KARINE MARAFIGO DE AMICIS

Análise *in vitro* da capacidade de cobertura da vacina em desenvolvimento contra *Streptococcus pyogenes*

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profª. Drª. Luiza Guilherme Guglielmi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

De Amicis, Karine Marafigo
Análise in vitro da capacidade de cobertura da vacina em desenvolvimento contra Streptococcus pyogenes / Karine Marafigo De Amicis. -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Descritores: 1.*Streptococcus pyogenes* 2.Vacinas de subunidades 3.Vacinas estreptocócicas 4.Febre reumática 5.Cobertura vacinal 6.Anticorpos/imunologia 7.*In vitro*.

USP/FM/DBD-077/13

Dedico esta Dissertação à minha família, aos meus amigos e ao meu namorado, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. Às minhas queridas avós, Lourdes e Meris, pelo infinito apoio e amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela profissão que tanto amo e por me permitir realizar este longo trabalho.

Agradeço aos meus pais, Flávio Raul De Amicis e Jaqueline Marafigo De Amicis, pelo apoio incansável e aos meus irmãos, Camila Marafigo De Amicis e Rodrigo Marafigo De Amicis, por acreditarem nos meus sonhos. Agradeço às minhas queridas avós, Lourdes Lodi De Amicis (em memória) e Meris Sasso, pelo amor dedicado nas horas mais difíceis e a toda minha família por confiarem nos meus objetivos.

Agradeço ao meu namorado Heles Pereira Lima Junior pelo amor verdadeiro e paciência e à sua família por todo apoio e compreensão ao longo desta caminhada.

Agradeço a minha orientadora Dra. Luiza Guilherme Guiglielmi por me acolher como sua aluna e por contribuir muito para a minha formação. Agradeço pela confiança em meu trabalho. Agradeço a todos do Grupo da Dra. Luiza, especialmente à MsC Raquel Alencar e à Dra. Samar Freschi de Barros pela dedicação, pela disponibilidade em me ensinar e pela amizade.

Agradeço ao Dr. Edilberto Postól e ao Luiz Mundel pelo excelente trabalho com os camundongos e pelas contribuições científicas. Agradeço à Simone Santos e a Iolanda Orue por toda ajuda e pela amizade. Agradeço muito à Dra. Karen Köhler e a Nathália Moreira Santos pela amizade, companhia, apoio e incansável ajuda na elaboração desta Dissertação. Agradeço ao Dr. Carlo Martins pela importante participação neste projeto e pela amizade. Agradeço à Fernanda Alegria, à Selma Palácios e à Maria Lucia Marin, que me trazem alegria e esperança a cada dia. Obrigada por todo comprometimento e ajuda.

Agradeço ao Dr. Edecio Cunha Neto e Dr. Esper Kallas pelas contribuições dadas e a disposição de sempre oferecer soluções ao meu projeto. Agradeço pelas colaborações realizadas através da Andréia Kuramoto, Dra. Priscila Teixeira e Dra. Karina Carvalho. A Dra. Verônica Coelho por me acolher como colaboradora do Projeto Imunologia nas Escolas, o que contribuiu substancialmente para o meu crescimento profissional e pessoal e ao seu grupo sempre disposto a contribuir. Especialmente à Sandra Maria e Carolina Lavini pela ajuda nos ensaios com Citometria de Fluxo e pela amizade.

Agradeço a todos os pós-graduandos, pós-doutorandos e colegas do laboratório, pelas discussões e esclarecimentos de muitas das minhas dúvidas e pela amizade, especialmente à Dra. Carolina Luque, Dra. Maristela Hernandez e Dra. Amanda Frade. A Dra. Rosemeire Silva, ao Dr. Hernandez Silva, pelo apoio, amizade e pela contribuição científica. A Dra. Helen Arcuri por toda dedicação, disponibilidade e amizade e á Dra. Keity Souza Santos pela confiança, pelo apoio e pela amizade.

Agradeço a todos do Laboratório por toda contribuição dada na realização deste trabalho e na minha formação profissional e pessoal. Agradeço a todas minhas amigas e amigos, especialmente à Carla Godoy pelo apoio e pela amizade verdadeira. A Vanessa Nascimento, Susana Lessa e Vanessa Oppio por todo carinho e apoio.

A todos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, especialmente à Dra. Luciana Leite, Cibelly Goulart e Dunia Rodriguez. A Dra. Michelle Darrieux e Dra. Angela Barbosa pelas contribuições em minha qualificação e defesa.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Kalil por me acolher como aluna do seu departamento e por cada hora dedicada ao meu crescimento profissional. Obrigada por acreditar em meu trabalho. Agradeço à Diretoria do Laboratório de Imunologia, ao InCor e ao Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia pelo espaço e apoio. Agradeço ao CNPQ, à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

"O melhor destino que se pode dar a uma vida é dedicá-la a algo que dure mais do que a própria vida"
JOHANN W. VON GOETHE

Normalização adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas xi

Lista de Figuras xv

Lista de Tabelas xvi

Resumo xvii

Summary xviii

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 *Streptococcus pyogenes* 1

1.2 Resposta Imunológica contra bactérias extracelulares 1

1.2.1 Evasão á fagocitose, colonização e interação com o sistema imunológico hospedeiro 2

1.3 Composição antigênica e classificação das cepas de *S.pyogenes* 7

1.3.1 Proteína M 7

1.4 Características clínicas e epidemiológicas das doenças causadas por *S. pyogenes* 10

1.5 Mimetismo molecular: patogênese da FR/DRC 14

1.6 Desenvolvimento de vacinas contra o *S. pyogenes* 16

2 OBJETIVO GERAL 20

2.1 Objetivos específicos 20

3 MÉTODOS 21

3.1 Delineamento experimental 21

3.2 StreptInCor: epitopo vacinal 22

3.3 Camundongos e Imunização 22

3.4 Cepas de *S. pyogenes* 23

3.4.1 Cultivo das cepas 23

3.4.2 Lisado da cultura de *S. pyogenes* para isolamento de DNA 24

3.4.3 Tipificação do gene *emm* 24

3.5 Alinhamento de sequências da região C-terminal da proteína M de diferentes cepas 27

3.6 Avaliação do Reconhecimento de diferentes cepas: *Western Blotting* 28

3.6.1 Extração de proteínas 28

3.6.2 Precipitação em TCA/Acetona 29

3.6.3 Concentração em coluna de filtro 29

3.6.4 Quantificação 29

3.6.5 Avaliação do rendimento final 30

3.6.6 *Western Blotting* 30

3.6.7 Escaneamento e densitometria do *Western Blotting* 32

3.7 Citometria de Fluxo: Ensaio de Ligação 32

3.8 Ensaio de inibição de adesão/invasão 33

3.8.1 Linhagem celular HEp-2 33

3.8.2 Inóculo de *S. pyogenes* 34

3.8.3 Incubação do *S. pyogenes* com soro hiperimune 34

3.9 Ensaio de inibição de adesão/invasão das cepas previamente incubadas com soro hiperimune às células HEp-2 35

3.10 Opsonofagocitose por células peritoneais 36

3.10.1 Células peritoneais 36

3.10.2 Incubação com soro anti-StreptInCor e plaqueamento 37

4 *WESTERN BLOTTING* PARA AVALIAÇÃO DE AUTOIMUNIDADE 38

4.1 Biópsias de válvulas cardíacas humanas 38

4.2 Extração das proteínas de válvula Mitral 38

4.3 Eliminação de interferentes 39

4.4 Quantificação das proteínas 40

4.5 *Immunoblotting* 40

5 APROVAÇÕES DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA 42

6 RESULTADOS 47

6.1 Genotipagem das cepas de *S. pyogenes*.....47

6.1.1 Frequência dos tipos M 47

6.1.2 Anticorpos anti-StreptInCor reconheceram as cepas M1 e M5.....48

6.2 Alinhamento das sequências da região C- terminal da proteína M de diferentes cepas de *S. pyogenes*.....49

6.3 Diferentes cepas de *S. pyogenes* foram neutralizadas pelo anticorpo anti-StreptInCor 51

6.4 Ensaio de inibição da adesão/invasão da cepa M1 à células da linhagem HEp-2 53

6.5 Ensaio de opsonofagocitose com células peritoneais.....54

6.6 Avaliação de segurança do StreptInCor por *Western Blotting*.....58

7 DISCUSSÃO 59

8 CONCLUSÃO 67

9 REFERÊNCIAS.....68

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Alum – Adjunvante Hidróxido de alumínio

AMAX – Absorção máxima

APC – do inglês *"antigen presenting cells"*

BSA – do inglês "*Bovine Serum Albumim*"

C4BP – do inglês "*C4 binding protein*"

CD – do inglês "*Cluster of differentiation*"

CDC – do inglês "*Centers for Disease Control and Prevention*"

cm² - Centímetro quadrado

CO_2 – Dióxido de carbono

CR – do inglês "*Complement Receptor*"

DALYs – do inglês "*disability-adjusted life years"*

DATASUS - Banco de dados do Sistema Único de Saúde

DMEM – do inglês "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*"

DNA – do inglês "*Desoxyribonucleic acid*"

dNTP – do inglês "*Desoxyribonucleotide Triphosphates*"

DRC – Doença Reumática Cardíaca

EDTA – do inglês "*Ethylenediaminetetraacetic acid*"

ELISA – do inglês "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*"

EUA – Estados Unidos da América

FACS – do inglês *"Fluorescence Activated Cell Sorting"*

FH – Fator H

FHL-1 – Fator H *like* 1

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Fn – Fibronectina

FR – Febre Reumática

FSC – do inglês "*Foward Side Scater*"

g - giros

GAS – do inglês "*Group A Streptococcus*"

GNA – Glomerulonefrite Aguda Estreptocócica

h – hora

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HLA – do inglês "H*uman Leukocyte Antigen*"

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN-γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-8 – Interleucina 8

KC – do inglês "*Keratinocyte-derived Cytokine*"

kDa – kiloDalton

LTA – do inglês "*Lipoteichoic acid*"

mA – Miliampére

MFI – Mediana da Intensidade de Fluorescência

µg – micrograma

µl - Microlitro

mg – Miligrama

$MgCl^2$ - Cloreto de magnésio

MHC – do inglês "*Major Histocompatibility Complex*"

MIP-2 – do inglês "*Macrophage Inflammatory Protein-2*"

ml – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de sódio

NBT/BCIP - Nitro Blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

nm – Nanômetro

ºC – Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVA – Ovoalbumina

PBMC – do inglês "*Peripheral blood mononuclear cells*"

PBS – do inglês "*Phosphate Tampãoed saline*"

PCR – do inglês "*Polimerase chain reaction*"

PE – Ficoeritrina

pH – Potencial Hidrogeniônico

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

RCT – Receptor de célula T

ScpC – do inglês "*Streptococcus derived serine protease*"

SDS-Page – do inglês "*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*"

SFB – Soro Fetal Bovino

smeZ – do inglês "*Streptococcal mitogenic exotoxin Z*"

SOF – do inglês "*Serum opacity factor*"

speA – do inglês "*Streptococcal pyrogenic exotoxin A*"

speB – do inglês "*Streptococcal pyrogenic exotoxin B*"

speC – do inglês "*Streptococcal pyrogenic exotoxin C*"

speG – do inglês "Streptococcal superantigen G"

speH – do inglês "Streptococcal superantigen H"

speJ – do inglês "Streptococcal superantigen J"

SpyCEP – do inglês "*Streptococcus pyogenes cell envelope protease*"

SSC – do inglês "*Side Scater*"

STSS – do inglês "*Streptococcal toxic shock syndrome"*

SUS – Sistema Único de Saúde

TA – Temperatura ambiente

TBS – do inglês "*Tris Tampãoed Saline*"

TCA - do inglês *"Trichloroacetic acid"*

TE – Solução de Tris e EDTA

TNF-α – do inglês "*Tumor necrosis factor alpha*"

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

U – Unidade

UV – Ultravioleta

V – Volts

v/v – Relação volume/volume

Vβ – Cadeia variável β do receptor de célula T

∞ - infinito

% - Porcentagem

Lista de Figuras

Figura 1- Delineamento experimental: etapas e fluxo da realização do trabalho.....21

Figura 2- Frequência dos tipos *emm* encontrados. 48

Figura 3- Reatividade do pool de soros de camundongos BALB/c imunizados com StreptInCor e controles contra extrato da proteína M1 e M5. 49

Figura 4- Alinhamento de aminoácidos da região C-terminal da proteína M de diferentes cepas de *S. pyogenes* com a sequência de aminoácidos do StreptInCor. 50

Figura 5- Neutralização de diferentes cepas por anticorpos anti-StreptInCor. 52

Figura 6- Percentual de inibição da capacidade de adesão/invasão da cepa M1 às células HEp-2.....53

Figura 7- Percentual de inibição da adesão/invasão da cepa M1 às células HEp-2. 54

Figura 8- Opsonofagocitose de *S. pyogenes* com células de camundongos da linhagem BALB/c. 55

Figura 9- Opsonofagocitose de *S. pyogenes* com células de camundongos da linhagem Swiss. 56

Figura 10- Opsonofagocitose da cepa M1. 57

Figura 11- Avaliação de segurança. 58

Lista de Tabelas

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação do gene *emm* descritos por Whatmore e Kehoe, 1994 25

Tabela 2- Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR para a amplificação do gene *emm* 25

Tabela 3- Parâmetros empregados no ciclo da PCR para amplificação do gene *emm*.....25

Tabela 4- Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR pré-sequenciamento (Big Dye®).....26

Tabela 5- Parâmetros do ciclo da PCR pré-sequenciamento (Big Dye®).....26

Tabela 6- Rendimento final das proteínas totais do extrato de cepas de *S. pyogenes* 28

Resumo

De Amicis KM. *Análise "in vitro" da capacidade de cobertura da vacina em desenvolvimento contra Streptococcus pyogenes* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013. 77p.

O *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de Lancefield) é uma bactéria Gram positiva e beta-hemolítica, responsável por infecções, tais como Faringite, Sepse, Fasciíte Necrotizante e Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócico. Indivíduos suscetíveis podem desenvolver sequela não supurativa auto-imune pós-estreptocócica, como a Febre Reumática, Doença Reumática Cardíaca e a Glomerulonefrite Aguda. A proteína M é o principal antígeno bacteriano. Consiste em aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos dispostos em quatro regiões (A, B, C e D), contendo alguns blocos de repetições. As regiões C e D são conservadas e a N-terminal (regiões A e B) é polimórfica. Atualmente, existem mais de 250 genótipos de *emm* conhecidos em todo o mundo, de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention*. Há vários anos, o desenvolvimento de uma vacina contra *S. pyogenes* (StreptInCor - identificação médica) foi iniciado, com base na região conservada da proteína M, com o objetivo de proteger o indivíduo vacinado contra infecções estreptocócicas, sem causar reações autoimunes. No presente estudo foi analisada a capacidade *"in vitro"* de anticorpos anti-StreptInCor neutralizarem/opsonizarem as cepas de *S. pyogenes* mais freqüentes em São Paulo, através da análise do reconhecimento das cepas por soros de camundongos imunizados com StreptInCor. Também foi avaliada por *Western blotting* a presença de anticorpos de reação cruzada dirigidos ao tecido cardíaco valvular humano. Anticorpos anti-StreptInCor foram capazes de neutralizar/opsonizar, pelo menos, cinco diferentes cepas mostrando que a imunização com StreptInCor pode ser eficaz contra várias cepas de *S. pyogenes*, assim como prevenir a infecção e sequelas subsequentes, sem causar reações auto-imunes.

Descritores: 1.*Streptococcus pyogenes* 2.Vacinas de subunidades 3.Vacinas estreptocócicas 4.Febre reumática 5.Cobertura vacinal 6.Anticorpos/Imunologia 7.*"in vitro"*

Summary

De Amicis KM. *"in vitro" analysis of the coverage capacity of the vaccine under development against most frequent strains of Streptococcus pyogenes* [Dissertation]. São Paulo: "Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina"; 2013. 77p.

Streptococcus pyogenes (Group A) is a Gram positive and beta-hemolytic bacteria, responsible for infections such as Pharyngitis, Sepsis, Necrotizing Fasciitis and Streptococcal Toxic Shock Syndrome. Susceptible individuals may develop post-streptococcal non-suppurative autoimmune sequelae such as Rheumatic Fever, Rheumatic Heart Disease and Acute Glomerulonephritis. The M protein is the major bacterial antigen. It consists of approximately 450 amino acid residues arranged in four regions (A, B, C and D), containing some repeated blocks. C and D regions are conserved and the N-terminus (regions A and B) is polymorphic. Currently there are over 250 known *emm* genotypes worldwide, according to the Centers for Disease Control and Prevention. Several years ago the development of a vaccine against *S. pyogenes* (StreptInCor - medical identification) was initiated, based on the M protein conserved region, aiming to protect against streptococcal infections without causing autoimmune reactions. In the present study we analyzed the *"in vitro"* ability of anti-StreptInCor antibodies to neutralize/opsonize the most frequent *S. pyogenes* strains in Sao Paulo by examining the strains recognition by sera from StreptInCor immunized mice. We also evaluated the presence of cross reactive antibodies directed to the human heart valve tissue by *Western blotting*. Anti-StreptInCor antibodies were able to neutralize/opsonize at least 5 strains, showing that the immunization with StreptInCor can be effective against several *S. pyogenes* strains as well as preventing infection and subsequent sequelae, without causing autoimmune reactions.

Descriptors: 1.*Streptococcus pyogenes* 2.Vaccine, subunit 3.Streptococcal vaccine 4.Rheumatic fever 5.Immunization coverage 6.Antibodies/immunology 7.*"in vitro"*

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pyogenes*

O *Streptococcus pyogenes* é um patógeno estritamente humano. Foi primeiramente caracterizado por Rebecca Lancefield como Estreptococo Beta-hemolítico do Grupo A ou *GAS* (*GAS*, do inglês *Group A Streptococcus*) em função do carboidrato C, um polímero de N-acetil-β-D-glicosamina e ramnose presente na parede da bactéria (Lancefield, 1933).

O *S. pyogenes* é uma bactéria extracelular, em forma de cocos agrupados em cadeia. Possui característica Gram positiva quando corada pelo método de Gram e capacidade β-hemolítica quando cultivado em ágar sangue. As colônias podem ser altamente mucóides ou secas e catalase negativas (Trabulsi et al, 1999).

1.2 Resposta Imunológica contra bactérias extracelulares

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos e os principais mecanismos contra bactérias extracelulares são a ativação do Sistema Complemento, a fagocitose e a resposta inflamatória (Abbas et al, 2011).

O Sistema Complemento é formado por diversas proteínas plasmáticas que são ativadas em sequência por clivagem proteolítica. Como consequência desta ativação, há o aumento da opsonização e fagocitose das bactérias, e a liberação de subprodutos da ativação que estimulam as respostas inflamatórias por recrutamento e ativação de leucócitos (Ricklin et al, 2010).

Através da fagocitose realizada pelas Células Apresentadoras de Antígenos (APC), há o processamento dos antígenos bacterianos e a apresentação dos peptídeos antigênicos pelas moléculas HLA de classe II às células do sistema imunológico adaptativo, linfócitos T e B, que possuem receptores específicos em sua superfície capazes de reconhecer o antígeno e organizar a resposta imunológica específica, guardando memória imunológica. Além disso, anticorpos podem reconhecer diretamente os peptídeos bacterianos liberados durante a infecção, ativando a resposta de células B. Por isso, a principal resposta imunológica adquirida contra bactérias extracelulares consiste então na produção de anticorpos específicos que neutralizam e opsonizam a bactéria para a fagocitose e ativam o Sistema Complemento (Abbas et al, 2011).

1.2.1 Evasão á fagocitose, colonização e interação com o sistema imunológico hospedeiro

O *S. pyogenes* encontra uma variedade de forças biológicas, mecânicas e químicas que devem ser vencidas para que possa se aderir e colonizar o epitélio do hospedeiro. O epitélio secreta lipídeos que inibem o crescimento dos estreptococos e serve como uma excelente barreira mecânica para infecções (Bibel et al, 1989).

O *S. pyogenes* possui cápsula constituída de um homopolímero de ácido hialurônico, idêntico ao constituinte mais abundante da matriz extracelular das células humanas. Este mimetismo permite a camuflagem da bactéria e faz com que não seja reconhecida como um antígeno patogênico (Kwinn & Nizet, 2007).

O estreptococo também deve se replicar a um índice que exceda o índice de descamação das células hospedeiras. Além disso, os estreptococos enfrentam competição com outras bactérias do mesmo nicho biológico e algumas dessas bactérias podem secretar bacteriocinas efetivas (Courtney et al, 2002).

Após ultrapassar os obstáculos, o *S. pyogenes* irá utilizar componentes específicos da sua superfície (adesinas) para mediar a adesão com estruturas da superfície das células hospedeiras (receptores). Várias moléculas do *S. pyogenes* são caracterizadas como adesinas, entre elas a proteína M, o ácido lipoteicóico, a proteína ligadora de fibronectina, a proteína ligadora de vitronectina, a proteína ligadora de colágeno, o fator de opacidade do soro e a cápsula de ácido hialurônico (Courtney et al, 2002). Muitas proteínas da célula hospedeira têm sido descritas como receptores ou ligadores que permitem a aderência do GAS às células hospedeiras. Entre elas estão a fibronectina, o colágeno, a vitronectina e o CD 46 (do inglês "*Membrane cofactor protein"*) (Beachey & Courtney, 1987).

A fixação do GAS às células da orofaringe ou da pele é o passo inicial mais importante na colonização do hospedeiro. Sem fortes mecanismos de aderência o estreptococo poderia não aderir aos tecidos e ser removido pelo muco, pelo fluxo de saliva ou pelos mecanismos de esfoliação epitelial. A adesão específica permite a competição entre a microbiota humana e o GAS por sítios no tecido onde a microbiota vive (Cunningham, 2000).

Já foi demonstrado que o *S. pyogenes* é capaz de invadir as células epiteliais humanas com uma freqüência maior ou igual do que a *Listeria sp.*, uma bactéria classicamente intracelular (LaPenta et al, 1994).

Além disso, o *S. pyogenes* produz e secreta fatores de virulência que estão envolvidos na patogênese do Choque Tóxico Estreptocócico e na Fasciíte Necrotizante. Estes fatores de virulência são exotoxinas pirogênicas extracelulares, como a speA, a speC e superantígenos como a exotoxina F (fator mitogênico) e o superantígeno estreptocócico (ssa) (Mollick et al, 1993; Reda et al, 1994). Muitos outros superantígenos com forte atividade mitogênica têm sido reportados, como o speG, speH, speJ, smeZ (Mollick et al, 1992).

Todas estas exotoxinas agem como superantígenos, interagindo com as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC do inglês "*Major Histocompatibility Complex*") de classe II e um número limitado das regiões Vβ dos receptores de linfócitos T. Assim, podem ativar inespecificamente um número massivo de células T. Esta ativação libera uma grande quantidade de interleucinas e citocinas inflamatórias como o TNF-α e o IFN-γ (Norrby-Teglund et al, 2002).

A exotoxina pirogênica B (speB) é uma cisteína protease extracelular clivadora de proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e a vitronectina (Kapur et al, 1993b) e também é capaz de clivar IL-1β (Kapur et al, 1993a), uma importante mediadora da resposta inflamatória. Além disso, a speB é capaz de clivar o C3b, que é um fator regulador da atividade do sistema complemento, ativando diretamente a via clássica e contribuindo para a evasão á resposta imune inata (Terao et al, 2008).

O Fator de Opacidade do Soro (SOF) é uma proteína produzida por aproximadamente 50% das cepas de *S. pyogenes*, ligada à superfície ou secretada. A

região amino-terminal liga apolipoproteínas presentes no soro, levando à opacificação, enquanto a região carboxi-terminal funciona como adesina via ligação com a fibronectina. esta opacificação dificulta a movimentação das células de defesa para a região infectada (Gillen et al, 2008).

A opsonização de microorganismos extracelulares ocorre também através da ativação das vias clássica e alternativa do Sistema Complemento, por deposição de C3b ou do seu fragmento de clivagem iC3b na superfície do microorganismo. Receptores para as proteínas do Sistema Complemento (CR) nos neutrófilos e macrófagos ligam o C3b (CR1) ou iC3b (CR3 e CR4) para facilitar a fagocitose. Visto que o Sistema Complemento é capaz de amplificar eficientemente suas próprias funções, provavelmente ocorreria um dano nas células hospedeiras se não houvessem proteínas regulatórias de sua ação como o C4BP e o Fator H (FH), que inibem a atividade das vias clássica e alternativa, respectivamente (Ricklin et al, 2010). O GAS possui a capacidade de ligar C4BP e FH em seus sítios específicos na região hipervariável da proteína M, descrita por Rebecca Lancefield em 1962 como um dos principais antígenos da bactéria, interferindo na opsonofagocitose (Berggård et al, 2001; Morfeldt et al, 2001; Thern et al, 1995).

As proteínas do Sistema Complemento desempenham um papel fundamental na resposta imunológica inata contra as bactérias. Essas proteínas cobrem a bactéria, agindo como opsoninas para facilitar a fagocitose e geram substâncias que atraem fagócitos para o sítio de infecção. Ao longo da evolução, o *S. pyogenes* desenvolveu estratégias para escapar da resposta do Sistema Complemento, produzindo inibidores e ligando à sua parede os reguladores negativos deste sistema, como o C3b e Fator H (Laarman et al, 2010).

O *S. pyogenes* desenvolveu mecanismos para interferir com duas das mais potentes moléculas promotoras do recrutamento de neutrófilos, a interleucina oito

(CXCL8) e C5a, uma anafilatoxina derivada da clivagem de C5 (Kwinn & Nizet, 2007). A IL-8 é uma proteína multifuncional envolvida na migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o local de infecção. Além disso, a IL-8 é encontrada na superfície luminal dos microvasos e serve como um sinal de parada para o rolamento dos neutrófilos (Middleton et al, 1997).

O estreptococo do grupo A produz uma potente serino protease denominada ScpC ou SpyCEP, que é expressa em sua superfície e cliva especificamente a região C-terminal da IL-8, levando à inativação funcional da quimiocina (Edwards et al, 2005; Zingaretti et al, 2010). Em modelos murinos, a SpyCEP também cliva quimiocinas, como a MIP-2, e no modelo de Fasciíte Necrotizante a perda de expressão de SpyCEP pelo GAS reduz dramaticamente sua virulência, refletindo em um influxo de neutrófilos para o local da infecção (Hidalgo-Grass et al, 2006).

Outra forma efetiva de opsonização é aquela mediada pelos anticorpos gerados contra antígenos bacterianos específicos. Estes promovem a fagocitose por APCs que expressam receptores de superfície para a região Fc das imunoglobulinas além de mediar a ativação da Via Clássica do Sistema Complemento.

O GAS escapa das defesas inatas do hospedeiro por vários mecanismos, incluindo mimetismo molecular, diversidade antigênica, e proteínas específicas que degradam imunoglobulinas, criando um cenário não propício à opsonização e interferindo com o reconhecimento do GAS opsonizado por receptores de Fc nos fagócitos (Kwinn & Nizet, 2007). Além disso, interfere na função efetora das imunoglobulinas através da ligação da região Fc em sua superfície, ou seja, em uma orientação que não permite a opsonização e inativa os efeitos das imunoglobulinas (Kwinn & Nizet, 2007). Muitos subtipos de proteína M têm a capacidade de se ligar a regiões Fc de IgG ou IgA (Carlsson et al, 2003; Stenberg et al, 1992).

As doenças sistêmicas causadas por GAS refletem as diversas habilidades da bactéria de escapar da erradicação por defesas fagocíticas do sistema imunológico inato (Kwinn & Nizet, 2007).

1.3 Composição antigênica e classificação das cepas de *S.pyogenes*

1.3.1 Proteína M

A proteína M é descrita como um dos principais antígenos da bactéria (LANCEFIELD, 1962). Apresenta-se como um conjunto de fibrilas que se extendem por 60 nm na superfície da bactéria, dispostas em duas cadeias polipeptídicas em alfa-hélice dupla, *coiled-coil*. É constituída por aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos agrupados em blocos de repetições, distribuídos em quatro regiões (A, B, C e D). A porção N-terminal (regiões A e B) é a mais polimórfica e as diferenças nos primeiros 150 resíduos de aminoácidos da região A permitem classificar os diferentes sorotipos de *S. pyogenes* (Bisno et al, 2003; Fischetti et al, 1988). Pesquisadores de diversos países fizeram a genotipagem de cepas conforme protocolo proposto pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para traçar um perfil das cepas mais prevalentes. Atualmente existem mais de 250 tipos M e mais de 450 subtipos diferentes de acordo com o CDC, dados disponíveis em http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.htm.

Os blocos de repetição na região N-terminal não aparecem em mesmo número em todas as cepas, dando versatilidade a estas proteínas (Smeesters et al, 2010).

Por outro lado, a porção C-terminal (regiões C e D) é altamente conservada e é responsável pela fixação da bactéria à mucosa da orofaringe, além de apresentar propriedade antifagocítica (Bisno et al, 2003; Fischetti et al, 1988).

Evidências da propriedade desta proteína de inibir a fagocitose foram constatadas primeiramente em estudos *ex vivo* utilizando sangue total humano (Todd & Lancefield, 1928). Mais recentemente, estudos *"in vitro"* demonstraram outras funções para a proteína M, incluindo adesão às células epiteliais (Courtney et al, 2002; Okada et al, 1995), formação de complexos tóxicos solúveis com fibrinogênio (Herwald et al, 2004) e camuflagem de outros componentes da superfície bacteriana (Waldemarsson et al, 2006).

No Brasil, foram identificados 48 tipos M diferentes a partir de 128 amostras isoladas em Brasília, sendo as mais prevalentes a M53, M22, M49, M58, M83 e M8. Neste mesmo estudo, foram genotipadas amostras da Bélgica, onde as cepas mais freqüentes foram: M6, M1, M12, M89, M4 e M3 (Smeesters et al, 2006).

Na Noruega foram observados 37 tipos M diferentes a partir de 292 amostras analisadas e os tipos M mais prevalentes foram M1, M28, M3, M12 e M89 (Meisal et al, 2010). Já na Alemanha, em 586 amostras analisadas foram identificados 49 tipos M diferentes e os tipos M28, M1, M82, M12, M4, M3, M 87, M89 e M6 foram os mais prevalentes (Imöhl et al, 2010).

Os padrões de distribuição das cepas podem ser oligoclonais, com poucos tipos M prevalentes, ou policlonais, com vários tipos M diferentes. A policlonalidade ocorre em lugares onde há migração massiva recente, decorrente do rápido desenvolvimento das cidades. As pressões seletivas existentes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, assim como diferenças regionais no mesmo país favorecem a evolução genética dos tipos M (Smeesters et al, 2006).

Estudos na Coréia (Kim et al, 1996), no México (Espinosa et al, 2003) e na Austrália (Bessen et al, 2000) onde predomina a população aborígene, apresentam poucos tipos M predominantes. Já outros países como a Índia (Dey et al, 2005) e o Nepal (Sakota et al, 2006) apresentam maior diversidade de tipos M.

As cepas M1 e M12 são descritas como as mais freqüentes em estudos recentes realizados em diversos países (Steer et al, 2009c).

Em um estudo realizado na China com amostras de *S. pyogenes* isoladas de infecções invasivas e não-invasivas, em dois períodos distintos, encontrou-se uma freqüência elevada de cepas M1 e M12 em ambos os períodos estudados (Ma et al, 2009). Em um estudo realizado na Romênia nos anos de 2003 e 2004, o mesmo foi observado (Luca-Harari et al, 2008a). Em Barcelona, na Espanha, foi realizado um estudo com amostras isoladas no período de 1999 a 2003, e a cepa M1 foi a cepa mais freqüentemente identificada nestas amostras, seguida de M3, M4 e M12 (Rivera et al, 2006). Na Alemanha (Imöhl et al, 2010) e na Dinamarca (Meisal et al, 2010) a cepa M1 também está entre as mais freqüentes, além de M12 e M89.

A cepa M1 está amplamente envolvida em infecções invasivas e não-invasivas em diversos estudos realizados nos EUA e na Europa. Nos EUA, um estudo realizado com amostras invasivas coletadas entre 1995 a 1999 também mostrou que as cepas mais freqüentes nestes isolados eram M1, M28, M12, M3 e M11 (O'Brien et al, 2002). Os tipos M1, M3, M11, M12 e M28 são classicamente associados a amostras invasivas (Cunningham, 2000). Em contraste, estudos realizados na Romênia e na Noruega com amostras não invasivas, mostraram uma grande incidência de M1 e M12 (Luca-Harari et al, 2008b; McMillan et al, 2006). A cepa M77, também aparece entre os 10 tipos M mais freqüentes nos EUA e Canadá de 2000-2005 (Shulman et al, 2006). Na Alemanha,

em 2010, um grupo de pesquisadores observou um padrão diferente de distribuição de cepas do estudo com amostras coletadas na Alemanha no período de 1997 a 2003 (Lintges et al, 2010), que mostrou que M77 foi a cepa mais prevalente nos isolados oriundos de infecções não-invasivas.

O conceito de distinção entre cepas que preferencialmente atacam a orofaringe e cepas que preferencialmente atacam a pele surgiu a partir de décadas de estudos epidemiológicos, nos quais se tornou evidente que há sorotipos de estreptococos do grupo A com uma forte tendência de causar infecções de orofaringe e igualmente, existem outros sorotipos mais associados com o impetigo (Bessen et al, 2000). Esta distinção é realizada através de um método molecular chamado "tipagem de padrão *emm*" (do inglês *emm* pattern-typing) que distingue diferentes arranjos cromossomais (padrões A-C, D e E) baseado na presença e arranjo do gene *emm* no genoma do GAS.

As cepas relacionadas com a infecção de pele são associadas à indução de GNA (Glomerulonefrite Aguda) pós-estreptocócica. As infecções de pele e a nefrite são sasonais; ocorrem freqüentemente no verão e em climas temperados (Bessen et al, 2000).

1.4 Características clínicas e epidemiológicas das doenças causadas por *S. pyogenes*

O *S. pyogenes* é o agente causador de várias doenças, que vão desde infecções superficiais até doenças invasivas graves e sequelas debilitantes. Entre as doenças superficiais, as mais comuns são a Faringite e o Impetigo, entre as invasivas podemos destacar a Síndrome do Choque Tóxico Estreptocócico (STSS) e a Fasciíte

Necrotizante. A Febre Reumática (FR), a Glomerulonefrite Aguda Estreptocócica (GNA) e a Doença Reumática Cardíaca (DRC) são sequelas não-supurativas autoimunes pós-estreptocócicas, que decorrem de resposta imunológica tardia à infecção em populações geneticamente predispostas (**Narula** et al, 1999b).

A FR afeta aproximadamente 1%-4% das crianças e jovens entre 3 e 16 anos acometidas por faringo-amigdalite, em um período de 1 a 5 semanas após a infecção (Décourt & da Silva, 1972).

As manifestações clínicas principais da FR são: poliartrite migratória, Coréia de Sydenham, eritema marginatum, cardite e nódulos subcutâneos (Dajani et al, 1994).

Poliartrite é a primeira e a mais comum manifestação da FR, afetando aproximadamente 90% dos pacientes. Já a DRC é a sequela mais severa. Inicia-se de 4-8 semanas após a infecção pelo estreptococo em 30-45% dos pacientes (Narula et al, 1999a).

O acometimento cardíaco é caracterizado pela pancardite, entretanto são as lesões valvares as responsáveis pelo quadro clínico e pelo prognóstico (Barbosa PJB et al, 2009). A importância médica da FR é devida às severas manifestações cardíacas da DRC que levam à troca de válvulas ou morte (Stollerman, 1988).

De acordo com a OMS, o *S. pyogenes* é o responsável por 15%-20% das faringoamigdalites e pela quase totalidade daquelas de origem bacteriana, que acometem preferencialmente indivíduos de 5 a 18 anos (Carapetis et al, 2005). Sua incidência varia entre os países e dentro do mesmo país ocorrem variações entre diferentes regiões, oscilando em função da idade do indivíduo, das condições socioeconômicas, dos fatores ambientais e da qualidade dos serviços de saúde (Barbosa PJB et al, 2009).

Vários marcadores genéticos são descritos como fatores de risco para a FR/DRC, estes incluem os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade, como o HLA-DR7, que foi o alelo mais consistentemente associado à DRC, tanto no Brasil quanto em outros países (Guilherme et al, 2011b).

A FR e a DRC estão frequentemente associadas às condições socioeconômicas que favorecem a difusão da bactéria pela falta de tratamento e condições sanitárias. Assim, apesar da reconhecida redução da incidência da FR nas últimas décadas nos países desenvolvidos, com conseqüente redução em sua prevalência, FR e DRC permanecem como um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2004).

A FR possui uma distribuição universal, mas com marcada diferença nas taxas de incidência e prevalência entre os diversos países, constituindo a principal causa de cardiopatia adquirida em crianças e adultos jovens nos países em desenvolvimento (Kaplan, 1996). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) registraram no ano de 2005 cerca de 15,6 milhões de portadores de DRC; cerca de 300.000 novos casos/ano; e 233.000 mortes diretamente atribuíveis à DRC a cada ano no mundo (Carapetis et al, 2005). Na Índia, a prevalência da FR/DRC varia de 0,5 a 11/1000 indivíduos (Saxena et al, 2008).

Os dados disponíveis no Brasil, a partir do sistema DATASUS, informam basicamente sobre internações hospitalares e intervenções, não correspondendo à totalidade dos casos diagnosticados no país. Estudos realizados na população de escolares em algumas capitais brasileiras estimaram a prevalência de DRC em 1-7 casos/1.000, o que é significativamente maior do que a prevalência da doença em países

desenvolvidos, como nos Estados Unidos, onde varia entre 0,1-0,4 casos/1.000 escolares (Carapetis et al, 2005; Xavier et al, 2004).

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

A frequência da FR aguda no Brasil difere de acordo com a região geográfica, porém em todas as regiões observa-se uma redução progressiva do total de internações por esta doença. A taxa de mortalidade por DRC em pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) foi de 6,8% em 2005 e de 7,5% em 2007, com gasto aproximado no tratamento clínico de 52 milhões de reais em 2005 e de 55 milhões em 2007. Gastos de cerca de 94 milhões de reais em 2005 e de 100 milhões em 2007 em procedimentos intervencionistas, cirurgias e valvotomias percutâneas também foram direcionados ao tratamento das sequelas cardíacas da FR (Barbosa PJB et al, 2009).

Os gastos gerados pela assistência aos pacientes com FR e DRC no Brasil são altos. Em 2007, foram gastos pelo SUS cerca de R$ 157.578.000,00 em internações decorrentes de FR ou DRC, de origem clínica ou cirúrgica, sendo que, das cirurgias cardíacas realizadas neste período, 31% abordaram pacientes com sequelas de FR. Na análise de morbidade, o cálculo do índice DALYs – *disability-adjusted life years* (anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade) - no ano 2000 mostrou o total de 55 mil anos de vida perdidos em decorrência da FR, correspondendo a 26 anos por paciente anualmente no Brasil (Barbosa PJB et al, 2009).

1.5 Mimetismo molecular: patogênese da FR/DRC

A patogênese das seqüelas autoimunes pós-estreptocócicas está relacionada com a produção de anticorpos e células T autoreativas, que reagem cruzadamente e reconhecem epitopos da proteína M do *S. pyogenes* e de tecido cardíaco humano por mimetismo molecular (Guilherme et al, 1995).

O mimetismo molecular é definido como o compartilhamento de epitopos entre antígenos do hospedeiro e do estreptococo. Para anticorpos, três tipos de mimetismo têm sido definidos entre antígenos, incluindo o compartilhamento de: (1) sequência de aminoácidos idêntica, (2) sequência de aminoácidos homóloga, porém não-idêntica (3) epitopos em moléculas diferentes como peptídeos e carboidratos (Barnett & Fujinami, 1992; Shikhman & Cunningham, 1994; Shikhman et al, 1993; Shikhman et al, 1994). Também pode ocorrer mimetismo entre DNA e peptídeos (Cunningham et al, 1986; Putterman & Diamond, 1998) ou carboidratos e gangliosídeos (Kirvan et al, 2003).

Na patogênese de doenças autoimunes, o mimetismo significa que as sequências são reconhecidas por células T específicas para as moléculas relacionadas com a doença, como no caso da cardite reumática (Guilherme & Kalil, 2010). Entretanto, o mimetismo é um tipo de degeneração das células T. A habilidade das células T em reconhecer uma enorme gama de antígenos é importante para o repertório de células T, já que o Receptor da Célula T (RCT) não sofre mutações somáticas como fazem os genes das cadeias variantes dos anticorpos. O mimetismo pode desencadear o processo de doença em um órgão alvo e levar a uma doença autoimune crônica através do espalhamento de epitopos (McMahon et al, 2005).

O mecanismo de espalhamento de epitopos (“epitope spreading”) é bem estabelecido e sabe-se que durante a resposta imunológica, a reatividade é induzida também a epitopos diferentes daqueles epitopos que deram origem à reação contra o patógeno (Sercarz et al, 1993).

O mimetismo molecular entre o *S. pyogenes* e as proteínas do tecido cardíaco foi demonstrado através da análise do repertório de células T infiltrantes do tecido cardíaco levando ao dano tecidual na DRC. Foi observado pela primeira vez que 7.5% de clones de células T isolados de biópsias de lesões cardíacas de pacientes com DRC grave, possuem a habilidade de reconhecer simultaneamente peptídeos da proteína M e proteínas derivadas do tecido cardíaco, que evidenciou o mecanismo de mimetismo molecular mediado por células T. Através do isolamento e clonagem de células T infiltrantes de lesões do tecido cardíaco, foi possível demonstrar a existência de reatividade cruzada entre clones de células T intralesionais. Propusemos que as lesões do tecido cardíaco na DRC são oriundas do reconhecimento cruzado de proteínas cardíacas por anticorpos contra proteínas estreptocócicas decorrentes do mimetismo molecular. Três regiões da proteína M5 (resíduos 1–25, 81–103 e 163–176) reagiram cruzadamente com muitas frações de proteínas cardíacas, a maioria delas derivada de tecido valvular apresentando massa molecular de 95–150, 43–65 e 30–43 kDa, respectivamente (Guilherme et al, 1995). Na seqüência, foi definida a região imunodominante da proteína M5 (81–103), reconhecida pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e por clones de células T intralesionais (Guilherme et al, 2001).

A porção N-terminal da proteína M, o principal antígeno do *S. pyogenes*, pode levar a lesões cardíacas autoimunes. No tecido cardíaco, um grande número de células

produtoras de citocinas inflamatórias e algumas poucas células mononucleares das válvulas estão aptas a secretar IL-4, uma citocina reguladora que leva à progressão do dano tecidual (Guilherme et al, 2004).

Células T dos linfonodos de camundongos imunizados com miosina cardíaca reagiram cruzadamente com peptídeos sintéticos desenhados a partir de porções da proteína M5 (Cunningham et al, 1997).

1.6 Desenvolvimento de vacinas contra o *S. pyogenes*

Tradicionalmente, a profilaxia primária e secundária de infecções estreptocócicas é a administração de penicilina-benzatina. O desenvolvimento de uma vacina contra o *S. pyogenes* trará inúmeros benefícios, prevenindo não só infecções estreptocócicas, como seqüelas destas estreptococcias (FR/DRC e Glomerulonefrite).

Devido à alta capacidade imunogênica da proteína M, esta é o principal alvo de estudo para o desenvolvimento de uma vacina comtra o *S. pyogenes.* Assim, a maioria das vacinas até hoje produzidas são baseadas no uso da proteína M como indutora de imunidade protetora. Várias abordagens de vacina contra o GAS foram testadas ao longo dos anos, desde 1923 à presente data (Steer et al, 2009a).

As primeiras vacinas propostas usavam a bactéria inteira inativada e foram abandonadas devido a reações adversas. Posteriormente, até 1979, passou-se a usar a proteína M inteira de cepas específicas, porém houve indução de doença autoimune. Na década de 80, novas abordagens foram introduzidas, em modelo de peptídeo sintético. Após, modelos com base na porção N-terminal (cepa-específica) foram introduzidos por

metodologia de proteína recombinante, e as vacinas hexavalente e 26-valente, que continham os sorotipos mais prevalentes nos EUA, entraram em ensaios clínicos de fase I e II (McNeil et al, 2005). Paralelamente, novas abordagens para a definição de epitopos protetores e modelos de vacinas de peptídeo sintético foram idealizados, tanto baseados na região N-terminal quanto na região C-terminal. Além disto, atualmente existem oito modelos em estudo que são baseados em outros antígenos estreptocócicos que não a proteína M (Pandey et al, 2012; Steer et al, 2009b).

Considerando-se os altos custos sócio-econômicos envolvidos com a FR/DRC no Brasil e em países em desenvolvimento e com base nos conhecimentos adquiridos sobre a patogênese da DRC, iniciamos há aproximadamente 15 anos o processo de desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o estreptococo beta hemolítico do grupo A, sem desencadear auto-imunidade.

Nossa abordagem leva em consideração conceitos de como o sistema imune poderia ser mais eficiente na indução de resposta imunológica protetora via linfócitos T e B visando prevenir a adesão e invasão das células endoteliais da garganta, consequentemente bloqueando a infecção local. Também são imvestigadas formas de prevenir reações autoimunes nocivas, visando evitar o desencadeamento de FR/DRC com base nos estudos ao longo dos últimos 20 anos, que permitiram uma melhor compreensão das bases celulares e moleculares da patogênese que leva à DRC. Outras patologias decorrentes da infecção por *S. pyogenes* também podem ser controladas.

Brevemente, a vacina tem como base sequências conservadas de aminoácidos da região C-terminal (regiões C2 e C3) da proteína M5 do *S. pyogenes*, a proteína M mais bem descrita na época em que iniciou-se o desenho da vacina. Com o intuito de definir epitopos com potencial protetor, foi avaliada a reatividade humoral e celular a 100

resíduos de aminoácidos da região C-terminal (aminoácidos 250 a 350) desta proteína, através do uso de 79 peptídeos contendo 20 resíduos de aminoácidos compartilhados (variação de 01 resíduo de aminoácido em cada extremidade). Através de 620 amostras de soro humano e 260 amostras de linfócitos de sangue periférico foi possível definir os epitopos B e T imunodominantes, respectivamente. O epitopo B é composto por uma seqüência de 22 resíduos de aminoácidos e o epitopo T, por uma seqüência de 25 resíduos de aminoácidos (Guilherme et al, 2006a).

A partir da seleção dos epitopos B e T em humanos, foi sintetizado um peptídeo de 55 resíduos de aminoácidos, denominado StreptInCor (identificação médica) (Guilherme et al, 2006a), que contém os epitopos B e T, ligados entre si por 8 resíduos de aminoácidos, em conformidade com o segmento natural da proteína:

KGLRRDLDASREAKKQLEAEQQKLEEQNKISEASRKGLRRDLDASREAKKQVEKA

(patentes INPI 0501290/0604997-4, PCT-BR07/000184).

Esta abordagem levou em consideração a afinidade do epitopo selecionado às moléculas de HLA de classe II tendo em vista a habilidade do epitopo de ativar células T via RCT, visto que a ativação de células T estimula a ativação de células B induzindo a produção de anticorpos com potencial protetor. A predição de ligação do StreptInCor a diferentes moléculas HLA de classe II foi realizada com base na análise dos 55 resíduos de aminoácidos do peptídeo e em possibilidades teóricas dos peptídeos processados encaixarem-se nos bolsões P1, P4, P6 e P9 das APC, combinados com diferentes moléculas HLA de classe II. Foram observados 7 potenciais sítios de ligação ao longo da sequência do StreptInCor que podem ser reconhecidos por moléculas HLA de classe II (DRB1*, DRB3*, DRB4* e DRB5*), o que torna a vacina uma candidata universal (Guilherme et al, 2011a).

O StreptInCor, agente vacinal na forma de peptídeo sintético, já foi testado em camundongos, utilizando-se como adjuvante o hidróxido de alumínio. Camundongos das linhagens BALB/c e Swiss apresentaram ótima resposta humoral contra o StreptInCor, com alta produção de IgG. Após desafio com a cepa M1 (mais prevalente em episódios de estreptococcias) de camundongos Swiss imunizados com o StreptInCor, a taxa de sobrevida foi de 100% enquanto que para grupo controle a sobrevida foi de 40% em até 21 dias. A análise histopatológica dos órgãos dos animais imunizados mostrou que o StreptInCor não induziu toxicidade nos mesmos (Postol et al, 2013). Camundongos transgênicos para as moléculas HLA de classe II DR2, DR4, DQ6 e DQ8 foram imunizados com StreptInCor, utilizando o adjuvante hidróxido de alumínio (Alum). A partir da administração do antígeno vacinal, foram induzidos altos títulos de IgG1 (Th2, dependente de IL-4) e IgG2a (Th1, dependente de IFN-γ). Além disso, os anticorpos IgG foram capazes de reconhecer o epitopo vacinal em uma proteína M1 estreptocócica heteróloga recombinante, indicando que o StreptInCor possui potencial efeito protetor. Estes camundongos transgênicos foram capazes de produzir altos títulos de anticorpos específicos pelo período de um ano, além de não apresentarem reatividade contra miosina cardíaca porcina purificada e extrato protéico de miocárdio humano. Também não foram observadas reações adversas nem autoimunes em vários órgãos analisados, indicando que a vacina candidata StreptInCor tem potencial de proteção e é segura (Guerino et al, 2011a).

No presente trabalho avaliamos a capacidade opsonizante e neutralizante de anticorpos induzidos pela imunização com StreptInCor em modelo murino, a capacidade de cobertura da vacina em estudo frente a diferentes cepas de *S. pyogenes*, bem como a ausência de reações humorais autoimunes dirigidas ao tecido cardíaco valvular humano.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar em modelo experimental a capacidade de cobertura vacinal do imunógeno StreptInCor, para prevenção de infecção por *S. pyogenes* e suas sequelas.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade dos anticorpos anti-StreptInCor em promover a opsonização/neutralização das cepas de *S. pyogenes* mais prevalentes;
- Verificar a prevalência das cepas de *S. pyogenes* em amostras biológicas colhidas no Hospital das Clínicas – HCFMUSP;
- Verificar a segurança da vacina, através da ausência de anticorpos que apresentem reatividade cruzada com proteínas do tecido valvular humano, para controle de autoimunidade.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

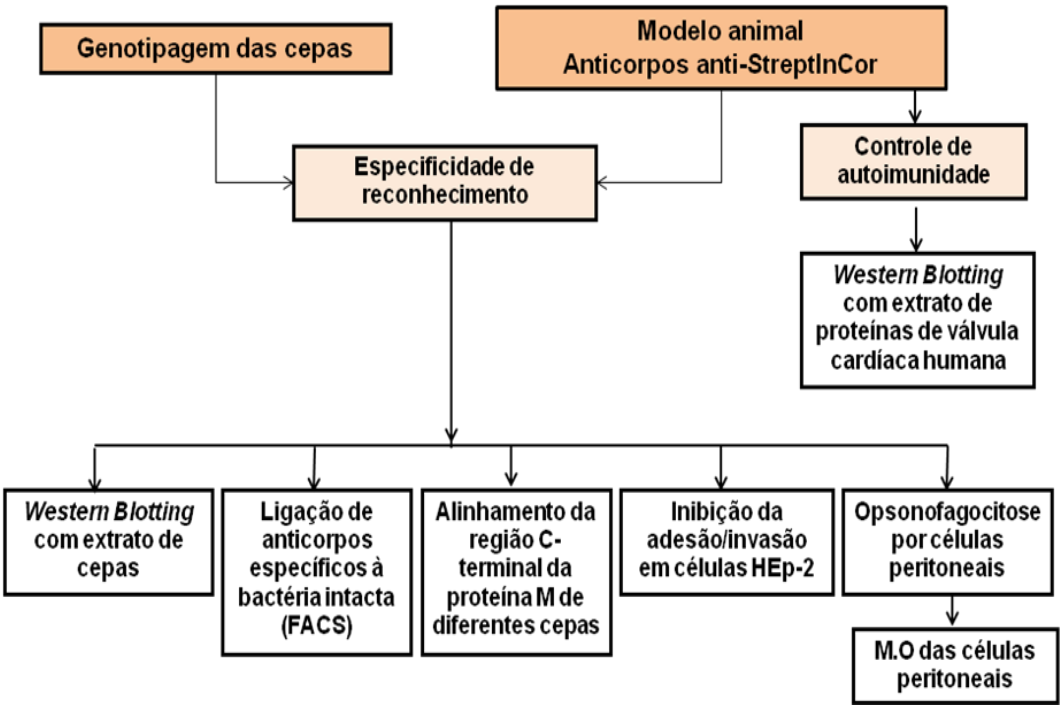

Figura 1- Delineamento experimental: etapas e fluxo da realização do trabalho

3.2 StreptInCor: epitopo vacinal

O epitopo vacinal é constituído de 55 resíduos de aminoácidos: KGLRRDLDASREAKKQLEAEQQKLEEQNKISEASRKGLRRDLDASREAKKQVEKA, como anteriormente descrito (Guilherme et al, 2006a) (patentes INPI 0501290/0604997-4, PCT-BR07/000184).

3.3 Camundongos e Imunização

No presente trabalho foram utilizados soros de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c (MacDowell, 1927; Bailey, 1978) e não-isogênicos da linhagem Swiss (Clara Lynch, 1991) previamente imunizados com duas doses contendo 10 ou 100µg de StreptInCor, além de soros controles destas mesmas linhagens, previamente injetados com adjuvante Alum, ou proteína M1 estreptocócica recombinante, bem como soro pré-imune de camundongo. Após 14 dias da última injeção, as amostras de soros foram obtidas por punção retro-orbital sob anestesia e depois estocadas a -20°C.

Os camundongos tinham de 6 a 8 semanas de idade, foram manipulados pelo Dr. Edilberto Postól e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia do InCor, situado no Instituto de Medicina Tropical da FMUSP.

Para todos os ensaios deste trabalho foram utilizadas amostras de soros dos animais que apresentaram títulos de anticorpos específicos acima de 1:1200 detectados através da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

3.4 Cepas de *S. pyogenes*

Amostras de diferentes cepas de *S. pyogenes* provenientes de espécimes clínicos isolados de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas - FMUSP da cidade de São Paulo entre 2004 e 2008 foram cultivados, isolados e identificados por métodos microbiológicos e bioquímicos no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Em seguida, foram armazenadas a -80°C no banco de cepas de *S. pyogenes* do referido laboratório. A partir deste banco, avaliamos 176 amostras.

3.4.1 Cultivo das cepas

Amostras de *S. pyogenes* foram semeadas em placas de ágar sangue de carneiro 5% (Newprov, Brasil) e incubadas em estufa a 37ºC por 24h. Na sequência, 5 colônias escolhidas aleatoriamente foram inoculadas em 5 ml de caldo Todd-Hewitt (Himedia, India) suplementado com 2% de neopeptona e incubadas a 37ºC sob agitação de 500 g por 10 às 16h.

Com o objetivo de manter as cepas no Laboratório de Imunologia do InCor para estudos posteriores, 200µL do cultivo de *S. pyogenes* em caldo Todd-Hewitt (Himedia, India) foram colocados em tubos para congelamento (Nunc, Dinamarca) contendo 400µL de sangue de carneiro (Vetec, Brasil). As alíquotas assim obtidas foram armazenadas em freezer –80°C.

3.4.2 Lisado da cultura de *S. pyogenes* para isolamento de DNA

Lisados bacterianos de 176 amostras foram obtidos segundo o protocolo fornecido pelo CDC – Divisão de doenças bacterianas e micóticas no banco de dados de sequenciamento do gene *emm* do *Streptococcus pyogenes*, disponível em http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm.

Brevemente, o lisado bacteriano foi preparado a partir de 3 ml da cultura de *S. pyogenes* em caldo Todd-Hewitt (Himedia, India) centrifugada a 2000 g por 5 minutos, a 5ºC, para a obtenção do *pellet* de bactérias. Na sequência, o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 300µl de NaCl 0,85% e incubado a 70ºC por 15 minutos. Transcorrido esse tempo, foi centrifugado a 2000 g por 2 minutos, sendo ressuspenso em 50µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM pH-8,0) acrescido de 2µl de hialuronidase (45000 U/ml – Invitrogen, EUA), 10µl de mutanolisina (3000 U/ml – Invitrogen, EUA) e incubado a 37ºC por 30 minutos, seguido de nova incubação a 100ºC por 10 minutos. Em seguida, o lisado foi tratado com fenol/clorofórmio v/v de amostra, centrifugado para a eliminação de contaminantes protéicos e armazenado a –20ºC até o uso.

3.4.3 Tipificação do gene *emm*

3.4.3.1 PCR gene específica

A reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação do gene *emm*, que codifica para a proteína M estreptocócica, foi realizada utilizando-se iniciadores específicos já descritos na literatura (Tabela 1).

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação do gene *emm* descritos por Whatmore e Kehoe, 1994

Iniciador	Sequência de nucleotídeos
All M Fw	CCGGATCCTATTCGCTTAGAAGAAAATTAA
All M Rev	CAACTGCAGAAGTTCTTCAGCTTGTTTT

Fonte: Whatmore e Kehoe, 1994.

O protocolo de amplificação e as temperaturas de ciclagem estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2- Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR para a amplificação do gene *emm*

Reagentes e Concentração	Massa/Concentração	Quantidade
Tampão (Invitrogen, EUA)	10X	5µL
dNTP (Invitrogen, EUA)	12 mM	5µL
$MgCl_2$ (Invitrogen, EUA)	50 mM	3µL
Primer allM Foward	10 pmol	1,5µL
Primer allM Reverse	10 pmol	1,5µL
Taq polimerase (Invitrogen, EUA)	0,5 U	0,5µL
Amostra (lisado)		5µL
Água Milli-Q q.s.p.		27,5µL

Tabela 3- Parâmetros empregados no ciclo da PCR para amplificação do gene *emm*

Temperatura	Tempo (minutos)	Quantidade de Ciclos
94°C	5	1
94°C	1	35
50°C		
72°C		
72°C	7	2
4°C	∞	

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose (Invitrogen, EUA) 1% e a quantidade de DNA amplificado foi estimada através da comparação de intensidade das bandas com o marcador *Low Mass* (Invitrogen, EUA).

3.4.3.2 Sequenciamento do gene *emm*

Após a análise das amostras em gel de agarose (Invitrogen, EUA) foi feito o PCR pré-sequenciamento, utilizando-se o teste comercial "*BigDye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit*" (Applied Biosystems, EUA), conforme detalhado nas Tabelas 4 e 5. Este kit utiliza terminação da cadeia de DNA por incorporação de dideoxinucleotídeos.

Tabela 4- Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR pré-sequenciamento (Big Dye®)

Reagentes e Concentração	Massa/Concentração	Quantidade
Tampão (Invitrogen, EUA)	10X	1µL
Big Dye (Applied Biosystems, EUA)		1,5µL
Primer allM Foward	10 pmol	0,5µL
DNA molde		2,5µL
Água Milli-Q q.s.p.		4,5µL

Tabela 5- Parâmetros do ciclo da PCR pré-sequenciamento (Big Dye®)

Temperatura	Tempo	Quantidade de Ciclos
95°C	90 minutos	1
95°C	18 segundos	35
50°C	12 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	∞	

A precipitação das amostras amplificadas para a reação de sequenciamento foi realizada com 180µL de isopropanol 75% e incubados a TA por 20 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 25 minutos e lavadas com 250µL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 2000 g por 5 minutos, as amostras foram secas a 95ºC por 2 minutos e ressuspensas em 2µL de azul de formamida (Applied, Biosystems, EUA).

As amostras foram sequenciadas utilizando-se o equipamento ABI 377 (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram analisadas de acordo com o protocolo proposto pelo CDC disponível em http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/assigning.htm.

A análise utilizada foi baseada no encontro do sítio de clivagem do peptídeo sinal da proteína, utilizando-se 30 resíduos do peptídeo sinal e 150 resíduos da proteína madura para a comparação com as sequências listadas no EMBL/GenBank utilizando o programa "FASTA" e o banco de dados do site do CDC, considerando-se uma identidade de sequência acima de 98%.

Para a análise comparativa entre a frequência dos diferentes genes, foi utilizado o teste estatístico Qui-quadrado (significância $p<0,05$) no programa Prisma 5.0.

3.5 Alinhamento de sequências da região C-terminal da proteína M de diferentes cepas

Sequências de aminoácidos da região C-terminal da proteína M das cepas M1, M5, M6, M12 e M87 foram alinhadas com a sequência de resíduos de aminoácidos do StreptInCor através do programa online BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências estão disponíveis em: Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed),

Swissprot (http://www.uniprot.org/help/uniprotkb) e CDC (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm). O alinhamento foi colorido através do programa Jalview 2.7 com a coloração Zapo, que indica os grupamentos químicos dos aminoácidos.

3.6 Avaliação do Reconhecimento de diferentes cepas: *Western Blotting*

3.6.1 Extração de proteínas

Foram produzidos extratos de proteínas das cepas M1 e M5 para os ensaios de *Western blotting*. O rendimento final das proteínas de cada extrato, bem como seus pesos moleculares, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Rendimento final das proteínas totais do extrato de cepas de *S. pyogenes*

Cepa	Rendimento final (µg)	Peso Molecular (kDa)
M1	125	54,3
M5	105	55,1

Pesos moleculares disponíveis em: http://www.uniprot.org/help/uniprotkb

As bactérias foram cultivadas como descrito no item 3.4.1. Depois, 15 ml da cultura foram lavados em tampão PBS gelado diluído a 1/10, por 3 vezes.

As bactérias foram então rompidas por sonicação (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific) em tampão de lise, em gelo, por 5 ciclos de 15 segundos com 1 minuto de intervalo entre os ciclos. Para cada 10^6 células/ml na DO_{600}:0,4, foram

adicionados 400µL de tampão de lise (uréia 7M; tiouréia 2M; CHAPS 4%; tris-HCl 1M; pH 8,5). As amostras foram centrifugadas por 60 minutos, a 4ºC, a 2200 g. O sobrenadante foi coletado, o precipitado foi novamente sonicado em tampão de lise e centrifugado. Os extratos obtidos foram mantidos em congelamento a -20 ºC *overnight*.

3.6.2 Precipitação em TCA/Acetona

As proteínas do extrato foram precipitadas em uma solução de TCA/Acetona seguindo a proporção de 1 parte de extrato de proteínas para 8 partes de acetona gelada e 1 parte de TCA a 100%.

A amostra foi homogeneizada vigorosamente com o auxílio de vórtex após a adição de cada reagente e precipitada a -20°C durante 1 hora.

Para cada 15 ml de cultura primária, houve um rendimento de 350µg de proteínas.

3.6.3 Concentração em coluna de filtro

Os extratos de proteínas das diferentes cepas de *S. pyogenes* foram concentrados em colunas de filtro (Millipore, EUA) através de centrifugação. Foram colocados 250µL do extrato na coluna, e esta foi submetida a uma centrifugação a 500 g por 5 minutos.

3.6.4 Quantificação

O ensaio de Bradford foi utilizado para a quantificação das proteínas presentes no extrato das diferentes cepas de *S. pyogenes* (BRADFORD, 1976). O reagente

utilizado na quantificação foi o da Bio-Rad (EUA), no qual a albumina bovina sérica é utilizada para construir a curva padrão de concentração. Todas as amostras foram feitas em triplicata e a absorbância analisada através de leitor de placas (Bio-Rad, EUA), no comprimento de onda de 595 nanômetros.

3.6.5 Avaliação do rendimento final

O rendimento final das extrações foi avaliado em relação ao volume inicial da cultura utilizado para a produção do extrato, levando-se em consideração a quantidade de bactérias (aproximadamente 10^6 células/ml na DO_{600}:0,4).

3.6.6 *Western Blotting*

Para que houvesse a separação das proteínas do extrato foi feita uma eletroforese em mini gel de SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis) 12% com uma força elétrica específica para cada fase de separação das proteínas (na fase de empilhamento: 120V/15 minutos, fase resolutiva: 160V/90 minutos).

Foram carregadas 30 µg de proteínas do extrato por poço em tampão de amostra (tris-HCl 250mM; SDS 10% m/v; glicerol 50% v/v; beta-mercaptoetanol 5% m/v; azul de bromofenol 0,1% m/v;) 5X concentrado, portanto, para cada 4 volumes de amostra, foi usado 1 volume de tampão. A mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex (Daigger G-560, Scientific Industries, Bohemia, NY, EUA) e brevemente centrifugada (MiniSpin, Eppendorf, Alemanha). Foi, em seguida, levada à ebulição por 2 minutos. Todo o volume de cada tubo foi aplicado em uma canaleta de gel.

A corrida foi feita em equipamento Mini-VE (GE) a temperatura ambiente, em tampão Laemmli. O gel foi corado com Coomassie coloidal G-250 por 1 dia e foi posteriormente descorado com água Milli-Q, sob agitação e sucessivas trocas de água, até que a coloração de fundo estivesse límpida o suficiente para visualização das bandas.

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose carregada positivamente (Hybond ECL - GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foi feita em um sistema semi-seco, com um tampão de transferência (Tris base 25mM; glicina 0,2M; SDS 0,1% m/v; metanol 20% v/v), a partir do gel não-corado.

Gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose e papéis de filtro foram embebidos em tampão de transferência e então montados no sistema de transferência na seguinte ordem (pólo negativo para o pólo positivo): 3 folhas de papel, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose e mais 3 folhas de papel. As bolhas de ar foram retiradas, o sistema de transferência fechado e colocado no transferidor semi-seco (TE 77, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com tampão de transferência. As condições de transferência foram: 0,8 mA/cm², por 2 horas.

Transcorrido esse tempo, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau em 10% de ácido acético por alguns minutos, para verificar a presença de proteínas.

Após lavagem com água para descorar a membrana, esta foi incubada *overnight* com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS 1/10-0,1% Tween para que houvesse o bloqueio de reações inespecíficas. Transcorrido esse tempo, a solução foi descartada e a membrana foi incubada com pool contendo soro de 6 camundongos da linhagem BALB/c imunizados com 10µg de StreptInCor ou controles, diluídos a 1:100 em tampão de bloqueio por 2h a 4ºC, sob agitação.

As membranas foram lavadas por 3 vezes com TBS-Tween 0,1% e então foi feita a incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina) por 2 horas.

A revelação da reação foi realizada com os reagentes NBT-BCIP e os resultados foram visualizados a olho nu. A comparação da altura das bandas com o marcador de peso molecular Full- range Rainbow (GE Healthcare, EUA) foi feita através do software ImageQuant TL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

3.6.7 Escaneamento e densitometria do *Western Blotting*

As imagens das membranas e dos géis foram obtidas utilizando-se um foto-digitalizador ImageScanner (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) através do software de escaneamento LabScan (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) que é um software para aquisição de imagens de géis de eletroforese que possibilita o ajuste de cores e contrastes da imagem.

A densitometria das bandas foi realizada no software ImageQuant TL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), que permite uma análise semi-quantitativa do *Western blotting*.

3.7 Citometria de Fluxo: Ensaio de Ligação

Isolados de *S. pyogenes* foram cultivados como descrito no item 3.4.1., depois foram centrifugados a 400 g por 2-4 minutos. Após duas lavagens com PBS diluído a 1/10, as bactérias foram incubadas com os soros de camundongos BALB/c hiperimunes ou controles diluídos 1/100 por 30 minutos. Posteriormente, foram incubados com o

anticorpo específico para IgG murino com ficoeritrina (PE-1/50) por 30 minutos. As amostras foram lavadas novamente e fixadas em 200µL de paraformaldeído 1%. Posteriormente foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACS Canto II e a fluorescência foi analizada no software FlowJo versão 3.4.1. Este protocolo foi adaptado para *S. pyogenes* a partir do protocolo anteriormente descrito para *S. pneumoniae* (Goulart et al, 2011). A análise estatística da contagem final das bactérias fluorescentes em cada amostra foi feita através do teste Mann-Whitney.

3.8 Ensaio de inibição de adesão/invasão

3.8.1 Linhagem celular HEp-2

3.8.1.1 Descongelamento e cultivo

Para cultivar células da linhagem HEp-2, alíquotas de células previamente armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em meio DMEM (Sigma, EUA) 10% de SFB (Gibco Invitrogen, EUA) em uma diluição de 1/10 (1ml de célula congelada + 9 ml meio de cultura). As células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 12,5 ml de DMEM 10% SFB em uma garrafa média (Biogen, Brasil).

As células foram cultivadas neste meio por 5 a 7 dias, a temperatura de 37°C, com 5% de CO_2.

3.8.1.2 Plaqueamento

Atingida a confluência, as células aderidas ao fundo da garrafa foram lavadas com DMEM sem SFB uma vez. Após a lavagem, foram adicionados 3,5 a 5ml de tripsina e a garrafa foi incubada em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC, por aproximadamente 5 minutos. Na sequência foi adicionado meio DMEM 10% SFB até completar o volume de 10 ml. As células foram contadas e plaqueadas na proporção de 1,5 x10^5 células/poço/ml e as placas foram incubadas por 48h a 37ºC-5% de CO_2.

3.8.2 Inóculo de *S. pyogenes*

Em um Erlenmeyer pequeno contendo 20ml de meio Todd Hewitt (Himedia – India) foi inoculado aproximadamente 1,5ml do pré-inóculo de *S. pyogenes* até que fosse atingida a DO_{600}: 0,1 (medida por espectrofotometria). A cultura de bactérias foi crescida a 37°C sob agitação até que fosse atingida a DO_{600}: 0,4, o que corresponde a aproximadamente 10^6células/ml.

3.8.3 Incubação do *S. pyogenes* com soro hiperimune

Atingida a DO_{600}: 0,4 (fase exponencial de crescimento bacteriano), foram centrifugados 4 ml da cultura bacteriana a 2000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de bactérias foi lavado por 1X com DMEM sem suplemento. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi diluído até atingir a $DO_{600:}$ 0,1.

Foram plaqueados 200µl do pool contendo soro de 6 camundongos da linhagem Swiss hiperimunes ou controles, diluídos 1/100 em cada poço da placa de 24 poços e foi adicionado ao soro 30µl/poço da suspensão de bactérias preparada anteriormente. Na seqüência, a bactéria foi incubada com o soro a 37ºC por 1h. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 Ensaio de inibição de adesão/invasão das cepas previamente incubadas com soro hiperimune às células HEp-2

Células HEp-2 previamente plaqueadas por 48 horas foram lavadas por 3 vezes com meio DMEM sem SFB. Na seqüência, a bactéria incubada previamente com o soro foi adicionada às placas, permanecendo em incubação por 90 minutos a 37ºC.

Transcorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas por uma vez com 1ml/poço de meio DMEM sem suplementação. Na seqüência, foram adicionados 200µL/poço de tripsina e as placas foram colocadas na estufa por 5 minutos para desprender as células aderidas à base. Na sequência, foram adicionados 800µL/poço de água para promover a lise celular.

Após a incubação e lise celular, as células lisadas foram diluídas a 1/25 (960µl de salina+40µl do lisado) e 50µL desta diluição foram plaqueados com o auxílio de esferas de vidro em placas de ágar sangue (Newprov, Brasil) previamente secas no fluxo laminar. Na sequência, as esferas foram retiradas e as placas incubadas na estufa a 37ºC por 24h.

A porcentagem de inibição da adesão/invasão foi calculada com base no número de unidades formadoras de colônias (UFC) observadas na diluição de 10^6 e comparadas com as placas controles testadas com soro de camundongo pré-imune (ex. nº de UFC das placas testadas com soro pré-imune é 100%, e o número de UFC contadas nas placas das amostras hiperimunes foi 20%, portanto ocorreu uma inibição de 80%).

3.10 Opsonofagocitose por células peritoneais

Este protocolo foi adaptado para *S. pyogenes* a partir do protocolo anteriormente descrito para *S. pneumoniae* (Goulart et al, 2011).

3.10.1 Células peritoneais

Para estimular o recrutamento das células do sistema imunológico para o peritôneo dos camundongos BALB/c, foi injetado intraperitonealmente 10µg de Concanavalina A (*Canavalia ensiformis- ConA, Sigma)*. Os animais foram sacrificados 48h depois da injeção e a cavidade peritoneal foi lavada com 5ml de PBS gelado. A concentração das células peritoneais foi ajustada para 4×10^6/ml em tampão de opsonização HBSS (Invitrogen, EUA).

3.10.2 Incubação com soro anti-StreptInCor e plaqueamento

Cepas de *S. pyogenes* foram cultivadas em meio Todd-Hewitt até que fosse atingida a concentração de 10^8UFC/ml (densidade óptica de 0.4–0.5) e centrifugadas a 2000 g por 3 minutos. Os *pellets* foram lavados por uma vez com PBS, ressuspensos em tampão de opsonização HBSS (Invitrogen, EUA) e alíquotas contendo 2.5×10^6UFC foram incubadas com soro de camundongos BALB/c ou Swiss anti – StreptInCor inativado por calor em uma diluição final de 1:100 a 37 C por 30 minutos. Soro de camundongo injetado com solução salina foi utilizado como controle. Após outra lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com 10% de soro de camundongo fonte de complemento, diluído em tampão de opsonização, a 37 C por 30 minutos. As amostras foram então lavadas uma vez com PBS e incubadas com 4×10^5 células peritoneais diluídas em tampão de opsonização, a 37°C por 30 minutos, sob agitação. A reação foi parada através da incubação dos tubos de ensaio em gelo por 1 minuto. Foram feitas dez diluições seriadas das amostras, e alíquotas de 10µl de cada diluição foram plaqueadas em ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C, sob uma concentração de 5% de CO_2, e as UFC de *S. pyogenes* foram recuperadas após cultura de 18h. As lâminas foram preparadas por cytospin, coradas com Instant-Prov (Newprov, Brasil) e posteriormente analisadas em microscópio óptico Axion Vision Zeiss Imager A1 e fotografadas através do software Axion Vision. Na aquisição foram utilizadas lentes oculares no aumento de 10X e as objetivas variaram entre 20X e 40X.

A análise estatística da contagem final das colônias de cada grupo foi feita através do teste Kruskal-Wallis.

4 *WESTERN BLOTTING* PARA AVALIAÇÃO DE AUTOIMUNIDADE

4.1 Biópsias de válvulas cardíacas humanas

Segundo as normas do Comitê de Ética do InCor – CAPPesq, todo material humano recebido pelo Laboratório possui Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi utilizado tecido de válvula mitral obtido de 4 doadores de órgãos, encaminhados para transplante no Complexo HC-FMUSP, cujo coração não pôde ser transplantado, em conformidade com as Normas da Comissão de Ética em Pesquisa (0053/07). As válvulas mitrais humanas foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia do InCor-FMUSP imediatamente após sua excisão no ato cirúrgico em tubos de poliestireno com tampa de rosca (Cryo.S, Greiner Bio-One, Cambridge, Inglaterra), dentro de recipiente com gelo, e, no Laboratório, foram imediatamente armazenadas em galão de nitrogênio líquido, identificadas e catalogadas em arquivo eletrônico.

4.2 Extração das proteínas de válvula Mitral

O tecido valvular foi retirado do congelamento e mantido em banho de gelo. Imediatamente antes da extração de proteínas, foi lavado em tampão PBS gelado. Uma

alíquota de tampão de lise (uréia 7M; tiouréia 2M; CHAPS 4% m/v; tris-HCl 1M; pH 8,5) foi retirada do congelador (-20ºC) e mantida também em banho de gelo para descongelar gradualmente e nunca ultrapassar 20ºC, evitando-se a carbamilação da uréia.

Para o rompimento do tecido, o material foi transferido para um tubo do tipo Falcon de 50 ml, mantido em gelo, sobre o qual foi adicionado tampão de lise na proporção de 400µl para cada 100mg de tecido. O rompimento foi realizado em Polytron PowerGen 1000™ (Fischer Scientific, Suwannee, GA, USA), por ciclos de 30 segundos, a 10000 g e 4 ºC, até que não houvessem fragmentos visíveis. O extrato foi mantido em congelamento a -20 ºC overnight. Em seguida, o extrato foi sonicado (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific) por 5 ciclos de 15 segundos, em banho de gelo, com 1 minuto de intervalo entre os ciclos. O material foi, então, mantido em banho de gelo por mais 30 minutos e centrifugado por 60 minutos a 4000 g a 4 ºC para eliminar qualquer material insolúvel.

4.3 Eliminação de interferentes

Os interferentes foram eliminados por diálise e posterior concentração por centrifugação a vácuo. O extrato obtido foi mantido em congelador a -20ºC por cerca de 12 horas antes de ser colocado em membrana de diálise Spectra-Por (Spectra Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), com poro de 3,5 kDa. As membranas foram seladas em ambos os lados e submersas em béquer com água Milli-Q, em câmara fria (a 4 ºC) por 48 horas e troca de água a cada 30 minutos nas 2 primeiras horas e depois a cada 2 ou 3 horas.

Os extratos protéicos assim obtidos foram submetidos à centrifugação a vácuo em equipamento SpeedVac SC 100, até sua completa secagem. As proteínas foram ressuspendidas em 400µl de tampão de lise.

4.4 Quantificação das proteínas

Os extratos obtidos foram quantificados pelo método modificado de Bradford (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), com padrão de albumina.

4.5 *Immunoblotting*

A eletroforese do extrato de proteínas extraídas de válvula cardíaca humana foi realizada em mini gel de poliacrilamida 8%. Cada raia da cuba foi carregada com 30µg de proteínas, em tampão de amostra após fervura por 1 minuto. A transferência para membrana de nitrocelulose foi realizada em cuba semi-seca, em tampão de transferência por 2 horas, a 0,8 mA/cm2. As membranas foram coradas com corante Vermelho de Ponceau, para visualização da transferência. Depois as membranas foram descoradas e colocadas em tampão de bloqueio (TBS-Tween 0,5% de leite em pó desnatado) por 1 dia, sob agitação constante a 4 ºC. Depois, foram realizadas 3 lavagens com TBS-Tween à temperatura ambiente sob constante agitação. Os soros dos camundongos dos grupos de estudo foram diluídos a 1:100 com TBS-Tween e incubados com as respectivas membranas por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. O soro foi retirado e a membrana lavada por mais 3 vezes de 10 minutos cada com solução de

bloqueio sob agitação constante a temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Fosfatase alcalina foi diluído a 1:25.000 com solução de bloqueio antes de ser colocado sobre as membranas; o tempo de incubação foi de 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Ao final desse período o anticorpo secundário foi retirado e as membranas foram lavadas novamente como anteriormente descrito. A revelação foi feita com NBC/BCIP em tempos de exposição de 30 segundos.

5 APROVAÇÕES DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0646/07**, intitulado: **"IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE STREPTOCOCCUS PYOGENES ISOLADOS NA CIDADE DE SÃO PAULO ATRAVÉS DE GENOTIPAGEM"** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profª Drª Luiza Guilherme Guglielmi**

Pesquisador (a) Executante: **Samar Freschi de Barros**

CAPPesq, 31 de Outubro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br -sol

Mem. CC. 0262

São Paulo, 05 de julho de 2007.

À

Profa. Dra. Luiza Guilherme Guglielmi

A Comissão Científica do Instituto do Coração, **APROVOU** na sessão 518/07/10 de 05.07.2007, o Protocolo de Pesquisa SDC 2946/07/021 **"Identificação das Cepas de *Streptococcus pyogenes* Isolados na Cidade de São Paulo Através de Genotipagem".**

Aguardar aprovação da CAPPesq e do financiamento para iniciar o estudo. Solicitamos nos enviar cópia da aprovação dos recursos solicitados à agência de fomento, assim que possível. Caso o financiamento não seja aprovado ou não tenhamos recebido a carta de aprovação após o prazo de 120 dias, o pesquisador será convocado pela Comissão Científica para justificar-se".

Atenciosamente,

Selma C. Quaia Fortunato

Secretária da Comissão Científica

InCor - HC.FMUSP

Obs.: Lembramos que de acordo com a Res. 196 de 10/10/96, incisos IX.1 e 2, a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais e cabe ao pesquisador apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa.

INSTITUTO DO CORAÇÃO
(Fundação Zerbini)
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 19 de abril de 2010.

À Comissão Científica do INCOR

Encaminho o projeto intitulado **Análise "*in vitro*" da capacidade de cobertura da vacina em desenvolvimento contra o *S. pyogenes*** para avaliação da comissão científica.

Informo que este trabalho está incluso no projeto **"Identificação das cepas de *Streptococcus pyogenes* isolados na cidade de São Paulo através de genotipagem"**, já aprovado por esta comissão e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP- CAPPesq, sob números: (**SDC 2946/07/021, CAPPesq 0646/07,** respectivamente), vigente até 02/2012.

Informo ainda, que este projeto está sob a responsabilidade da Profa. Dra. Luiza Guilherme Guglielmi, que é a orientadora do projeto de Mestrado agora encaminhado e que será executado por mim no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração.

Envio em anexo as cópias das aprovações e o relatório parcial de atividades do projeto.

Atenciosamente,

Karine Marafigo De Amicis
Aluna de Mestrado

De acordo:

Dra. Luiza Guilherme Guglielmi
Orientadora de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Cerqueira César - CEP: 05403-900 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: (11)3069-5000 - www.incor.usp.br

20/04/10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 27 de fevereiro de 2008.

Ilmo. Sr.
Dr. Edilberto Postól

Prezado Senhor:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMTSP) avaliou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto de pesquisa classificado sob número 002/08, intitulado "**Avaliação experimental da vacina contra o estreptococo beta hemolítico do grupo A de Lancefield (*Streptococcus pyogenes*)**", a ser executado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Coordenador do CEP-IMTSP

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16 de Março de 2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **081/11** intitulado: **"ANÁLISE "IN VITRO" DA CAPACIDADE DE COBERTURA DA VACINA EM DESENVOLVIMENTO CONTRA O S. PYOGENES."**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Luiza Guilherme Guglielmi
Pesquisador (a) Executante: Karine Marafigo De Amicis

CEP-FMUSP, 16 de Março de 2011.

Prof. Dr. Daniel Romero Muñoz
Vice-coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

...SÃO CIEN
RECEBIDO

6 RESULTADOS

6.1 Genotipagem das cepas de *S. pyogenes*

6.1.1 Frequência dos tipos M

O gene *emm* foi sequenciado em 176 amostras coletadas. Em seguida, as sequências obtidas foram analisadas de acordo com o protocolo proposto pelo CDC e os diferentes tipos M confirmados através da comparação das sequências obtidas com as depositadas no banco de dados do CDC.

Das 176 amostras de estreptococo do grupo A de Lancefield sequenciadas, identificamos 42 tipos M diferentes, como segue: M1, M3, M6, M8, M12, M22, M33, M41, M49, M53, M57, M58, M59, M63, M64, M66, M68, M71, M73, M75, M76, M77, M78, M80, M85, M86, M87, M88, M89, M92, M94, M95, M101, M102, M108, M115, M122, M44/61, st 204, st 2904, st 2940-2 e CL3765. Dentre estas, os tipos M com frequência superior ou igual a 3% foram: M1 (20%), M87 (8%), M12 (7%) e M22, M77 (6%), M6 (4%), M89, st 2904 e M75, (3%) Estes nove tipos M mais freqüentes somam 61% do total dos isolados (Figura 2).

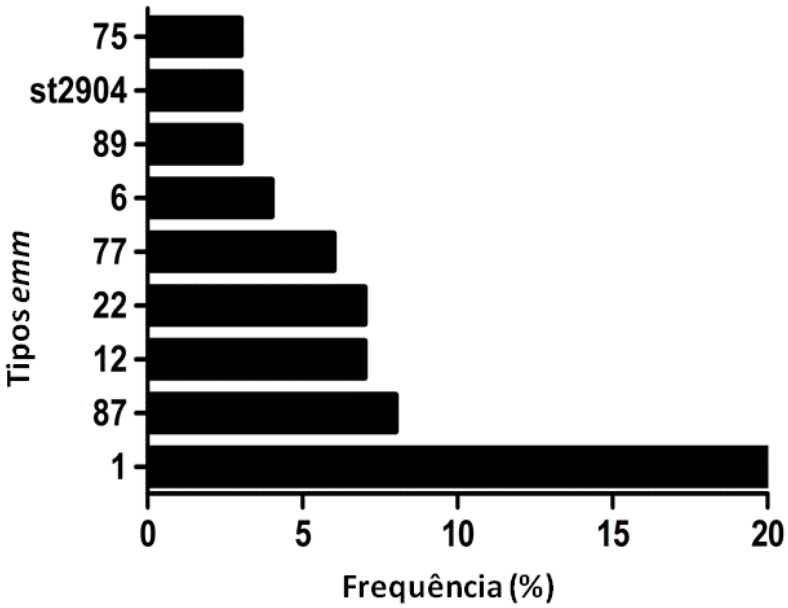

Figura 2- Frequência dos tipos *emm* encontrados. Frequências: M1 (20%), M87 (8%), M12 (7%) e M22, M77 (6%), M6 (4%), M89, st 2904 e M75, (3%)

6.1.2 Anticorpos anti-StreptInCor reconheceram as cepas M1 e M5

Através dos ensaios de *Western blotting* utilizando extrato de proteínas da bactéri, foi possível observar que os anticorpos anti-StreptInCor produzidos a partir da imunização de camundongos BALB/c, são capazes de reconhecer tanto a proteína M5 (55 kDa) quanto a proteína M1 (54 kDa) em cada extrato total (Figura 3).

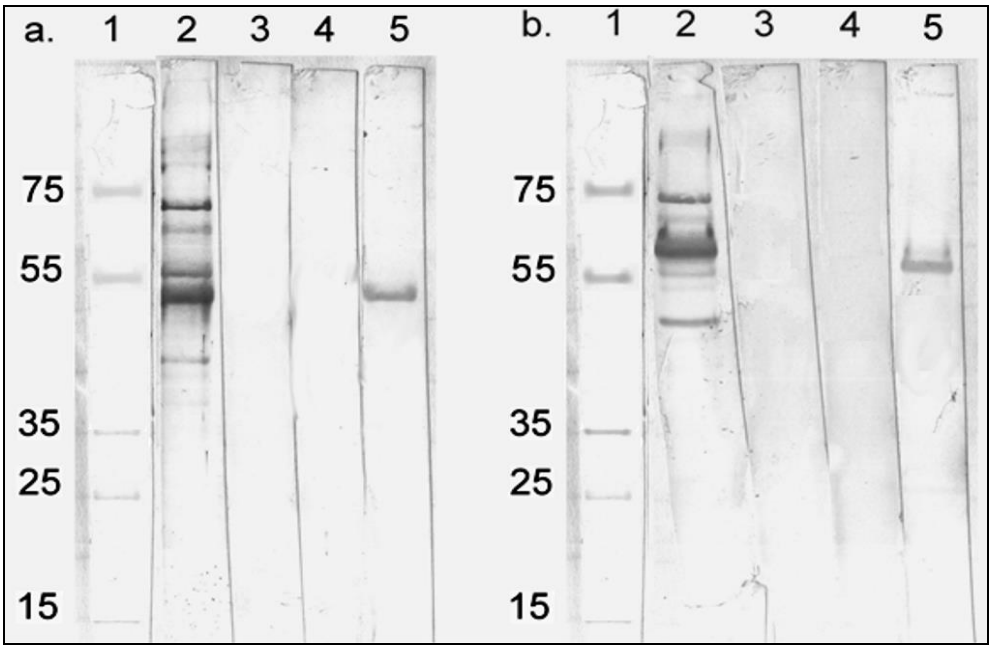

Figura 3- Reatividade do pool de soros de camundongos BALB/c imunizados com StreptInCor e controles contra extrato da proteína M1 e M5. Western Blotting de **(a).** extrato da proteína M1, **(b).** extrato da proteína M5; **Canaletas: 1.** Marcador de peso molecular, **2.** Pool de soro Anti-M1, **3.** Pool de soro pré-imune, **4.** Pool de soro controle, **5.** Pool de soro Anti-StreptInCor. Pesos moleculares disponíveis em http://www.uniprot.org/help/uniprotkb. O pool foi constituído por soro de 6 animais por grupo.

6.2 Alinhamento das sequências da região C- terminal da proteína M de diferentes cepas de *S. pyogenes*

Sequências de aminoácidos da região C-terminal da proteína M de 5 cepas de *S. pyogenes* (M1, M5, M6, M12 e M87) foram coletadas em bases de dados e foi realizado o alinhamento destas sequências com a sequência de aminoácidos do StreptInCor para análise da identidade molecular das sequências (Figura 4). As sequências da região C-terminal das cepas M22 e M77 não estão disponíveis em bancos de dados.

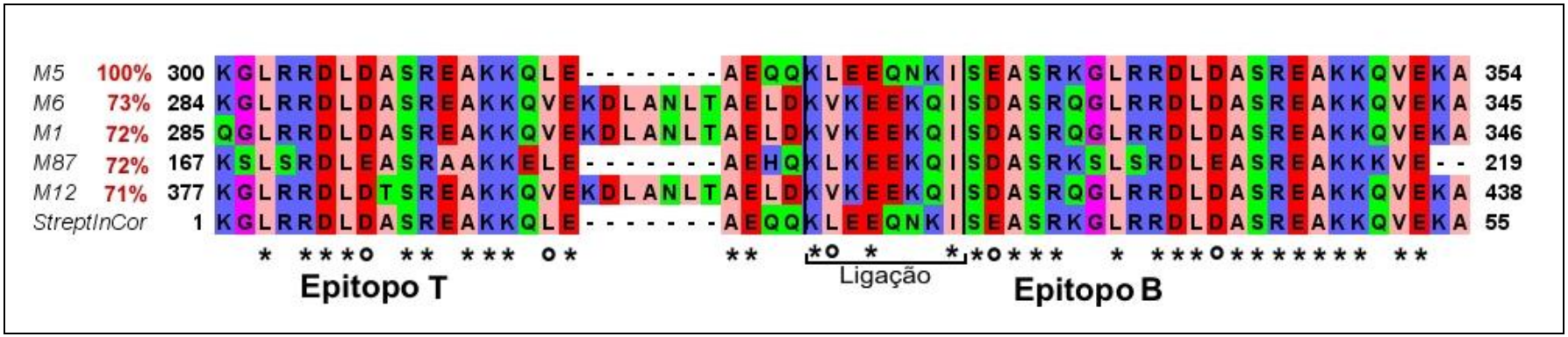

Figura 4- Alinhamento de aminoácidos da região C-terminal da proteína M de diferentes cepas de *S. pyogenes* com a sequência de aminoácidos do StreptInCor. Sequências de aminoácidos da região C-terminal das cepas M1, M5, M6, M12, M22 e M87 alinhadas com a sequência de aminoácidos de StreptInCor. Porcentagem de identidade está representada em vermelho. (*): resíduos de aminoácidos idênticos, (-----): ausência de resíduos. (^{o}): aminoácidos diferentes pertencentes ao mesmo grupamento químico; Azul e Vermelho - Aminoácidos com cadeias laterais carregados eletricamente. Verde - Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregados. Rosa – glicinas. Salmão - Aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. As cores diferentes em uma mesma coluna indicam um aminoácido de um grupo químico diferente dos encontrados naquela posição nas sequências comparadas. ([___])indica a região das sequências de aminoácidos da proteína M que formam a ligação entre o epitopo T e B naturalmente

É possível observar que as sequências de aminoácidos da região C-terminal das proteínas M das cepas estudadas apresentaram em média 72% de identidade com a sequência de aminoácidos do StreptInCor.

As cepas M1, M6 e M12 apresentam um bloco adicional de 7 aminoácidos em suas sequências quando comparadas com a sequência de aminoácidos do StreptInCor, e a M87 apresenta dois aminoácidos a menos do que a sequência do StreptInCor.

6.3 Diferentes cepas de *S. pyogenes* foram neutralizadas pelo anticorpo anti-StreptInCor

Anticorpos anti-StreptInCor de camundongos Swiss foram capazes de se ligar às proteínas M das cepas M1, M5, M12, M22, e M87, com uma Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) 2 ou 3 vezes maior em comparação com os controles, através do reconhecimento estrutural na proteína M intacta, na superfície da bactéria (Figura 5).

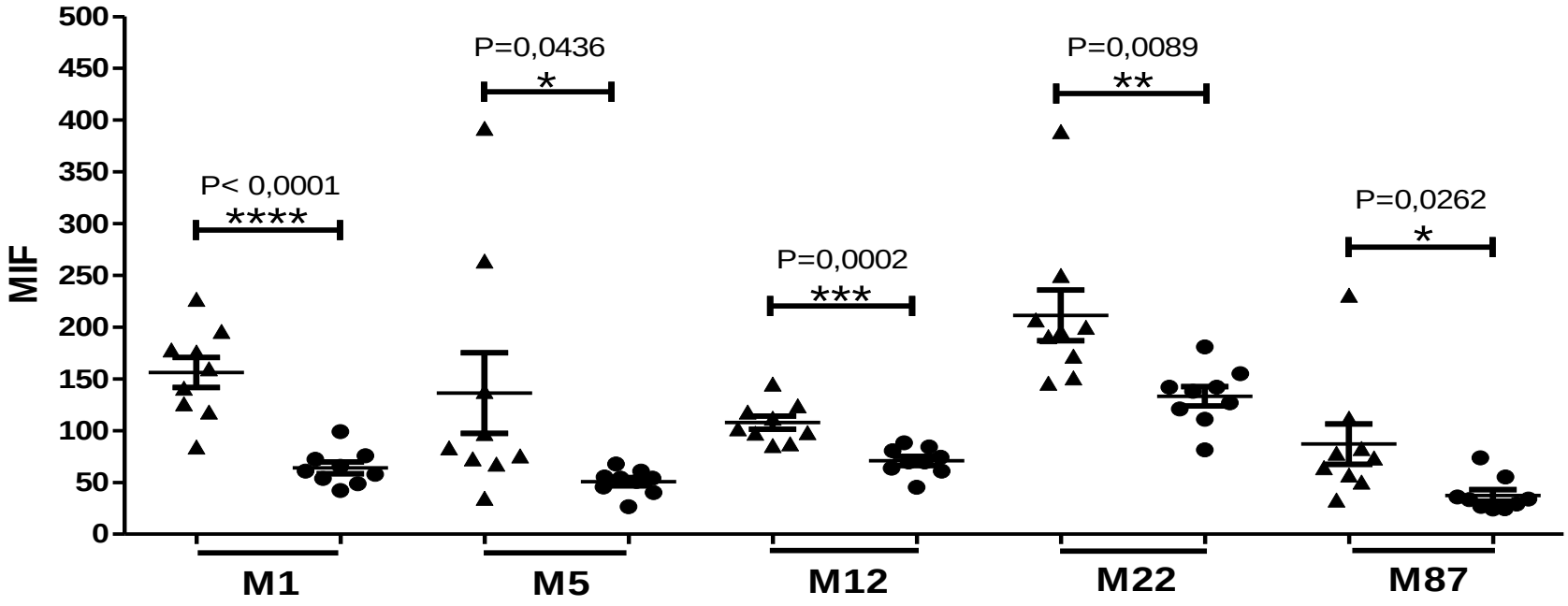

Figura 5- Neutralização de diferentes cepas por anticorpos anti-StreptInCor. A análise da neutralização das cepas M1, M5, M12, M22 e M87 realizada por Citometria de fluxo; A Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) obtida para cada amostra de soro está representada como um ponto de dados. Soro anti-StreptInCor (▲); Soro controle (•); Valores de: **P*< 0,5; ***P*< 0,1; ****P*< 0,01; *****P*< 0,001 (Mann-Whitney). Os dados são representativos de três experimentos independentes com soro de 9 camundongos da linhagem BALB/c por grupo

6.4 Ensaio de inibição da adesão/invasão da cepa M1 à células da linhagem HEp-2

Com o objetivo de testar a capacidade neutralizante e opsonizante dos anticorpos produzidos através da imunização de camundongos da linhagem Swiss com a vacina candidata StreptInCor, foram realizados ensaios de inibição *"in vitro"* da adesão/invasão da cepa M1 às células da linhagem HEp-2.

Pool de soros de animais imunizados com 100µg de StreptInCor foi capaz de inibir a adesão/invasão da cepa M1 de *S. pyogenes* em até 70%, enquanto que pool de soros de animais imunizados com 10µg de StreptInCor mostrou a capacidade de inibição da adesão/invasão de 45% (Figura 6).

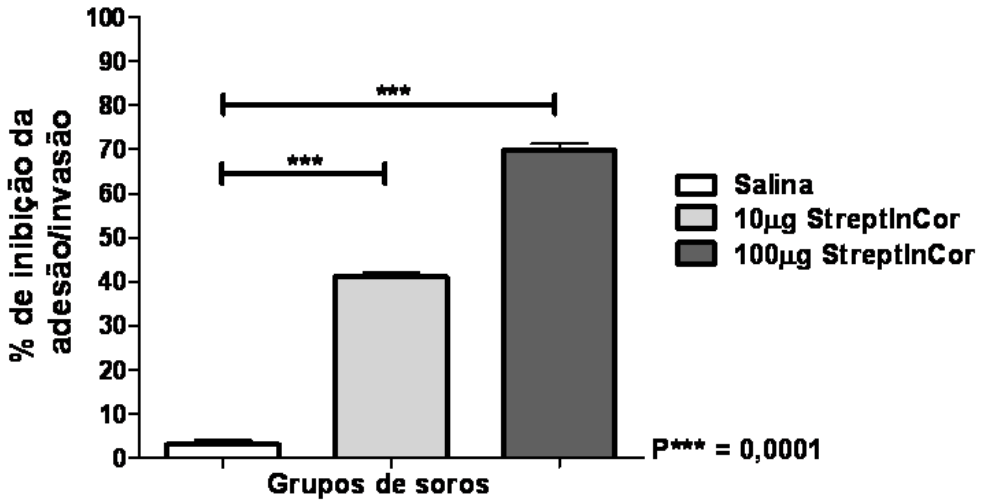

Figura 6- Percentual de inibição da capacidade de adesão/invasão da cepa M1 às células HEp-2. Soro de camundongos Swiss imunizados com 10µg ou 100µg de StreptInCor. Controle positivo: adesão/invasão máxima 1802 UFC

Ao comparar a capacidade de inibição da adesão/invasão dos anticorpos produzidos pela imunização com StreptInCor em duas linhagens diferentes de camundongo, *inbred* (BALB/c) e *outbred* (Swiss), observou-se que o número de bactérias que invadem ou aderem às células é praticamente o mesmo, com porcentagem de inibição da adesão/invasão de 45% (Figura 7).

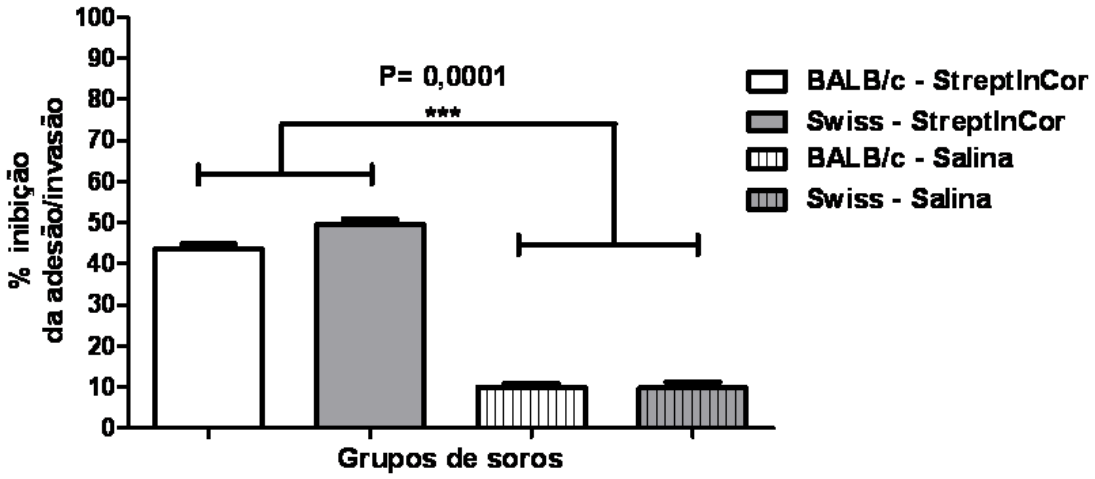

Figura 7- Percentual de inibição da adesão/invasão da cepa M1 às células HEp-2. Contagem de UFC após imunização com 10 µg de StreptInCor comparados ao controle em duas linhagens diferentes de camundongos (BALB/c e Swiss). Controle positivo: adesão/invasão máxima 830 UFC

6.5 Ensaio de opsonofagocitose com células peritoneais

Anticorpos anti-StreptInCor de camundongos BALB/c e Swiss foram capazes de opsonizar e induzir a morte por fagocitose das cepas M1, M5, M12, M22 e M87 na presença de uma fonte de sistema complemento (Figuras 8 e 9). A cepa M1 foi morta por opsonização seguida de fagocitose por células peritoneais 20 minutos após o ensaio de opsonofagocitose como observado através de microscopia óptica (Figura 10).

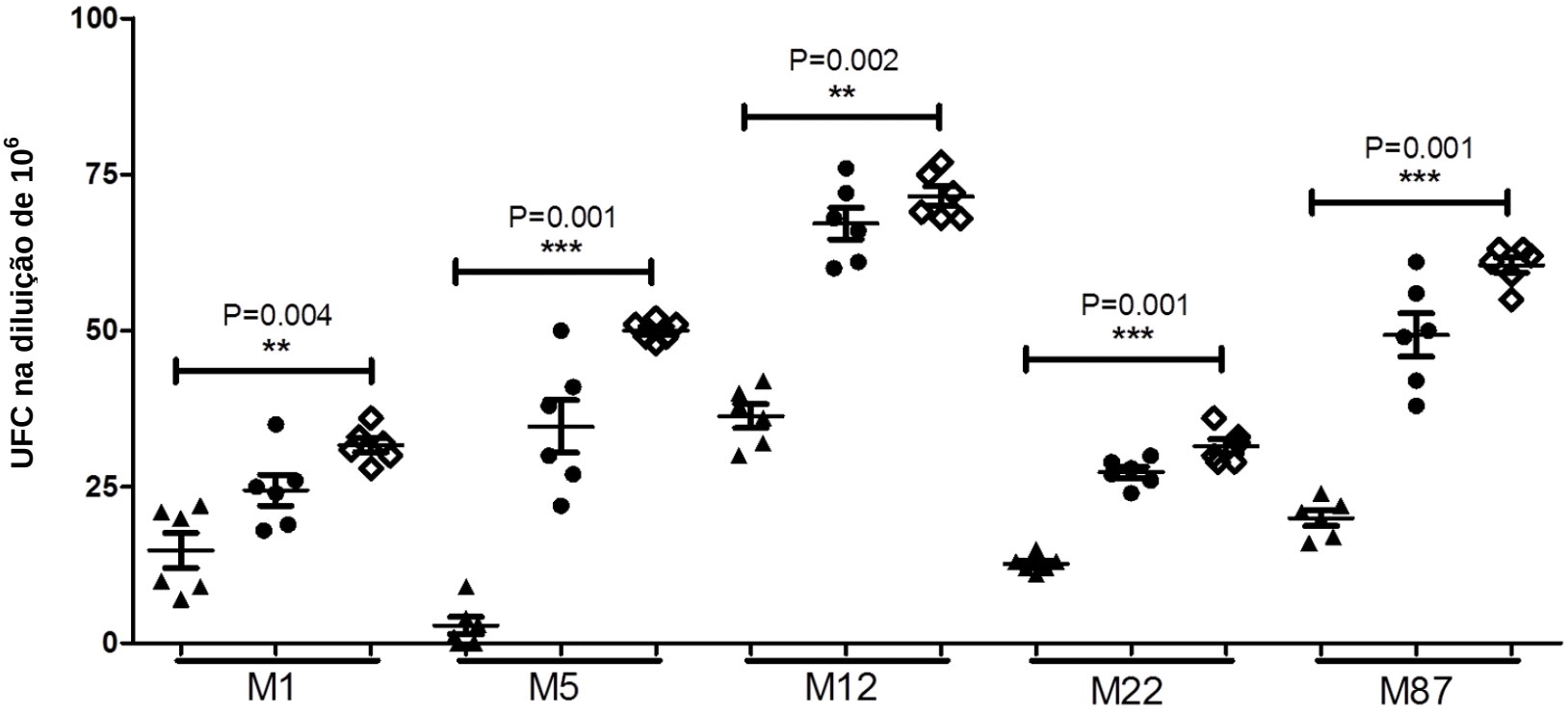

Figura 8- Opsonofagocitose de *S. pyogenes* com células de camundongos da linhagem BALB/c. Opsonofagocitose das cepas M1, M5, M12, M22 e M87 por anticorpos anti-StreptInCor de camundongos BALB/c (n=6) imunizados com 10µg de StreptInCor ou controles. Cada ponto representa a contagem das UFC realizada na diluição de 10^6. Soro anti-StreptInCor (▲); Soro controle (•); Soro pré-imune (◊); Valores de: *P< 0,5; **P< 0,1; ***P< 0,01; ****P< 0,001 (Kruskal-Wallis)

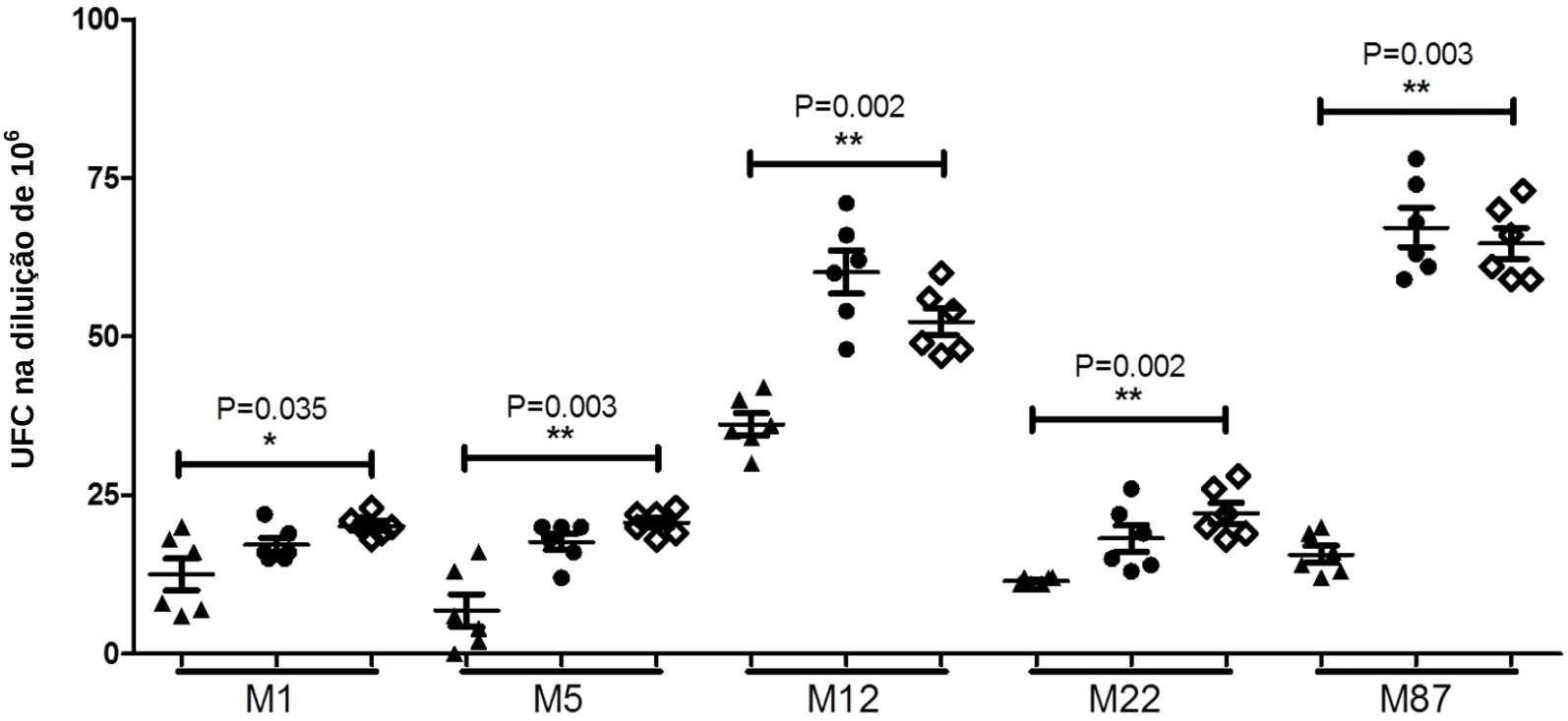

Figura 9- Opsonofagocitose de *S. pyogenes* com células de camundongos da linhagem Swiss. Opsonofagocitose das cepas M1, M5, M12, M22 e M87 por anticorpos anti-StreptInCor de camundongos Swiss (n=6) imunizados com 10µg de StreptInCor ou controles. Soro anti-StreptInCor (▲); Soro controle (•);Soro pré-imune (◊); Valores de: **P*< 0,5; ***P*< 0,1; ****P*< 0,01; *****P*< 0,001 (Kruskal-Wallis)

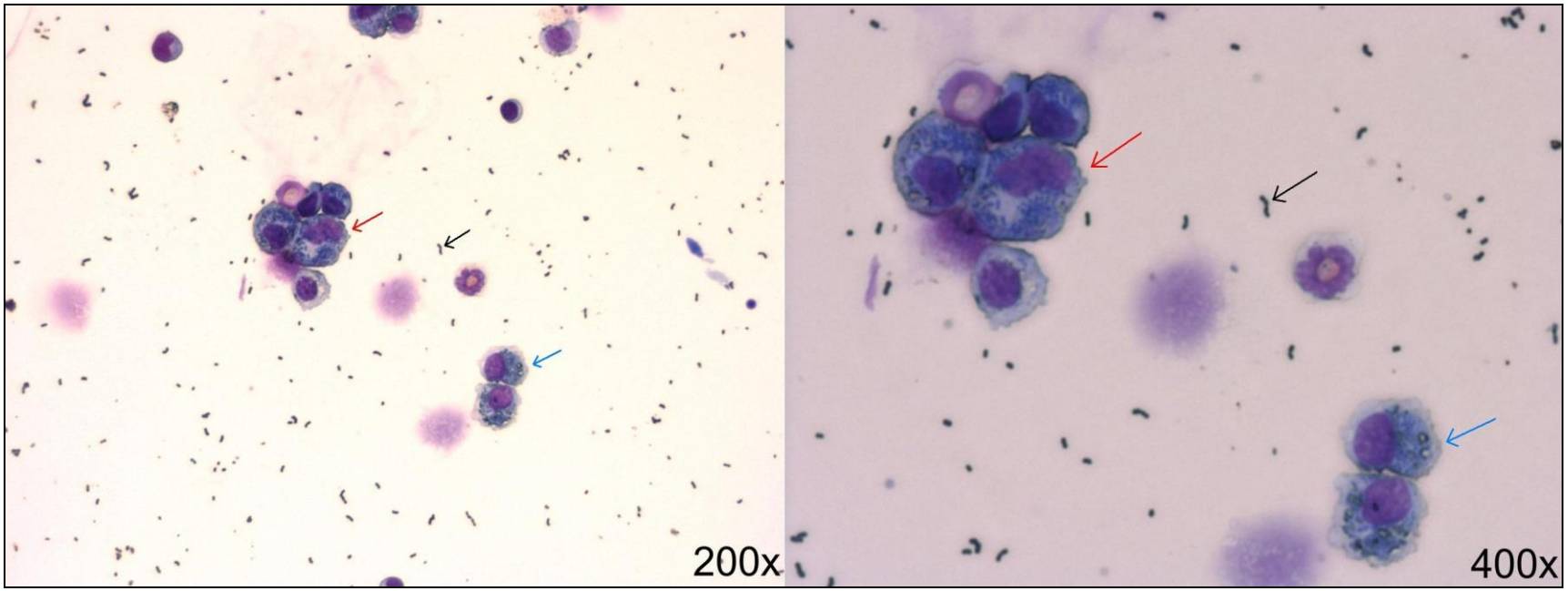

Figura 10- Opsonofagocitose da cepa M1. Microscopia óptica da fagocitose e morte da cepa M1 dentro de células peritoneias de camundongos Swiss, coradas com Instant-Prov. Aquisição: oculares 10X, objetivas variaram de 20 a 40X. Flecha vermelha: *S. pyogenes* fagocitado dentro da APC; Flecha preta: *S. pyogenes*; Flecha azul: *S. pyogenes* dentro do vacúolo digestivo da APC

6.6 Avaliação de segurança do StreptInCor por *Western Blotting*

Para avaliar a ausência de anticorpos autorreativos, foi realizado *Western blotting* com soro de camundongos BALB/c e Swiss imunizados com StreptInCor e extrato de proteínas de válvula cardíaca mitral humana (Figura 11). Não foi verificada a presença de anticorpos autorreativos contra proteínas do extrato de válvula cardíaca humana.

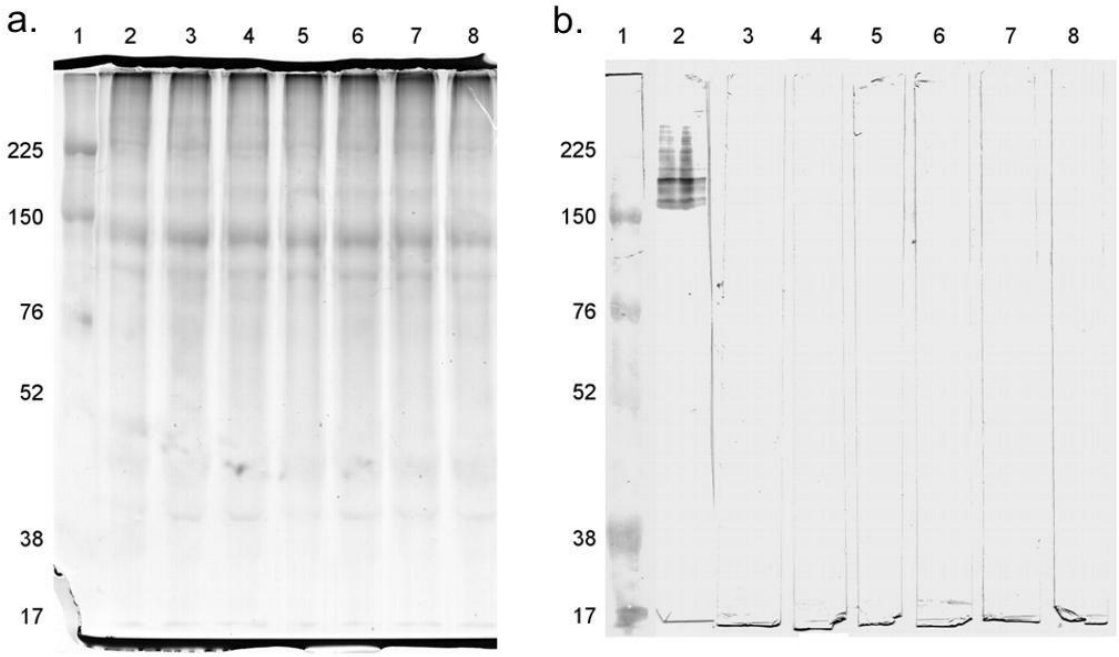

Figura 11- Avaliação de segurança. Através do *Western blotting*, não foram observados anticorpos autorreativos contra o extrato de proteínas de válvula mitral humana. **a.** Gel SDS-Page pós-transferência. **b.** Membrana de *Western blotting*. **Canaletas: 1. M**arcador de peso molecular; **2.** Anti-miosina humana; **3.** Controle isotípico; **4.** Pool de soro pré-imune; **5.** Pool de soros de camundongos BALB/c controles; **6.** Pool de soros anti-StreptInCor de camundongos BALB/c; **7.** Pool de soros de camundongos Swiss controles; **8.** Pool de soros anti-StreptInCor de camundongos Swiss. O pool foi constituído de soro de 6 camundongos por grupo

7 DISCUSSÃO

A prevalência das cepas de *S. pyogenes* no Brasil é pouco conhecida, devido a dificuldades de obtenção de amostras oriundas de infecções estreptocócicas. O levantamento dos tipos M prevalentes em cada região é importante para o conhecimento das cepas patogênicas e seu controle. Além disto, é uma ferramenta importante para avaliar a capacidade de cobertura da vacina contra *S. pyogenes* em desenvolvimento.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da distribuição das principais cepas de *S. pyogenes* envolvidas em infecções em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo, que concentra pacientes oriundos de diversas localidades de São Paulo.

Neste estudo, 176 amostras de *S. pyogenes* foram genotipadas possibilitando a identificação de 43 tipos M diferentes. O tipo M mais freqüente entre as amostras genotipadas foi o M1, representando 20% entre as cepas identificadas. Em seguida aparecem o M87 (8%), M22, M12 (7%), M77 (6%), M6 (4%), M89, M75 e st 2904 (3%).

O sorotipo M1 é o mais frequentemente encontrado no mundo todo, corroborando com os dados de identificação de cepas do presente trabalho (Steer et al, 2009c).

Dois outros estudos descreveram a distribuição dos tipos *emm* no Brasil. Um deles foi um estudo prospectivo realizado em crianças de Brasília e da Bélgica simultaneamente. Em Brasília, foram identificados 48 tipos M diferentes a partir de 128 amostras (Smeesters et al, 2006). Comparando-se com o presente estudo pode-se observar diferenças em relação aos tipos M encontrados em São Paulo. No estudo

realizado em Brasília, as cepas M53, M22, M49, M58, M83 e M8 foram as mais prevalentes (Smeesters et al, 2006), diferente de São Paulo, onde a prevalência de M1, M87, M22, M12, M77, M6 foi observada. Essas diferenças nos tipos M prevalentes em cada região sugerem a existência de diferenças nos padrões genéticos, socioeconômicos e ambientais presentes nas diferentes populações estudadas, contribuindo para diferenças de susceptibilidade à infecção por cepas diversas.

Em comparação com os dados encontrados em Brasília, nossos resultados também diferem em relação ao sítio de infecção do qual as amostras foram isoladas. Amostras isoladas em São Paulo, oriundas de infecções respiratórias e de pele correspondem a 36% e em Brasília correspondem a 61,5%. Fatores como clima, tratamento com antibióticos, situação sócio-econômica, imunidade populacional e susceptibilidade genética da população provavelmente estão envolvidos na frequência das diferentes cepas e devem ser considerados em estudos comparativos entre diferentes populações.

Interessantemente, os resultados obtidos em um estudo na Bélgica (Smeesters et al, 2006) mostram uma maior semelhança com os resultados obtidos neste estudo, tendo como as cepas mais frequentes a M6, M1, M12, M89, M4 e M3.

Na cidade de Salvador, foram genotipada 238 amostras isoladas de crianças que moravam em comunidades carentes e foi feita a comparação com os tipos *emm* isolados de crianças que moravam em comunidades ricas (Tartof et al, 2010). Dentre 144 amostras de GAS isoladas de crianças que moravam em comunidades carentes foram identificados 53 diferentes tipos *emm;* enquanto que nas 94 amostras isoladas das crianças vindas das comunidades ricas foram identificados 36 tipos *emm* diferentes. Estes resultados sugerem que a diversidade de cepas de *S. pyogenes* pode ser influenciada por fatores locais como melhores condições de saneamento básico e tratamento médico. Nas duas populações, as cepas mais prevalentes foram a M12,

M87, M49.3, e 27G.0 (Tartof et al, 2010), apresentando similaridades com os achados deste estudo.

Também em conformidade com os resultados deste trabalho, as cepas M1, M87 e M12 são descritas como as mais frequentes em estudos realizados em diversos países. Em um estudo realizado na China com amostras de *S. pyogenes* isoladas de infecções invasivas e não-invasivas, em dois períodos distintos, encontrou-se uma freqüência elevada de cepas M1 e M12 em ambos os períodos estudados (Ma et al, 2009). Em um estudo realizado na Romênia nos anos de 2003 e 2004, o mesmo foi observado (Luca-Harari et al, 2008a). Em Barcelona, na Espanha, foi realizado um estudo com amostras isoladas no período de 1999 a 2003, e a cepa M1 foi a cepa mais frequentemente identificada nestas amostras, seguida de M3, M4 e M12 (Rivera et al, 2006). Na Alemanha (Imöhl et al, 2010) e na Dinamarca (Meisal et al, 2010) a cepa M1 também está entre as mais frequentes, além de M12 e M89.

Em um estudo realizado na Noruega foram observados 37 tipos M diferentes a partir de 292 amostras analisadas e os tipos M mais prevalentes foram M1, M28, M3, M12 e M89 (Meisal et al, 2010). Já na Alemanha, em 586 amostras analisadas foram identificados 49 tipos M diferentes, sendo os mais freqüentes M28, M1, M82, M12, M4, M3, M 87, M89 e M6 (Imöhl et al, 2010).

Em relação à oligoclonalidade das cepas, nossos resultados contrastam com os encontrados em Bruxelas onde se vê uma distribuição oligoclonal com apenas 20 tipos M diferentes, típica de países ocidentais ricos (Shulman et al, 2004). Em São Paulo e Brasília a distribuição dos tipos M mostra policlonalidade, com 42 e 48 tipos M diferentes identificados respectivamente. A policlonalidade ocorre em lugares onde há migração massiva recente, como a observada em Brasília, provavelmente decorrente do rápido desenvolvimento em 50 anos (Smeesters et al, 2006).

A diferença no desenvolvimento regional existente entre São Paulo, Brasília e Salvador pode explicar diferenças nos tipos *emm* encontrados entre as regiões, ou seja, as pressões seletivas existentes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento assim como diferenças regionais no mesmo país favorecem a evolução genética dos tipos *emm*.

Baseado nos estudos de freqüência e prevalência das cepas de *S. pyogenes* no mundo e no banco de dados de sequências de tipos *emm* do CDC pode se concluir que a diversidade de cepas é muito significativa e uma vacina candidata contra *S. pyogenes* deve garantir proteção contra o maior número de cepas possível.

A vacina contra *S. pyogenes* em desenvolvimento em nosso grupo (StreptInCor) foi desenhada a partir de sequências de aminoácidos da região conservada (C-terminal) da proteína M e os testes preliminares indicam que a vacina pode ter uma ampla cobertura entre as cepas mais freqüentes no mundo por reconhecê-las cruzadamente.

Através dos ensaios de *Western blotting* observamos que a imunização com StreptInCor foi capaz de promover a produção de anticorpos dirigidos à epitopos da região C-terminal da proteína M5 capazes de reconhecer regiões conservadas cruzadamente na proteína M1, resultado favorável à capacidade de proteção do StreptInCor.

Além de ter ampla cobertura frente às cepas, uma vacina deve promover a produção de anticorpos neutralizantes/opsonizantes, que são importantes linhas de defesa contra microorganismos extracelulares. Através dos ensaios de inibição da adesão/invasão, opsonofagocitose e ligação pode-se verificar a produção de anticorpos neutralizantes/opsonizantes específicos ao StreptInCor, indicando grande potencial de proteção.

O *S. pyogenes* tem a capacidade de aderir às células da orofaringe, para colonizá-las e invadi-las, através de proteínas e adesinas presentes tanto na sua superfície como nas células humanas (Bisno et al, 2003). A proteína M é um

importante superantígeno da bactéria e possui a capacidade de atuar como adesina (Smeesters et al, 2010). Visto que o StreptInCor é um peptídeo sintético desenhado a partir da região conservada da proteína M5, os anticorpos formados em resposta à vacina deverão ser capazes de se ligar cruzadamente a esta mesma região conservada das proteínas M de diferentes cepas de *S. pyogenes*, neutralizando a sua função de adesina ou promovendo a opsonização das bactérias para facilitar a fagocitose pelas células apresentadoras de antígenos.

Ao compararmos a capacidade de inibição da adesão/invasão dos anticorpos produzidos pela imunização em camundongos BALB/c com 10 ou 100µg de StreptInCor observamos que o efeito de neutralização ou opsonização capaz de inibir a adesão/invasão da cepa M1 é dose-dependente. Bactérias tratadas com soro dos animais imunizados com 100µg de StreptInCor apresentaram 70% de inibição da adesão/invasão enquanto que em bactérias tratadas com soro proveniente da imunização com 10µg de StreptInCor esta inibição foi de 45%, ambas em relação ao tratamento das bactérias com soro pré-imune.

Como demonstrado em trabalhos anteriores, soros de indivíduos saudáveis que já tiveram contato com *S. pyogenes* e são reativos ao StreptInCor (Guilherme et al, 2006b), bem como de animais imunizados com o agente vacinal, foram capazes de inibir *"in vitro"* a adesão e a invasão bacteriana das cepas M1, M6, M44/61, M87, M71 e M22 (Guilherme et al, 2009).

Os resultados da identificação das várias cepas avaliadas neste trabalho, total de 43, possibilitará a avaliação da amplitude da cobertura vacinal pelo StreptInCor. A cepa M1, uma das mais frequentes e altamente virulenta, também foi utilizada em ensaios de desafio em camundongos pós-vacinação com o StreptInCor. Camundongos imunizados com StreptInCor apresentaram taxa de sobrevida de 100% em comparação com animais

controles que apresentaram taxa de sobrevida de 40% em até 21 dias (Postol et al, 2013). Em ensaios com camundongos transgênicos para as moléculas HLA de classe II, pôde ser observada alta produção de anticorpos específicos e ausência de reações autoimunes em vários órgãos analisados em até 1 ano (Guerino et al, 2011b).

A capacidade de reconhecimento cruzado do sítio de ligação dos anticorpos opsonizantes/neutralizantes na proteína M em sua estrutura tridimensional na superfície da bactéria foi analisada através de ensaios de Citometria de fluxo. Foram realizados ensaios de ligação de anticorpos do soro dos animais imunizados à bactéria intacta e observamos que os anticorpos produzidos pela imunização com StreptInCor reconheceram sítios de ligação na superfície da bactéria tanto na proteína M5 quanto nas proteínas M1, M12, M22 e M87 em sua estrutura tridimensional. O reconhecimento destas proteínas reforça a capacidade do StreptInCor de neutralizar as cepas mais prevalentes, uma vez que reconheceu cruzadamente as regiões conservadas de proteínas diferentes daquela na qual o seu desenho foi baseado.

Foram realizados ensaios de opsonofagocitose com células peritoneais de camundongos BALB/c e Swiss e cepas de *S. pyogenes* para que pudesse ser analisada a capacidade de interação entre os anticorpos produzidos pela vacinação com StreptInCor e as células fagocíticas do sistema imunológico, levando à opsonização e morte da bactéria.

Nos ensaios com células peritoneais de camundongos da linhagem BALB/C e Swiss pode-se observar que houve opsonização e morte das cepas que foram tratadas com soro de camundongos imunizados com 10µg de StreptInCor quando comparamos com cepas tratadas com soro de camundongos controles, indicando a presença de anticorpos opsonizantes específicos e efetivos.

Com o intuito de verificar se as cepas de *S. pyogenes* realmente foram mortas por opsonização seguida de fagocitose, lâminas de microscopia foram montadas após o

ensaio de opsonofagocitose e pode-se observar que as bactérias da cepa M1 foram digeridas e mortas dentro das APC , 20 minutos após o ensaio de opsonofagocitose com células e camundongos da linhagem Swiss.

Sequências de aminoácidos da região C-terminal da proteína M de diferentes cepas de *S. pyogenes* foram coletadas em bases de dados (GeneBank, Swissprot, NCBI) e foi realizado o alinhamento destas sequências com a sequência de aminoácidos do StreptInCor. Preliminarmente, é possível observar que as sequências de aminoácidos da região C-terminal das proteínas M das cepas M1, M5, M12, M22 e M87 apresentaram em média 72% de identidade com a sequência de aminoácidos do StreptInCor. As cepas M1, M6 e M12 apresentam um bloco adicional de 7 aminoácidos em suas sequências quando comparadas com a sequência de aminoácidos do StreptInCor, e a M87 apresenta dois aminoácidos a menos do que a sequência do StreptInCor. Essas diferenças parecem não interferir no reconhecimento destes antígenos, como observado nos ensaio de opsonofagocitose.

A predição de ligação da sequência de aminoácidos da região C-terminal das cepas M1, M5, M6, M12 e M87 com diferentes moléculas HLA de classe II mostrou que as possibilidades de reconhecimento/processamento das proteínas M e ligação aos bolsões de diferentes moléculas HLA de classe II estão de acordo com estudos anteriores realizados com o StreptInCor (Guilherme et al, 2011a).

O desenvolvimento de uma vacina contra o *S. pyogenes* que combata diferentes cepas e que não cause autoimunidade trará inúmeros benefícios para a saúde humana, prevenindo não só infecções estreptocócicas, como seqüelas destas estreptococcias (Glomerulonefrite e Febre reumática), de uma forma mais efetiva e duradoura do que o tratamento tradicional atualmente utilizado.

Foram muitas as abordagens de vacinas baseadas no uso da proteína M como indutora de imunidade protetora testadas ao longo dos anos, porém os resultados não foram satisfatórios (Steer et al, 2009a).

Os modelos de vacinas de proteína recombinante com base na porção N-terminal (cepa-específica) da proteína M que continham os sorotipos mais prevalentes nos EUA, entraram em ensaios clínicos de fase I e II (McNeil et al, 2005). Os ensaios clínicos foram interrompidos e uma nova abordagem, agora com base em 30 sorotipos está sendo testada (Dale et al, 2011). Diante disso, é possível observar que o número de cepas que deverão ser utilizadas para a construção de vacinas baseadas na região N-terminal da proteína M poderá variar, já que existem diferentes cepas de *S. pyogenes* mais prevalentes em cada região. Além dos modelos de vacinas mencionados, estão em desenvolvimento 8 (oito) modelos de vacinas antiestreptocócicas que são baseados em outros antígenos que não a proteína M (Pandey et al, 2012; Steer et al, 2009b).

O StreptInCor é um modelo de vacina desenvolvido à partir da região C-terminal da proteína M e tem se mostrado seguro até o momento, não desencadeando reações autoimunes. Os resultados dos estudos *"in vitro"* com o StreptInCor se mostram promissores porque induzem imunidade segura contra diferentes cepas de *S. pyogenes*. Além disso, o peptídeo vacinal pode ser reconhecido por diversas moléculas HLA de classe II, o que o torna um candidato a vacina para uso universal (Guilherme et al, 2011a).

Os anticorpos opsonizantes/neutralizantes anti-StreptInCor não induziram reações cruzadas contra extrato de proteínas de válvula cardíaca humana indicando a ausência de anticorpos de reação cruzada. Estes resultados corroboram com resultados do estudo com camundongos transgênicos para as moléculas HLA de classe II imunizados com StreptInCor, já que também não foram observadas lesões autoimunes em diversos órgãos analisados (Guerino et al, 2011a).

8 CONCLUSÃO

A capacidade do StreptInCor em induzir uma potente resposta humoral em modelo animal, com produção de anticorpos neutralizantes/opsonizantes contra diversas cepas do *S. pyogenes*, bem como a segurança da vacina candidata foi fortemente evidenciada pelos resultados obtidos neste trabalho.

Pontualmente, foi possível concluir:

- A imunização com StreptInCor produz anticorpos neutralizantes/opsonizantes, com alta capacidade de induzir a fagocitose de diversas cepas de *S. pyogenes*, indicando que a vacina candidata tem potencial de prevenir infecções estreptocócicas e suas sequelas;

- A capacidade de cobertura do StreptInCor é em média de 71% frente às diversas cepas de *S. pyogenes*, indicada pela homologia entre as sequências de aminoácidos das proteínas M de cada cepa;

- StreptInCor não induz a produção de anticorpos que tenham capacidade de reagir cruzadamente com proteínas derivadas do tecido cardíaco, indicando que o imunógeno é seguro e não tem o potencial de induzir autoimunidade.

9 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2011) *Imunologia Celular e Molecular*, 7ª edn. Rio de Janeiro: Elsevier.

Barbosa PJB, Müller RE, Latado AL, Achutti AC, Ramos AIO, Weksler C ea. (2009) Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da Sociedade Brasileira de Pediatria e da Sociedade Brasileira de Reumatologia., Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

Barnett LA, Fujinami RS (1992) Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. *FASEB J* **6:** 840-844

Beachey EH, Courtney HS (1987) Bacterial adherence: the attachment of group A streptococci to mucosal surfaces. *Rev Infect Dis* **9 Suppl 5:** S475-481

Berggård K, Johnsson E, Morfeldt E, Persson J, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G (2001) Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in Streptococcus pyogenes. *Mol Microbiol* **42:** 539-551

Bessen DE, Carapetis JR, Beall B, Katz R, Hibble M, Currie BJ, Collingridge T, Izzo MW, Scaramuzzino DA, Sriprakash KS (2000) Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat. *J Infect Dis* **182:** 1109-1116

Bibel DJ, Miller SJ, Brown BE, Pandey BB, Elias PM, Shinefield HR, Aly R (1989) Antimicrobial activity of stratum corneum lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice. *J Invest Dermatol* **92:** 632-638

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

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

Carlsson F, Berggård K, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G (2003) Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in Streptococcus pyogenes M protein. *J Exp Med* **198:** 1057-1068

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

Cunningham MW (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13:** 470-511

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

Cunningham MW, Hall NK, Krisher KK, Spanier AM (1986) A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *J Immunol* **136:** 293-298

Dajani AS, Taubert KA, Takahashi M, Bierman FZ, Freed MD, Ferrieri P, Gerber M, Shulman ST, Karchmer AW, Wilson W (1994) Guidelines for long-term management of patients with Kawasaki disease. Report from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation* **89:** 916-922

Dale JB, Penfound TA, Chiang EY, Walton WJ (2011) New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against non-vaccine serotypes of group A streptococci. *Vaccine* **29:** 8175-8178

Dey N, McMillan DJ, Yarwood PJ, Joshi RM, Kumar R, Good MF, Sriprakash KS, Vohra H (2005) High diversity of group A Streptococcal emm types in an Indian community: the need to tailor multivalent vaccines. *Clin Infect Dis* **40:** 46-51

Décourt LV, da Silva WN (1972) [Prevention of recurrences of rheumatic fever]. *Arq Bras Cardiol* **25:** 263-269

Edwards RJ, Taylor GW, Ferguson M, Murray S, Rendell N, Wrigley A, Bai Z, Boyle J, Finney SJ, Jones A, Russell HH, Turner C, Cohen J, Faulkner L, Sriskandan S (2005) Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of Streptococcus pyogenes. *J Infect Dis* **192:** 783-790

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

Fischetti VA, Parry DA, Trus BL, Hollingshead SK, Scott JR, Manjula BN (1988) Conformational characteristics of the complete sequence of group A streptococcal M6 protein. *Proteins* **3:** 60-69

Gillen CM, Courtney HS, Schulze K, Rohde M, Wilson MR, Timmer AM, Guzman CA, Nizet V, Chhatwal GS, Walker MJ (2008) Opacity factor activity and epithelial cell binding by the serum opacity factor protein of Streptococcus pyogenes are functionally discrete. *J Biol Chem* **283:** 6359-6366

Goulart C, Darrieux M, Rodriguez D, Pimenta FC, Brandileone MC, de Andrade AL, Leite LC (2011) Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine* **29:** 1634-1642

Guerino MT, Postol E, Demarchi LM, Martins CO, Mundel LR, Kalil J, Guilherme L (2011a) HLA class II transgenic mice develop a safe and long lasting immune response against StreptInCor, an anti-group A streptococcus vaccine candidate. *Vaccine* **29:** 8250-8256

Guerino MT, Postol E, Demarchi LM, Martins CO, Mundel LR, Kalil J, Guilherme L (2011) HLA class II transgenic mice develop a safe and long lasting immune response against StreptInCor, an anti-group A streptococcus vaccine candidate. *Vaccine*

Guilherme L, Alba MP, Ferreira FM, Oshiro SE, Higa F, Patarroyo ME, Kalil J (2011a) Anti-group A streptococcal vaccine epitope: structure, stability, and its ability to interact with HLA class II molecules. *J Biol Chem* **286:** 6989-6998

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

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

Guilherme L, Faé KC, Higa F, Chaves L, Oshiro SE, Freschi de Barros S, Puschel C, Juliano MA, Tanaka AC, Spina G, Kalil J (2006a) Towards a vaccine against rheumatic fever. *Clin Dev Immunol* **13:** 125-132

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

Guilherme L, Kalil J, Cunningham M (2006b) Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity* **39:** 31-39

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

Guilherme L, Oshiro SE, Faé KC, Cunha-Neto E, Renesto G, Goldberg AC, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kiss MH, Silva C, Guzman F, Patarroyo ME, Southwood S, Sette A, Kalil J (2001) T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. *Infect Immun* **69:** 5345-5351

Guilherme L, Postol E, Freschi de Barros S, Higa F, Alencar R, Lastre M, Zayas C, Puschel CR, Silva WR, Sa-Rocha LC, Sa-Rocha VM, Pérez O, Kalil J (2009) A vaccine against S. pyogenes: design and experimental immune response. *Methods* **49:** 316-321

Herwald H, Cramer H, Mörgelin M, Russell W, Sollenberg U, Norrby-Teglund A, Flodgaard H, Lindbom L, Björck L (2004) M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell* **116:** 367-379

Hidalgo-Grass C, Mishalian I, Dan-Goor M, Belotserkovsky I, Eran Y, Nizet V, Peled A, Hanski E (2006) A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J* **25:** 4628-4637

Imöhl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M (2010) Epidemiology of invasive Streptococcus pyogenes disease in Germany during 2003-2007. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58:** 389-396

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

Kapur V, Majesky MW, Li LL, Black RA, Musser JM (1993a) Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1 beta) precursor to produce active IL-1 beta by a conserved extracellular cysteine protease from Streptococcus pyogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 7676-7680

Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li LL, Hamrick MR, Hamill RJ, Patti JM, Musser JM (1993b) A conserved Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb Pathog* **15:** 327-346

Kim SJ, Kim EC, Cha SH, Kaplan EL (1996) Comparison of M-serotypes of Streptococcus pyogenes isolated from healthy elementary school children in two rural areas. *J Korean Med Sci* **11:** 133-136

Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW (2003) Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med* **9:** 914-920

Kwinn LA, Nizet V (2007) How group A Streptococcus circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiol* **2:** 75-84

Laarman A, Milder F, van Strijp J, Rooijakkers S (2010) Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Med (Berl)* **88:** 115-120

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

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

LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP (1994) Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 12115-12119

Lintges M, van der Linden M, Hilgers RD, Arlt S, Al-Lahham A, Reinert RR, Plücken S, Rink L (2010) Superantigen genes are more important than the emm type for the invasiveness of group A Streptococcus infection. *J Infect Dis* **202:** 20-28

Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM, Jasir A (2008a) Clinical and epidemiological aspects of invasive Streptococcus pyogenes infections in Denmark during 2003 and 2004. *J Clin Microbiol* **46:** 79-86

Luca-Harari B, Straut M, Cretoiu S, Surdeanu M, Ungureanu V, van der Linden M, Jasir A (2008b) Molecular characterization of invasive and non-invasive Streptococcus pyogenes isolates from Romania. *J Med Microbiol* **57:** 1354-1363

Ma Y, Yang Y, Huang M, Wang Y, Chen Y, Deng L, Yu S, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Shen X (2009) Characterization of emm types and superantigens of Streptococcus pyogenes isolates from children during two sampling periods. *Epidemiol Infect* **137:** 1414-1419

McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005) Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* **11:** 335-339

McMillan DJ, Beiko RG, Geffers R, Buer J, Schouls LM, Vlaminckx BJ, Wannet WJ, Sriprakash KS, Chhatwal GS (2006) Genes for the majority of group a streptococcal virulence factors and extracellular surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. *Clin Infect Dis* **43:** 884-891

McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, Baxendale DM, Reddish MA, Hu MC, Stroop SD, Linden J, Fries LF, Vink PE, Dale JB (2005) Safety and immunogenicity of 26-valent group a streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin Infect Dis* **41:** 1114-1122

Meisal R, Andreasson IK, Høiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA (2010) Streptococcus pyogenes isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *J Clin Microbiol* **48:** 842-851

Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* **91:** 385-395

Mollick JA, Miller GG, Musser JM, Cook RG, Grossman D, Rich RR (1993) A novel superantigen isolated from pathogenic strains of Streptococcus pyogenes with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. *J Clin Invest* **92:** 710-719

Mollick JA, Miller GG, Musser JM, Cook RG, Rich RR (1992) Isolation and characterization of a novel streptococcal superantigen. *Trans Assoc Am Physicians* **105:** 110-122

Morfeldt E, Berggård K, Persson J, Drakenberg T, Johnsson E, Lindahl E, Linse S, Lindahl G (2001) Isolated hypervariable regions derived from streptococcal M proteins specifically bind human C4b-binding protein: implications for antigenic variation. *J Immunol* **167:** 3870-3877

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

Narula j, Virmani R, Reddy KS, Tandon R (1999b) *Rheumatic Fever*, Washington, D.C.: American Registry of Pathology.

Norrby-Teglund A, Nepom GT, Kotb M (2002) Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles. *Eur J Immunol* **32:** 2570-2577

O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, Farley MM, Danila R, Zell ER, Facklam R, Schwartz B, Schuchat A (2002) Epidemiology of invasive group a streptococcus disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis* **35:** 268-276

Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M (1995) Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 2489-2493

Pandey M, Batzloff MR, Good MF (2012) Vaccination against rheumatic heart disease: a review of current research strategies and challenges. *Curr Infect Dis Rep* **14:** 381-390

Postol E, Alencar R, Higa FT, Freschi de Barros S, Demarchi LM, Kalil J, Guilherme L (2013) StreptInCor: a candidate vaccine epitope against S. pyogenes infections induces protection in outbred mice. *PLoS One* **8:** e60969

Putterman C, Diamond B (1998) Immunization with a peptide surrogate for double-stranded DNA (dsDNA) induces autoantibody production and renal immunoglobulin deposition. *J Exp Med* **188:** 29-38

Reda KB, Kapur V, Mollick JA, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR (1994) Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (ssa) from Streptococcus pyogenes. *Infect Immun* **62:** 1867-1874

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11:** 785-797

Rivera A, Rebollo M, Miró E, Mateo M, Navarro F, Gurguí M, Mirelis B, Coll P (2006) Superantigen gene profile, emm type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *J Med Microbiol* **55:** 1115-1123

Sakota V, Fry AM, Lietman TM, Facklam RR, Li Z, Beall B (2006) Genetically diverse group A streptococci from children in far-western Nepal share high genetic relatedness with isolates from other countries. *J Clin Microbiol* **44:** 2160-2166

Saxena A, Kumar RK, Gera RP, Radhakrishnan S, Mishra S, Ahmed Z, Pediatrics WGoPARFaCCoIAo (2008) Consensus guidelines on pediatric acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Indian Pediatr* **45:** 565-573

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

Shikhman AR, Cunningham MW (1994) Immunological mimicry between N-acetyl-beta-D-glucosamine and cytokeratin peptides. Evidence for a microbially driven anti-keratin antibody response. *J Immunol* **152:** 4375-4387

Shikhman AR, Greenspan NS, Cunningham MW (1993) 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* **151:** 3902-3913

Shikhman AR, Greenspan NS, Cunningham MW (1994) Cytokeratin peptide SFGSGFGGGY mimics N-acetyl-beta-D-glucosamine in reaction with antibodies and lectins, and induces in vivo anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* **153:** 5593-5606

Shulman ST, Stollerman G, Beall B, Dale JB, Tanz RR (2006) Temporal changes in streptococcal M protein types and the near-disappearance of acute rheumatic fever in the United States. *Clin Infect Dis* **42:** 441-447

Shulman ST, Tanz RR, Kabat W, Kabat K, Cederlund E, Patel D, Li Z, Sakota V, Dale JB, Beall B, Group USPS (2004) Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002. *Clin Infect Dis* **39:** 325-332

Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS (2010) The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol* **18:** 275-282

Smeesters PR, Vergison A, Campos D, de Aguiar E, Miendje Deyi VY, Van Melderen L (2006) Differences between Belgian and Brazilian group A Streptococcus epidemiologic landscape. *PLoS One* **1:** e10

Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR (2009a) Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr Opin Infect Dis* **22:** 544-552

Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR (2009b) Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* **9:** 611-616

Steer AC, Magor G, Jenney AW, Kado J, Good MF, McMillan D, Batzloff M, Carapetis JR (2009c) emm and C-repeat region molecular typing of beta-hemolytic Streptococci in a tropical country: implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* **47:** 2502-2509

Stenberg L, O'Toole P, Lindahl G (1992) Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type. *Mol Microbiol* **6:** 1185-1194

Stollerman G. (1988) Rheumatic fever and heritable connective tissue disease of the cardiovascular system. Hearth disease, pp. 1706-1717.

Tartof SY, Reis JN, Andrade AN, Ramos RT, Reis MG, Riley LW (2010) Factors associated with Group A Streptococcus emm type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* **10:** 327

Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S, Kawabata S (2008) Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J Biol Chem* **283:** 6253-6260

Thern A, Stenberg L, Dahlbäck B, Lindahl G (1995) Ig-binding surface proteins of Streptococcus pyogenes also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* **154:** 375-386

Todd EW, Lancefield RC (1928) VARIANTS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI; THEIR RELATION TO TYPE-SPECIFIC SUBSTANCE, VIRULENCE, AND TOXIN. *J Exp Med* **48:** 751-767

Trabulsi LR, Alterthum F, Candeias JAN, Gompertz OF (1999) *Microbiologia*, 3ª edn. São Paulo: Editora Atheneu.

Waldemarsson J, Areschoug T, Lindahl G, Johnsson E (2006) The streptococcal Blr and Slr proteins define a family of surface proteins with leucine-rich repeats: camouflaging by other surface structures. *J Bacteriol* **188:** 378-388

Whatmore AM, Kapur V, Sullivan DJ, Musser JM, Kehoe MA (1994) Non-congruent relationships between variation in emm gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci. *Mol Microbiol* **14:** 619-631

WHO (2004) Rheumatic fever and rheumatic heart disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* **923:** 1-122, back cover

Xavier R, Nolasco M, Muller R, Santos M, Lima A, Lucas M (2004) Prefere: da informação à prevenção. *Editorial Laranjeiras* **1:** 61-63

Zingaretti C, Falugi F, Nardi-Dei V, Pietrocola G, Mariani M, Liberatori S, Gallotta M, Tontini M, Tani C, Speziale P, Grandi G, Margarit I (2010) Streptococcus pyogenes SpyCEP: a chemokine-inactivating protease with unique structural and biochemical features. *FASEB J* **24:** 2839-2848