

Flavio Ferraz de Paes e Alcantara

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

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

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia

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

Co-Orientador: Dr. Jorge Kalil Filho

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alcantara, Flavio Ferraz de Paes e

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

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Luiza Guilherme Guglielmi.

Co-orientador: Jorge Kalil Filho.

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

USP/FM/SBD-186/06

Dedicatória

Só a verdade lhe libertará

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

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

A todos aqueles que me amaram e acreditaram em mim

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

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

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

Agradecimentos

A Deus,
Que sempre me deu oportunidades, e soube perdoar minhas falhas.
Fazendo-me levantar quando eu já havia desistido da caminhada.

A minha família,

A meu primeiro professor, meu pai. Inspirou-me em minha busca.
Sempre esteve a meu lado, apoiando, e se entusiasmando com minhas empolgações científicas e pessoais.

A minha mãe, que com seu amor sempre fez tudo a seu alcance pelos seus filhos.
Afligia-se junto com minhas frustrações, e se felicitava com minhas conquistas.

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

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

A minha irmã Renata, obstinada e talentosa.

A minha sobrinha preferida e amada Sofia.

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

A meus avós Estela e Francisco, o exemplo de uma vida a dois.
Onde nos momentos mais difíceis, minha alma e pensamentos sempre encontravam conforto.

Amigos e pessoas que contribuíram em minha formação pessoal

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

À sua filha, minha afilhada, Amanda

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

A Ursula Möhrle, pelo exemplo de um amor.

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

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

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

Uma mulher confiante e otimista. Uma mulher admirável.

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

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

Pessoas que contribuíram diretamente com este trabalho.

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

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

Aos patologistas do InCor:

Dra Raimunda Violante de Assis “in memoriam”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CNPq. grande parte do trabalho foi realizado com bolsa.
InCor - HC.FMUSP forneceu auxílio logístico e apoio para um congresso

Pessoas que contribuíram indiretamente com o trabalho.

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

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

Doutora Verônica Coelho por sua atenção contundente dos trabalhos realizados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pessoas que contribuíram em minha formação científica

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

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

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

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

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

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

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

Sumário

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

