kerner,N, Liegeard,P, Levin,MJ, and Hontebeyrie-Joskowicz,M. Trypanosoma cruzi: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. Exp Parasitol **1991**; 73(4):451-459.

Korganow,AS, Ji,H, Mangialaio,S, Duchatelle,V, Pelanda,R, Martin,T, Degott,C, Kikutani,H, Rajewsky,K, Pasquali,JL, Benoist,C, and Mathis,D. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. Immunity. **1999**; 10(4):451-461.

Laguens,RP, Argel,MI, Chambo,JG, Vigliano,CA, San Martino,JA, Perrone,SV, and Favaloro,RR. Anti-skeletal muscle glycolipid antibodies in human heart transplantation as markers of acute rejection.Correlation with endomyocardial biopsy. Transplantation **1996**; 62(2):211-216.

Lamb,JR, Bal,V, Mendez-Samperio,P, Mehlert,A, So,A, Rothbard,J, Jindal,S, Young,RA, and Young,DB. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. Int.Immunol **1989**; 1(2):191-196.

Latif,N, Rose,ML, Yacoub,MH, and Dunn,MJ. Association of pretransplantation antiheart antibodies with clinical course after heart transplantation. J.Heart Lung Transplant. **1995**; 14(1 Pt 1):119-126.

Lechler,RI, Garden,OA, and Turka,LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. Nat.Rev Immunol **2003**; 3(2):147-158.

Li,Y, Heuser,J, Cunningham,L, Kosanke,S, and Cunningham,M. Mimicry and antibody-mediated cell signaling in autoimmune myocarditis. J Immunol. **2006**; 177(11):8234-8240.

Libby,P,Pober,J. Chronic rejection. Immunity **2001**; 14(4):387-397.

Lietz,K, John,R, Burke,E, Schuster,M, Bogers,T, Suciu-Foca,N, Mancini,D, and Itescu,S. Immunoglobulin M to immunoglobulin G anti-human leukocyte antigen class II antibody switching in cardiac translant recipients is associated with an increased risk of cellular rejection and coronary artery disease. Circulation **2005**; 112:2468-2476.

Liu,Y, Gao,X, Masuda,E, Redecha,PB, Blank,MC, and Pricop,L. Regulated expression of FcgammaR in human dendritic cells controls cross-presentation of antigen-antibody complexes. J Immunol **2006**; 177(12):8440-8447.

Luna,E, Postol,E, Caldas,C, Mundel,LR, Porto,G, Iwai,LK, Ho,PL, Kalil,J, and Coelho,V. Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. Cell Stress.Chaperones. **2007**; 12(2):112-122.

Lundkvist,I, Coutinho,A, Varela,F, and Holmberg,D. Evidence for a functional idiotypic network among natural antibodies in normal mice. Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **1989**; 86(13):5074-5078.

MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, and Pearce EJ. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. J Immunol **2001**; 167:1982-1988.

Malkiel,S, Kuan,AP, and Diamond,B. Autoimmunity in heart disease: mechanisms and genetic susceptibility. Mol.Med Today **1996**; 2(8):336-342.

Manson,JJ, Mauri,C, and Ehrenstein,MR. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. Springer Semin Immunopathol. **2005**; 26(4):425-432.

Martin,F,Chan,AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. Immunity. **2004**; 20(5):517-527.

Matsushita,T, Yanaba,K, Bouaziz,J, Fujimoto,M, and Tedder,T. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J Clin Invest **2008**; 118(10):3420-3430.

Matzinger,P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu.Rev Immunol **1994**; 12:991-1045.

Mauri,C, Gray,D, Mushtaq,N, and Londei,M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. J.Exp.Med **2003**; 197(4):489-501.

Mauri,C,Ehrenstein,MR. The 'short' history of regulatory B cells. Trends Immunol **2008**; 29(1):34-40.

McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. Curr Opin Immunol **2003**; 15(3):354-361.

Menezes,JS, Mucida,DS, Cara,DC, varez-Leite,JI, Russo,M, Vaz,NM, and de Faria,AM. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. Int.Immunol **2003**; 15(3):447-455.

Mertz,AK, Daser,A, Skurnik,M, Wiesmuller,KH, Braun,J, Appel,H, Batsford,S, Wu,P, Distler,A, and Sieper,J. The evolutionarily conserved ribosomal protein L23 and the cationic urease beta-subunit of Yersinia enterocolitica O:3 belong to the immunodominant antigens in Yersinia-triggered reactive arthritis: implications for autoimmunity. Mol Med **1994**; 1(1):44-55.

Mizoguchi,A,Bhan,AK. A case for regulatory B cells. J.Immunol **2006**; 176(2):705-710.

Moliterno,R, Valdivia,L, Pan,F, and Duquesnoy,RJ. Heat shock protein reactivity of lymphocytes isolated from heterotopic rat cardiac allografts. Transplantation **1995**; 59(4):598-604.

Morgun,A, Shulzhenko,N, Unterkircher,CS, Diniz,RV, Pereira,AB, Silva,MS, Nishida,SK, Almeida,DR, Carvalho,AC, Franco,M, Souza,MM, and Gerbase-Delima,M. Pre- and post-transplant anti-myosin and anti-heat shock protein antibodies and cardiac transplant outcome. J.Heart Lung Transplant. **2004**; 23(2):204-209.

Moseley,P. Stress proteins and the immune response. Immunopharmacology **2000**; 48(3):299-302.

Mouthon,L, Haury,M, Lacroix-Desmazes,S, Barreau,C, Coutinho,A, and Kazatchkine,MD. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. J.Immunol **1995**; 154(11):5769-5778.

Mueller,XM. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. Ann.Thorac.Surg. **2004**; 77(1):354-362.

Munk,ME, Schoel,B, Modrow,S, Karr,RW, Young,RA, and Kaufmann,SH. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. J Immunol **1989**; 143(9):2844-2849.

Murakami M,Honjo T. Transgenic mouse models for B-cell dominant autoimmune diseases. Curr Opin Immunol **1997**; 9(6):846-850.

Neumann,DA, Burek,CL, Baughman,KL, Rose,NR, and Herskowitz,A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. J Am.Coll.Cardiol **1990**; 16(6):839-846.

Nobrega,A, Haury,M, Grandien,A, Malanchere,E, Sundblad,A, and Coutinho,A. Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. Eur.J Immunol **1993**; 23(11):2851-2859.

Noorchashm H, Reed AJ, Rostami SY, Mozaffari R, Zekavat G, Koeberlein B, Caton AJ, and Naji A. B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. J Immunol **2006**; 177(11):7715-7712.

Ozduran V, Yamani MH, Chuang HH, Sipahi I, Cook DJ, Rincon G, and Starling RC. Survival beyond 10 years following heart transplantation: The Cleveland Clinic Foundation experience. Transplant Proc **2005**; 37(10):4509-4512.

Pascual,M, Theruvath,T, Kawai,T, Tolkoff-Rubin,N, and Cosimi,AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N.Engl.J Med **2002**; 346(8):580-590.

Paul WE. Lymphocyte responses and cytokines. Cell **1994**; 76(2):241-251.

Perschinka,H, Mayr,M, Millonig,G, Mayerl,C, van der,ZR, Morrison,SG, Morrison,RP, Xu,Q, and Wick,G. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. Arterioscler.Thromb.Vasc Biol. **2003**; 23(6):1060-1065.

Pockley,AG, Shepherd,J, and Corton,JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. Immunol Invest **1998**; 27(6):367-377.

Pockley,AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet **2003**; 362(9382):469-476.

Pockley,AG,Muthana,M. Heat shock proteins and allograft rejection. Contrib.Nephrol. **2005**; 148:122-134.

Poletaev,A,Osipenko,L. General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). Autoimmun.Rev. **2003**; 2(5):264-271.

Pool,V, Braun,M, Kelso,J, Mootrey,G, Chen,R, Yunginger,J, Jacobson,R, and Gargiullo,P. Prevalence of anti-gelatin IgE antibodies in people with anaphylaxis after measles-mumps rubella vaccine in the United States. Pediatrics **2002**; 110(6):71

Portugal,K, Dozmorov,I, Sidorov,I, Marrero,I, Fonseca,JA, Spadafora-Ferreira,M, Kalil,J, and Coelho,V. Renal transplant patients show variations in their self-reactive repertoires: a serial study. Int Immunol. **2001**; 13(6):747-755.

Qian,J, Moliterno,R, Donovan-Peluso,MA, Liu,K, Suzow,J, Valdivia,L, Pan,F, and Duquesnoy,RJ. Expression of stress proteins and lymphocyte reactivity in heterotopic cardiac allografts undergoing cellular rejection. Transpl Immunol **1995**; 3(2):114-123.

Quintana,FJ, Getz,G, Hed,G, Domany,E, and Cohen,IR. Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity. J.Autoimmun. **2003**; 21(1):65-75.

Quintana,FJ,Cohen,IR. The natural autoantibody repertoire and autoimmune disease. Biomed.Pharmacother. **2004a**; 58(5):276-281.

Quintana,FJ, Hagedorn,PH, Elizur,G, Merbl,Y, Domany,E, and Cohen,IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **2004b**; 101 Suppl 2:14615-14621.

Rahmani,M, Cruz,RP, Granville,DJ, and McManus,BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. Circ.Res. **2006**; 99(8):801-815.

Raz,I, Elias,D, Avron,A, Tamir,M, Metzger,M, and Cohen,IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial 2. Lancet **2001**; 358(9295):1749-1753.

Ritossa,F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP. Drosophila Experientia **1962**; 18:571-573.

Rolls,HK, Kishimoto,K, Dong,VM, Illigens,BM, Sho,M, Sayegh,MH, Benichou,G, and Fedoseyeva,EV. T-cell response to cardiac myosin persists in the absence of an alloimmune response in recipients with chronic cardiac allograft rejection. Transplantation **2002**; 74(7):1053-1057.

Rose,ML,Yacoub,MH. Heart transplantation: cellular and humoral immunity. Springer Semin.Immunopathol. **1989**; 11(4):423-438.

Rose,ML. Activation of autoimmune B cells and chronic rejection. Transplantation **2005**; 79(3 Suppl):S22-S24.

Roussel,JC, Baron,O, Perigaud,C, Bizouarn,P, Pattier,S, Habash,O, Mugniot,A, Petit,T, Michaud,JL, Heymann,MF, Treilhaud,M, Trochu,JN, Gueffet,JP, Lamirault,G, Duveau,D, and Despins,P. Outcome of heart transplants 15 to 20 years ago: graft survival, post-transplant morbidity, and risk factors for mortality. J.Heart Lung Transplant. **2008**; 27(5):486-493.

Satoguina,JS, Adjobimey,T, Arndts,K, Hoch,J, Oldenburg,J, Layland,LE, and Hoerauf,A. Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. Eur.J Immunol **2008**; 38(11):3101-3113.

Sakaguchi,M, Nakayama,T, Fujita,H, Toda,M, and Inouye,S. Minimum estimated incidence in Japan of anaphylaxis to live virus vaccines including gelatin. Vaccine **2000**; 19(4-5):431-436.

Schett,G, Xu,Q, Amberger,A, Van der,ZR, Recheis,H, Willeit,J, and Wick,G. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. J Clin.Invest **1995**; 96(6):2569-2577.

Schwartz,M,Cohen,IR. Autoimmunity can benefit self-maintenance Immunol Today **2000**; 21(6):265-268.

Sercarz,E,Maverakis,E. Recognition and function in a degenerate immune system. Mol.Immunol. **2004**; 40:1003-1008.

Shikhman,AR, Greenspan,NS, and Cunningham,MW. A subset of mouse monoclonal antibodies cross-reactive with cytoskeletal proteins and group A streptococcal M proteins recognizes N-acetyl-beta-D-glucosamine. J Immunol **1993**; 151(7):3902-3913.

Spiegelberg,HL, Falkoff,RJ, O'Connor,RD, and Beck,L. Interleukin-2 inhibits the interleukin-4-induced human IgE and IgG4 secretion in vivo. Clin.Exp.Immunol **1991**; 84(3):400-405.

Srivastava,P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat.Rev Immunol **2002**; 2(3):185-194.

Stavnezer,J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. J Immunol **1995**; 155(4):1647-1651.

Stewart,S, Winters,GL, Fishbein,MC, Tazelaar,HD, Kobashigawa,J, Abrams,J, Andersen,CB, Angelini,A, Berry,GJ, Burke,MM, Demetris,AJ, Hammond,E, Itescu,S, Marboe,CC, McManus,B, Reed,EF, Reinsmoen,NL, Rodriguez,ER, Rose,AG, Rose,M, Suciu-Focia,N, Zeevi,A, and Billingham,ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. J Heart Lung Transplant **2005**; 24(11):1710-1720.

Sun,Q, Liu,Z, Chen,J, Chen,H, Wen,J, Cheng,D, and Li,L. Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection. Clin.J Am.Soc.Nephrol. **2008**; 3(5):1479-1486.

Taylor,DO, Edwards,LB, Aurora,P, Christie,JD, Dobbels,F, Kirk,R, Rahmel,AO, Kucheryavaya,AY, and Hertz,MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report--2008. J.Heart Lung Transplant. **2008**; 27(9):943-956.

Tian,J, Zekzer,D, Hanssen,L, Lu,Y, Olcott,A, and Kaufman,DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol **2001**; 167(2):1081-1089.

Uber,WE, Self,SE, Van Bakel,AB, and Pereira,NL. Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. Am.J Transplant **2007**; 7(9):2064-2074.

van der Zee,JS, van,SP, and Aalberse,RC. Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. Clin.Exp.Immunol **1986**; 64(2):415-422.

van der Zee R, Anderton,SM, Prakken,AB, Liesbeth Paul,AG, and van,EW. T cell responses to conserved bacterial heat-shock-protein epitopes induce resistance in experimental autoimmunity. Semin Immunol **1998**; 10(1):35-41.

van Eden,W, Wendling,U, Paul,L, Prakken,B, van,KP, and van der,ZR. Arthritis protective regulatory potential of self-heat shock protein cross-reactive T cells. Cell Stress.Chaperones. **2000**; 5(5):452-457.

Vaz,N. Natural Immunoglobulins. Mem Inst Oswaldo Cruz **2000**; 95(suppl. 1):59-62.

Victora,G, Bilate,A, Socorro-Silva,A, Caldas,C, Lima,R, Kalil,J, Coelho V, and Victora,C. Mother-child immunological interactions in early life affect long-term humoral autoreactivity to heat schock protein 60 at age 18 years. J Autoimmun. **2007**; 29:38-43.

Vogt,RF, Jr., Phillips,DL, Henderson,LO, Whitfield,W, and Spierto,FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. J Immunol Methods **1987**; 101(1):43-50.

Warraich,RS, Pomerance,A, Stanley,A, Banner,NR, Dunn,MJ, and Yacoub,MH. Cardiac myosin autoantibodies and acute rejection after heart transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. Transplantation **2000**; 69(8):1609-1617.

Warraich,R, Griffiths,E, Falconar,A, Pabbathi ,V, Bell,C, Angelini,G, Suleiman,M, and Yacoub,M. Human cardiac myosin autoantibodies impair myocyte contractility: a cause-and-effect relationship. FASEB J **2006**; 20(6):651-660.

Wecker,H,Auchincloss,H, Jr. Cellular mechanisms of rejection. Curr.Opin.Immunol. **1992**; 4(5):561-566.

Wendling,U, Paul,L, van der,ZR, Prakken,B, Singh,M, and van,EW. A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue J Immunol **2000**; 164(5):2711-2717.

Wheeler,CH, Collins,A, Dunn,MJ, Crisp,SJ, Yacoub,MH, and Rose,ML. Characterization of endothelial antigens associated with transplant-associated coronary artery disease. J Heart Lung Transplant **1995**; 14(6 Pt 2):S188-S197.

Wick,G, Knoflach,M, and Xu,Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. Annu.Rev Immunol **2004**; 22:361-403.

Wong,A, Kenny,TP, Ermel,R, and Robbins,DL. IgG3 reactive rheumatoid factor in rheumatoid arthritis: etiologic and pathogenic considerations. Autoimmunity **1994**; 19(3):199-210.

Yamani,M, Kinter,M, Starling,R, Willard,B, Ratliff,N, Yu,Y, Cook,D, McCarthy,P, and Young,J. Increased beta-myosin heavy chain in acute cellular rejection following human heart transplantation. Am J Transplant **2002**; 2(4):386-388.

Zhang,L,Tarleton,RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental Trypanosoma cruzi infections. Exp Parasitol. **1996**; 84(2):203-213

Ziv O, Avtalion RR, and Margel S. Immunogenicity of bioactive magnetic nanoparticles: natural and acquired antibodies. J Biomed Mater Res A **2008**; 85(4):1011-1021.