

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho

**Pesquisa de anticorpos IgG séricos anti-lipoproteínas de
Mycoplasma fermentans e *Mycoplasma hominis* ou anti-MAM
(superantígeno de *Mycoplasma arthritidis*) em pacientes com
Artrite Reumatóide ou Lúpus Eritematoso Sistêmico.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Fátima Ribeiro Dias

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA

Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho

**Pesquisa de anticorpos IgG séricos anti-lipoproteínas de
Mycoplasma fermentans e *Mycoplasma hominis* ou anti-MAM
(superantígeno de *Mycoplasma arthritidis*) em pacientes com
Artrite Reumatóide ou Lúpus Eritematoso Sistêmico.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Fátima Ribeiro Dias

Dissertação submetida ao
PPGMTSP/IPTSP/UFG como
requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em
Medicina Tropical, na Área de
Concentração de Imunologia.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do CNPq.

Goiânia-GO, 2008

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)**

R672p Rocha Sobrinho, Hermínio Maurício.
Pesquisa de anticorpos IgG séricos anti-lipoproteínas de Mycoplasma fermentans e Mycoplasma hominis ou anti-MAM (superantígeno de Mycoplasma arthritidis) em pacientes com artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico[manuscrito] / Hermínio Maurício Rocha Sobrinho. – 2008.
xiv, 79 f.: il., figs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia.
Anexos.

1. Superantígeno MAM 2. Micoplasmas 3. Artrite reumatóide
4. Lúpus eritematoso sistêmico I. Dias, Fátima Ribeiro.
II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 579.887:616.5-002.52:616.72-002.77

SUMÁRIO

Dedicatória.....	V
Agradecimentos.....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VIII
Lista de Tabelas e Figuras.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1.1 Aspectos Gerais da Artrite reumatóide.....	1
1.1.2 Aspectos Gerais do Lúpus eritematoso sistêmico.....	8
1.2 Micoplasmas.....	12
1.2.1 Descrição Geral dos Micoplasmas.....	12
1.2.2 <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma fermentans</i> e <i>Mycoplasma</i> <i>arthritis</i>	15
1.3 Lipoproteínas de Micoplasmas.....	17
1.4 Aspectos Gerais dos Superantígenos.....	18
1.4.1 Superantígeno MAM (“ <i>Mycoplasma arthritis</i> mitogen”)	19
1.5 Evidências do envolvimento dos Micoplasmas e superantígeno MAM na Artrite reumatóide e no Lúpus eritematoso sistêmico	21
1.6 Justificativa.....	24
2. Objetivos.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
3. Material e Métodos.....	26

3.1 Pacientes e Aspectos Éticos.....	26
3.2 Obtenção das Amostras Séricas.....	27
3.3 Obtenção do MAM recombinante.....	27
3.4 Cultivo dos Micoplasmas.....	29
3.5 Extração de Lipoproteínas de Micoplasmas.....	29
3.6 SDS-PAGE de Lipoproteínas e superantígeno rMAM.....	30
3.7 <i>Western blotting</i>	31
3.8 Análise Estatística.....	33
4. Resultados.....	34
4.1 Anticorpos IgG reagentes com o superantígeno rMAM são encontrados em soros de pacientes com Artrite reumatóide, Lúpus eritematoso sistêmico e em indivíduos controles.....	34
4.2 Anticorpos IgG séricos de pacientes com Artrite reumatóide ou Lúpus eritematoso sistêmico reagem com um elevado número de LAMPs de <i>Mycoplasma hominis</i> ou <i>Mycoplasma fermentans</i>	37
5. Discussão.....	48
6. Conclusões.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	58
8. Anexos.....	72
Consentimento informado.....	73
Critérios para o diagnóstico da Artrite Reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	76

Dedicatória

Dedico este trabalho a quatro pessoas muito importantes para mim: minha mãe (Vanderlita Rocha), minha esposa (Valdênya E. de Souza), meu irmão (Cristiano Rocha) e em especial, ao meu amado Pai, Hervínio Tomaz da Rocha, *in memoriam*, o qual sempre me apoiou, incentivou e me encorajou a seguir a carreira docente. Meu exemplo de vida!

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao meu maravilhoso Criador e Salvador, meu Eterno Deus, Jesus Cristo. Razão da minha existência.

Agradeço à minha querida e admirável orientadora, Prof^a Dr^a Fátima Ribeiro Dias, pela oportunidade, confiança, paciência, capacitação e ensinamentos. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por tudo que fez por mim.

Aos professores, Dr. Milton Adriano P. Oliveira e Dr^a Mirian L. Dorta, pelo apoio e colaboração nas atividades do mestrado.

À Dr^a Marina Tiemi Shio, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-USP, por ter me cedido as alíquotas contendo o superantígeno rMAM.

Ao Prof. Dr. Jorge Timenetsky, do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo-USP, pelo cultivo das duas cepas de micoplasmas.

À equipe de reumatologistas do Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFG, em especial ao Dr. Nilzio Antônio da Silva e Prof^a Dr^a Fabiana P. Pina.

Aos funcionários do Banco de Sangue do HC/UFG e ao Dr. Célio O. Santos, Chefe Médico do Banco de Sangue, pelas amostras dos doadores de sangue.

Aos professores do IPTSP/UFG que participaram da Banca do Exame de Qualificação e Defesa, Prof^{as} Dr^{as}: Maria de Fátima Costa Alves, Regina Bringel Martins, Mara Silva Carvalhaes e Cláudia Maria Rassi.

Ao diretor do Laboratório da Área de Saúde (LAS) do Departamento de Biomedicina da UCG, Dr. Mauro M. Mesquita, pela colaboração com os exames hematológicos (Hemogramas).

Ao meu grande amigo, Prof. Wilson de Melo Cruvinel, pela colaboração, companheirismo, amizade e apoio na trajetória do mestrado.

À minha amiga, Prof^a Flávia Ikeda Araújo, pelo incentivo, cooperação e carinho.

À minha querida amiga, Renata Jarach, pela colaboração na técnica de *Western blotting*, seu apoio, disposição, carinho e ensinamentos.

Ao meu amigo, Benigno Rocha, pela colaboração nas análises estatísticas dos meus resultados (Epi Info).

Aos colegas do Laboratório de Apoio Didático (LAD) do Departamento de Biomedicina da UCG, Francisco, Karla Miranda, Douglas, Clayson Moura, Fernando Pucci e Danilo Mesquita, pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia do IPTSP/UFG, especialmente, Hélio Galdino júnior, Rosidete Bastos e Gabriela Oliveira.

Agradeço à minha mãe, Vanderlita Rocha, pelo amor, carinho e apoio nos momentos mais difíceis do mestrado.

À minha amada e linda esposa, Valdênya E. S. Rocha, pelo imenso amor, compreensão, companheirismo e incentivo nas minhas atividades.

Ao meu irmão, Cristiano Saulo da Rocha, pela solidariedade, apoio e carinho.

À minha querida sogra, Valdeci E. Nunes, pelo encorajamento, carinho e apoio.

Aos pacientes portadores de Artrite reumatóide ou Lúpus eritematoso sistêmico e doadores de sangue do Banco de Sangue HC/UFG que participaram da pesquisa.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao apoio financeiro do CNPq.

Lista de Abreviaturas

ACR – Associação Americana de Reumatologia (do inglês, *American College of Rheumatology*)

Ag – Antígeno

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*).

AINHs - Antiinflamatórios não hormonais

APS – Persulfato de amônio (do inglês, *Ammonium Persulfate*)

AR – Artrite reumatóide

APCs – Células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen Presenting Cells*)

ATCC – Coleção Americana de Culturas (do inglês, *American Type Culture Collection*)

CDAI – Índice clínico de atividade de doença da AR (do inglês, *Clinical index of disease activity*)

CCP – Peptídeo citrulinado cíclico (do inglês, *Cyclic Citrullinated Peptides*)

CTLA-4 Antígeno 4 do linfócito T citotóxico (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*)

DAB – Diaminobenzidina

DAS – Índice de atividade de doença da AR (do inglês, *Disease Activity Score*).

DAS28 - Índice de atividade de doença de 28 articulações (do inglês, *Disease Activity Score 28*).

DMCD – Drogas modificadoras do curso da doença

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, *Desoxirribonucleic Acid*)

EDTA – Ácido etileno-di-amino-tetra-acético (do inglês, *Ethylenediaminetetra acetic Acid*)

FAN – Fator anti-nuclear

Fr – Fator reumatóide

FOXP3 – Fator de transcrição FOXP3 (do inglês, *transcription factor FoxP3*)

g – Gravidade

GITR – Receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (do inglês, *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*)

GO – Goiás

GST – Glutathione S-Transferase

h – Hora

H₂O₂ – Água Oxigenada (Peróxido de Hidrogênio)

HCl – Ácido Clorídrico

HC/UFG – Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Goiás

HEp-2 – Células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*).

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*)

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina -10

IL-12 – Interleucina – 12

KDa – Kilodaltons

LAMPs – Lipoproteínas associadas a membrana de micoplasmas (do inglês, *lipid-associated membrane proteins*).

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

M – molar

rMAM – *Mycoplasma arthritidis* mitogen recombinante

Mb – Megabase

MDHM – Lipoproteínas de alta massa molecular derivadas de *Mycoplasma fermentans* (do inglês, *M. fermentans derived high molecular-mass material*).

mg – Miligrama

min – Minutos

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

mL – Mililitros

mm – Milímetros

nm - Nanômetros

µg – Micrograma

µL – Microlitro

NaCl – Cloreto de sódio

NK – Célula NK (do inglês, *Natural Killer cell*)

NO – Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)

PAF – Fator ativador de plaquetas (do inglês, *Platelet Activating Factor*)

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen associated molecular patterns*).

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PCR – Proteína C-reativa

PPLO – Organismos relacionados à pleuropneumonia (do inglês, *PleuroPneumonia-Like Organisms*)

SAGs - Superantígenos

SDAI – Índice simplificado de atividade de doença (do inglês, *Simplified Index of activity of disease*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*)

SDS PAGE – Dodecil sulfato de sódio, eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TCR – Receptor de antígenos da Célula T (do inglês, *T Cell Receptor*)

TLR – Receptor similar à proteína *Toll* (do inglês, *Toll-Like Receptor*)

TH1 – Linfócito T auxiliar 1 (do inglês, *T Cell Helper 1*)

TH3 – Linfócito T auxiliar 3 (do inglês, *T Cell Helper 3*)

TH17- Linfócito T auxiliar 17 (do inglês, *T Cell Helper 17*)

T_{TREGs} – Células T reguladoras naturais (do inglês, *T regulatory cells*)

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*)

V – Volts

v/v - Diluição volume a volume

VHS – Velocidade de hemossedimentação

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 . Freqüência de soros reagentes contendo anticorpos IgG anti-rMAM em pacientes com AR e em indivíduos controles do sexo feminino.	35
Tabela 2. Freqüência de soros reagentes contendo anticorpos IgG anti-rMAM em pacientes com LES e em indivíduos controles femininos.....	35
Tabela 3. Reatividade dos anticorpos classificada de acordo com o número de LAMPs identificadas.....	47
Tabela 4. Freqüências dos soros contendo anticorpos IgG reagentes com LAMPs de micoplasmas: distribuição por faixa de massa molecular das LAMPs.....	48
Figura 1. Análise do rMAM por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
Figura 2. Soros reagentes contendo anticorpos IgG anti-rMAM detectados pela reação de <i>Western blotting</i> : amostras séricas de pacientes com Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e de indivíduos controles femininos.....	36
Figura 3. Perfil eletroforético das LAMPs dos micoplasmas.	38
Figura 4. Resultados representativos de soros reagentes com LAMPs de micoplasmas.....	38
Figura 5. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) e do grupo Controle (Controles) com LAMPs de <i>M. hominis</i> PG21.....	40
Figura 6 Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de <i>M. hominis</i> PG21.....	41
Figura 7. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com artrite reumatóide (AR) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de <i>M. fermentans</i> PG18.....	42
Figura 8. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de <i>M. fermentans</i> PG18.....	43

Figura 9. Anticorpos IgG séricos de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) reconhecem várias LAMPs de *M. hominis* PG21.....44

Figura 10. Anticorpos IgG séricos de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) reconhecem várias LAMPs de *M. fermentans* PG18.....45

Resumo

A artrite reumatóide (AR) e o lúpus eritematoso sistêmico (LES) são doenças autoimunes de etiologia desconhecida. Algumas espécies de micoplasmas causam artrite séptica em seres humanos, sendo estas bactérias fortes candidatos à etiopatogênese destas doenças. O superantígeno MAM é uma proteína secretada por *Mycoplasma arthritidis*, que juntamente com lipoproteínas (LAMPs) de *M. hominis* e *M. fermentans*, ativam as células do sistema imune e podem estar envolvidos na etiopatogenia da AR e do LES. O objetivo do presente trabalho foi detectar e caracterizar a resposta de anticorpos IgG contra superantígeno MAM e LAMPs de *M. fermentans* e *M. hominis* em soros de pacientes com AR ou LES, a fim de detectar as LAMPs mais imunogênicas candidatas a antígenos envolvidos na etiopatogenia destas doenças. Os pacientes com AR ou LES e os controles saudáveis eram indivíduos do sexo feminino e da mesma faixa etária. Foi usado MAM recombinante e LAMPs de *M. hominis* PG21 e *M. fermentans* PG18 extraídas com detergente Triton X-114, para avaliar o perfil de anticorpos IgG por meio da técnica de *Western blotting*. Anticorpos IgG anti-MAM foram detectados tanto nos soros de pacientes quanto nos dos controles (AR: 27,5% vs 18,8%; LES: 21,7% vs 20,0%). Foram detectadas pelo menos 23 LAMPs nas preparações de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18 com massas moleculares entre 20 e 192 KDa. Os soros de pacientes com AR reconheceram um maior número de LAMPs de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18 do que os soros controles (AR: 11 ± 4 vs controles: 7 ± 3 , $n = 35$; $p < 0,05$). A maioria dos soros dos pacientes com AR apresentou forte reatividade com LAMPs de *M. hominis* PG21 (AR: 65,7% vs controles: 20%, $p < 0,05$). As LAMPs de *M. hominis* PG21 com massas moleculares <49 e ≥ 20 KDa e de *M. fermentans* PG18 < 102 e ≥ 58 foram mais frequentemente reconhecidas por anticorpos IgG de soros de pacientes com AR do que por anticorpos dos soros controles. Não foram atestadas diferenças significantes entre os perfis de reatividade dos soros de pacientes com LES e controles, nem com relação ao número de LAMPs reconhecidas, nem com as diferentes faixas de massas moleculares das LAMPs. Portanto, as LAMPs de *M. hominis* (<49 e ≥ 20 KDa) e *M. fermentans* (< 102 e ≥ 58) podem ser antígenos que induzem a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com antígenos próprios, contribuindo para o processo da patogênese da AR.

Palavras-chave: rMAM, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, lipoproteínas, anticorpos IgG, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico.

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) are autoimmune diseases of unknown etiology. Some species of mycoplasmas cause arthritis in animals and humans, and their lipid-associated membrane proteins (LAMPs) and *Mycoplasma arthritidis* mitogen (MAM superantigen) are potent stimulators of the immune system. Thus, it has been proposed that mycoplasma can be involved in autoimmune-disease etiology. The objective of the present work was to detect antibodies to MAM and LAMPs of *M. hominis* and *M. fermentans* in the patient sera, and to characterize the profile of IgG antibodies reactivity with LAMPs in order to identify the major immunogenic mycoplasmal lipoproteins that could be involved in the etiopathogenesis of these autoimmune diseases. Serum samples were obtained from peripheral blood of female patients at the same age of healthy controls. Recombinant MAM (from *M. arthritidis*), LAMPs of *M. hominis* PG21 and *M. fermentans* PG18 were used in Western blotting assays. Antibodies to MAM were detected in the patient and control sera (RA: 27.5% vs 18.8%; SLE: 21.7% vs 20.0%). At least 23 LAMPs were found in the preparations of *M. hominis* PG21 and of *M. fermentans* PG18 with molecular masses between 20 and 192 KDa. The sera of RA patients recognized a larger number of LAMPs of *M. hominis* PG21 and *M. fermentans* PG18 than the control sera (RA: 11 ± 4 vs controls: 7 ± 3 , $n = 35$; $p < 0,05$). Most of the sera of RA patients presented strong reactivity with LAMPs of *M. hominis* PG21 (RA: 65.7% vs controls: 20%, $p < 0.05$). LAMPs of *M. hominis* PG21 with molecular masses < 49 and ≥ 20 KDa and LAMPs of *M. fermentans* PG18 < 102 and ≥ 58 were mainly recognized by IgG antibodies of RA patients. When comparing sera from SLE patients and controls there was detected no significant differences between the profiles of IgG reactivity. Therefore, *M. hominis* PG21 LAMPs (< 49 and ≥ 20 KDa) and *M. fermentans* PG18 LAMPs (< 102 and ≥ 58 KDa) are high immunogenic mycoplasmal antigens that can induce antibody cross reactivity with self antigen, contributing with the RA pathogenesis.

Keywords: rMAM, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, lipoproteins, IgG antibodies, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus.

1. Introdução

1.1.1 Aspectos Gerais da Artrite reumatóide

A Artrite reumatóide (AR) e o Lúpus eritematoso sistêmico (LES) são doenças reumáticas autoimunes sistêmicas, de caráter inflamatório, com manifestações clínicas crônico-degenerativas progressivas. A AR é uma doença caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva a deformidade e destruição das articulações, em virtude de erosões ósseas e da cartilagem. Em geral, acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas e extrarticulares (cutâneas, vasculares, oculares, pleuropulmonares, cardíacas, renais, neurológicas, musculares). Nesta doença, o sítio do processo patológico é a sinóvia, com acometimento das articulações sinoviais e bainhas tendíneas (Choy et al. 2001; Bértolo et al. 2007; Östör et al. 2008).

A AR afeta 1 a 2% da população mundial, sendo mais freqüente nas mulheres (duas a três vezes) do que nos homens e sua prevalência aumenta com a idade, apresentando um pico de incidência entre 40 e 65 anos de idade (Gabriel 2001; Bértolo et al. 2007). Com a progressão da doença, os pacientes com AR desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades, tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (Arnett et al. 1988).

Esta doença tem etiologia desconhecida, entretanto, sabe-se que sua patogênese está relacionada a fatores genéticos e ambientais. Influências genéticas que contribuem para a suscetibilidade da AR têm sido demonstradas por estudos genéticos envolvendo familiares dos pacientes com AR usando o mapeamento genético, tendo sido estimado que estes fatores são responsáveis por 50 – 60% do risco de desenvolvimento da AR (Emery et al. 2002; Harris Jr et al. 2006). Especialmente envolvidos nesta doença, estão os genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (do inglês, MHC: *Major Histocompatibility Complex*), responsáveis pela síntese de moléculas apresentadoras de peptídeos antigênicos, as quais são expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *Antigen Presenting Cells*). Os alelos HLA-DR1 ou DR4 (HLA, antígeno leucocitário humano, do

inglês *Human Leukocyte Antigens*) do MHC, estão presentes em 80% dos pacientes caucasianos com AR, mas outros alelos também podem estar implicados no aumento da suscetibilidade genética à AR, tais como: HLA-DRB1 e DQ-B1 (Roudier, 2000; Reveille JD 2005). Além dos fatores genéticos, uma grande variedade de fatores exógenos, tais como: hormônios sexuais, gravidez, tabagismo, agentes infecciosos, entre outros, têm sido relacionados com a patogênese da AR (Kobayashi et al. 2008).

O aumento do risco de AR em mulheres tem levado a avaliação do papel dos hormônios sexuais na suscetibilidade a doença. Sabe-se que os níveis de hormônios sexuais masculinos, particularmente a testosterona, são menores em homens portadores de AR. Mulheres que usam pílulas anticoncepcionais têm um risco reduzido de desenvolver AR, demonstrando a importância dos hormônios estrogênicos na diminuição da suscetibilidade a AR (Harris Jr et al. 2006; Kobayashi et al. 2008). Há ainda, outros estudos relatando que o risco de desenvolvimento da doença está aumentado durante o período pós-parto, particularmente depois da primeira gravidez. Alguns trabalhos sugerem que a associação entre gravidez, aleitamento materno e AR pode estar relacionada com o aumento dos níveis do hormônio prolactina ou uma resposta anormal pró-inflamatória para a prolactina (Kobayashi et al. 2008).

Entre os fatores ambientais envolvidos na patogênese da AR, foi demonstrada uma associação de componentes tóxicos do tabaco (cigarro) e a doença. A ação da nicotina, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-dioxina induz formação de espécies reativas de oxigênio causando danos teciduais na sinóvia, induzindo a artrite devido à regulação positiva da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *Tumor Necrosis Factor*), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), nas células sinoviais. Portanto, a exposição da nicotina do tabaco pode exacerbar a inflamação na AR e contribuir para a patogênese desta doença (Kobayashi et al. 2008).

Ainda entre os fatores ambientais, existem trabalhos demonstrando a associação de certos microrganismos infecciosos, tais como: bactérias e vírus, com a patogênese da AR. As principais bactérias relatadas como fatores de risco para estas doenças são: *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Proteus mirabilis* e *Mycoplasmas spp.* Entre os vírus

mais relacionados com esta doença convém citar os seguintes: *parvovírus B19*, vírus *Epstein-Barr*, vírus da rubéola e o vírus da hepatite B (Firestein 2003; Fernandez et al. 2005; Harris Jr et al. 2006; Kobayashi et al. 2008; Kawahito et al. 2008).

Apesar da etiologia da AR continuar desconhecida, existe evidência convincente de que a autoimunidade desempenhe um papel proeminente em sua cronicidade e progressão. A doença acomete outros órgãos além das articulações, neste caso, a morbidade e a gravidade desta doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida do portador em três a dezoito anos, 80% dos pacientes afetados evoluem para óbito depois de 20 anos de doença (Jacobson et al. 1997; Emery et al. 2002; Bértolo et al. 2007).

Acredita-se que o processo de lesão articular seria iniciado a partir de um estímulo antigênico, provavelmente de proteínas/peptídeos articulares do tecido sinovial ou derivados de agentes infecciosos microbianos, que são capturados, processados e apresentados pelas APCs, residentes na sinóvia, em moléculas da classe II do MHC, para os linfócitos T auxiliares, induzindo a sua ativação e a conseqüente ativação e proliferação de macrófagos e fibroblastos sinoviais. Depois do contato das células do sistema imunológico com um fator desencadeante, provavelmente autoimune ou infeccioso, as células endoteliais, dos vasos sanguíneos locais, são ativadas por mediadores inflamatórios e expressam moléculas de adesão que promovem o recrutamento de leucócitos para o interior da articulação. Este processo é influenciado pela liberação de quimiocinas, como, por exemplo a IL-8, pelas células inflamatórias presentes na sinóvia. Observa-se um infiltrado de leucócitos com predomínio de linfócitos T CD4⁺ ativados no tecido sinovial, com conseqüente indução de neovascularização, hiperplasia sinovial e formação de *pannus* (tecido inflamatório neoformado sobre a cartilagem da articulação). Fatores de crescimento, intermediários reativos de oxigênio e proteinases, secretados pelas células inflamatórias ou por células mesenquimais, participam da destruição das estruturas articulares e periarticulares, bem como do desenvolvimento das manifestações sistêmicas (Lipsky & Davis 1998; Choy et al. 2001; Toh et al. 2007).

Os linfócitos T CD4⁺ coordenam as respostas imunes mediadas por células e reconhecem peptídeos artritogênicos, ainda não identificados. As

células T CD4⁺, ativadas pelos peptídeos artritogênicos, estimulam a ativação de monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas, TNF- α , IL-17, Interferon-gama (IFN- γ), e a secreção de metaloproteinases pelos leucócitos do infiltrado inflamatório e células mesenquimais (osteoclastos, condrócitos e fibroblastos) que podem causar danos teciduais à cartilagem articular. O TNF estimula também o desenvolvimento de osteoclastos, os quais participam do processo de degradação óssea. Algumas citocinas, como por exemplo, o TNF e fatores estimuladores de crescimento celular (GM-CSF: fator estimulador de granulócitos e monócitos), secretados por células mononucleares, podem induzir a angiogênese, a qual pode explicar o aumento da vascularização encontrada na sinóvia de pacientes com AR. Os linfócitos T auxiliares ativados expressam ligantes para osteoprotegerina, proteína presente na superfície das células ósseas, a qual estimula a ativação de osteoclastos, induzindo a osteoclastogênese (Choy et al. 2001). Mediadores solúveis da inflamação, como as citocinas IL-1 e TNF podem ser detectadas em alta concentração no sangue e no líquido sinovial de pacientes portadores de AR, podendo causar alterações articulares nestes pacientes (Choy et al. 2001).

As células T CD4⁺ ativadas também estimulam linfócitos B, por meio do contato direto célula-a-célula ou liberação de citocinas, levando a produção de autoanticorpos. Entre os autoanticorpos, destacam-se o Fator reumatóide (Fr, geralmente uma IgM anti-IgG) e outras imunoglobulinas que interagem com peptídeos artritogênicos (CCP: peptídeos cíclicos citrulinados). O papel do autoanticorpo Fr ainda não está bem claro, mas é sabido que envolve a formação de imunocomplexos circulantes que se depositam em diversos tecidos, especialmente a sinóvia, tornando-se insolúveis, ocasionando a ativação da via clássica do Sistema Complemento e conseqüentes lesões teciduais (Stuart et al. 1993; Lipsky & Davis 1998; Choy et al. 2001; Harris Jr et al. 2006; Östör 2008).

Acredita-se que uma subpopulação de linfócito T auxiliares denominadas células TH-17, isto é, linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺, produtores da IL-17, uma citocina inflamatória, esteja relacionada com a patogênese ou a exacerbação do processo inflamatório na AR (Shahrara et al. 2008). A diferenciação de linfócitos T auxiliares em células TH-17 é influenciada por algumas citocinas, como por exemplo, pela IL-23, IL-1 β e IL-6, as quais se ligam aos seus receptores

específicos, na superfície dos linfócitos T CD4⁺, induzindo a ativação dos fatores de transcrição nucleares (STAT3 e ROR γ t), responsáveis pela transcrição e síntese da IL-17. Shahrara et al. (2008) demonstraram uma alta concentração desta citocina no líquido sinovial de pacientes portadores de AR. A IL-17 é capaz de induzir o recrutamento de células inflamatórias para a sinóvia, levar à produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, quimiocinas, TNF) por APCs ativadas e até por células mesenquimais ativadas presentes na sinóvia.

A recente demonstração de diferentes fenótipos de células, agora chamadas células T reguladoras (T reg), re-introduziu o paradigma de que a auto-reatividade é ativamente regulada também por subtipos particulares de linfócitos. Este tema é de grande interesse contemporâneo e a literatura está repleta de estudos descrevendo novos subtipos de células regulatórias bem como sua função, fenótipo e frequência em condições fisiológicas e patológicas.

Nesse contexto, destaca-se o subtipo mais estudado de células com função imunorreguladora, conhecidas como células T reguladoras naturais (T_{REGS}). Representando cerca de 5% dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico são células caracterizadas pela expressão constitutiva das moléculas FOXP3 (do inglês, *transcription factor FoxP3*), GITR (do inglês, *glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor*) CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) e altos níveis de CD25 (IL-2R β). Alterações nesta população celular resultam no desencadeamento de doenças autoimunes em camundongos, muito semelhantes às doenças autoimunes humanas (Cao et al. 2003; Ehrenstein et al. 2004; van Amelsfort et al. 2004).

Um desequilíbrio entre populações de células T reg (como as células T reg naturais CD4⁺CD25⁺, Treg1 e TH3) e células T efetoras pró-inflamatórias (TH1 e TH17) tem-se mostrado de importância fundamental para a gênese e persistência de doença autoimune. Estudos demonstram o papel das células T CD4⁺ juntamente com os macrófagos no processo de dano articular com ênfase nas suas subpopulações TH1 (Linfócito T auxiliar 1) e TH17 (Linfócito T auxiliar 17), implicadas no processo inflamatório e de erosão óssea e da cartilagem na AR (Ehrenstein et al 2004; van Amelsfort et al. 2004).

Alguns estudos têm sido realizados com o propósito de avaliar o papel das T_{REG} na AR. Ehrenstein et al (2004), avaliando os efeitos da terapia com

infiximab (anticorpo monoclonal bloqueador de TNF), observaram níveis aumentados de T_{REGS} no sangue periférico de pacientes com AR ativa, em comparação a controles saudáveis. Evidenciaram ainda um aumento significativo em sua capacidade supressora. Outro estudo mostrou que a frequência das T_{REG} está aumentada, tanto no fluido sinovial quanto no sangue periférico de pacientes adultos, comparado com os indivíduos controles (Cao et al. 2003). Os pacientes com as formas de melhor prognóstico da doença exibiram frequência periférica aumentada de células T_{REG}. Por outro lado as células T_{REG} dos pacientes com AR falharam em inibir a produção de citocinas pelas células T CD4⁺CD25⁻, o que representa um achado importante, que nos remete a um provável defeito funcional reforçado pelo fato de que as citocinas inflamatórias são exuberantes nesta doença (Ehrenstein et al. 2004).

Cao et al. (2003) observaram que em cerca de 95% dos pacientes com doenças reumáticas que cursam com artrites, tais como AR, AR Juvenil, Espondilite Anquilosante, LES e outras espondilopatias, possuem níveis elevados de células T_{REG} na articulação inflamada, independentemente da condição clínica e do tempo de doença. Estes autores sugerem que as células T_{REGS}, mesmo que aumentadas numericamente na sinóvia inflamada e com função supressora normal, são incapazes de suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células T ativadas ou monócitos, possivelmente porque a ação supressora das T_{REGS} seria superada por células T com sinais de forte ativação presentes nesses locais, incluindo as células TH1 e as TH17.

O diagnóstico da AR depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos, sendo baseado nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR-1987, do inglês, *American College of Rheumatology*), envolvendo os seguintes critérios: rigidez matinal, artrite de três ou mais áreas, artrite de articulações das mãos, artrite simétrica, nódulos reumatóides, fator reumatóide (Fr) sérico, alterações radiográficas. Os quatro primeiros critérios devem estar presentes por pelo menos seis semanas. Quatro dos sete critérios são necessários para classificar um paciente como portador de AR, no entanto, pacientes com dois ou três critérios não são excluídos da possibilidade do futuro desenvolvimento da doença (Arnett et al. 1988).

Exames laboratoriais são imprescindíveis para auxiliar na avaliação do

estado da doença, sendo solicitados testes laboratoriais para avaliação da atividade inflamatória, testes para avaliação da função renal, dosagem de enzimas plasmáticas, dosagem sérica do Fr, exame qualitativo de urina, análise do líquido sinovial, pesquisa de autoanticorpos, hemograma, entre outros (van Venrooij et al. 2005; Avouac et al. 2006). O teste do Fr apresenta sensibilidade de 60 a 80%, mas tem baixa especificidade, podendo este fator estar presente em outras doenças reumáticas, em infecções e em indivíduos idosos. Por outro lado, o teste de anticorpos anti-CCP (citrulina é um aminoácido formado pela modificação de resíduos de arginina), cuja sensibilidade é similar à do Fr, é um teste de alta especificidade ($\geq 90\%$) e maior custo, geralmente solicitado nos casos de dúvida diagnóstica, principalmente nos casos de Fr negativo. Vale ressaltar que um teste negativo para Fr e anti-CCP não afastam o diagnóstico de AR, especialmente nas fases iniciais da doença (Schellekens et al. 2000; Van Venrooij et al. 2005; Avouac et al. 2006; Harris Jr et al. 2006; Bértolo et al. 2007; Alivernini et al. 2008).

A atividade da doença na AR é avaliada, frequentemente, por índices de atividade de doença: envolvem a contagem de articulações dolorosas, contagem de articulações edemaciadas, avaliação da dor, avaliação global da atividade da doença, incapacidade funcional, resposta de fase aguda (Velocidade de hemossedimentação -VHS/Proteína C-reativa -PCR), escala visual analógica. Estes parâmetros fornecem dados para a avaliação dos índices compostos da atividade da doença: índice simplificado de atividade de doença - SDAI, índice clínico de atividade de doença - CDAI, índice de atividade de doença – DAS (do inglês, *Disease Activity Score*), índice de atividade de doença de 28 articulações - DAS28 (van der Heijde et al. 1990; Aletaha et al. 2005).

O tratamento da AR é fundamental para o controle da atividade da doença, para prevenir a incapacidade funcional e lesão articular irreversível, diminuir a dor e tentar maximizar a qualidade de vida do paciente. Devido a complexidade de elementos imunológicos, leucócitos e moléculas (citocinas), envolvidos na patogênese da AR, a efetividade da intervenção terapêutica pode não se mostrar bastante precisa. Para o controle da dor e do processo inflamatório articular são usados antiinflamatórios não hormonais (AINHs), associados a doses baixas de corticosteróides (prednisona). As drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) são indicadas a partir da definição

do diagnóstico de AR, sendo os fármacos mais utilizados os seguintes: a hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, azatioprina e ciclosporina. A maioria destes fármacos costuma apresentar capacidade de reduzir sinais e sintomas de atividade da AR e melhora no estado funcional do paciente (Rindfleisch et al. 2005; Bértolo et al. 2007).

As manifestações extra-articulares graves geralmente são tratadas com altas doses de corticosteróides, normalmente durante a pulsoterapia, sendo comum empregar a ciclofosfamida como um dos principais fármacos (Bértolo et al. 2007). Doses elevadas de DMCD associadas a corticosteróides podem levar a toxicidade hepática, alterações renais e reabsorção óssea. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente no Brasil agentes modificadores da resposta biológica (imunobiológicos ou novas DMCD), tais como: bloqueadores de TNF- α , depletors de linfócitos B e moduladores da co-estimulação, os quais são indicados para os pacientes que persistam com atividade da doença, porém seu elevado custo e a administração por via parenteral limita sua utilização de forma mais ampla. Etanercept (receptor solúvel para o TNF), Infliximab, Nerilomab e D2E7 são proteínas associadas a anticorpos monoclonais que neutralizam ou bloqueiam a ação da citocina TNF- α . Rituximab é um anticorpo monoclonal humano anti-CD20, o qual depleta linfócitos B. Há também os bloqueadores de receptores para citocinas: anticorpo monoclonal para o receptor da IL-6 e o antagonista do receptor da IL-1 (Choy et al. 2001). Abatacept é uma proteína de fusão solúvel recombinante que possui um domínio da molécula CTLA-4 (CD152) e um domínio Fc de IgG1 humana modificado, o qual interage com as moléculas co-estimuladoras CD80 ou CD86 na superfície das APCs, inibindo um dos sinais (co-estimuladores) para a ativação dos linfócitos T. Este fármaco é usado quando os pacientes com AR tratados com inibidores de TNF não respondem bem ao tratamento ou por aqueles que abandonam o tratamento devido aos efeitos colaterais dos bloqueadores de TNF (Östor et al. 2008). Pode haver necessidade de tratamento cirúrgico da AR em situações onde as medidas clínicas e fisioterápicas não controlam os sintomas ou não permitem níveis mínimos aceitáveis de atividades de vida diária, as principais cirurgias englobam: a sinovectomia, correção de tendões, desbridamento articular e ressecção artroplástica e artrodese (Reilly et al. 1990; Choy et al. 2001; Emery et al. 2002; Guidelines ACR 2002; Bértolo et al. 2007; Östör et al. 2008).

1.1.2 Aspectos Gerais do Lúpus eritematoso sistêmico

O LES é uma doença autoimune inflamatória crônica, sistêmica, caracterizada pela presença de diversos autoanticorpos. Evolui com manifestações clínicas heterogêneas, com períodos de exacerbações e remissões. De etiologia não esclarecida, o desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética (HLA) e aos fatores ambientais, tais como: exposição à radiações solares (ultravioletas), alterações de hormônios sexuais e infecções (Mok & Lau 2003; Simard et al. 2007).

As principais manifestações clínicas do LES incluem: glomerulonefrites, citopenias, “rashes” (lesões cutâneas eritematosas), vasculites e trombozes, induzidas pela produção de autoanticorpos. Nesta enfermidade podem ser encontrados quadros de dor articular, rigidez, sinovites fugazes e artrites deformantes não-erosivas (artropatia de Jaccoud) ou erosivas (rhumus). Nos casos em que o processo inflamatório é evidente, é possível que os pacientes passem inicialmente por um diagnóstico de AR até que a expressão completa do LES se torne evidente (Reilly et al. 1990; Sczepanski et al. 1992; Hochberg et al. 1997).

Esta doença autoimune apresenta distribuição mundial, acometendo todas as classes sociais (Rus et al. 2002). No mundo, a incidência do LES é de aproximadamente 7 em 100.000 indivíduos. É uma doença rara, incidindo mais freqüentemente em mulheres jovens, ou seja, na fase reprodutiva, numa proporção de nove a dez mulheres para um homem (Simard et al. 2007). Estudos epidemiológicos apontam que a incidência do LES é maior entre os 20 e 45 anos de idade (Sato 1999; Sato et al. 2002). No Brasil, de acordo com Araújo et al. (2007), até o momento, ainda não há estudos epidemiológicos mostrando a incidência de LES na população brasileira; enquanto que nos Estados Unidos estima-se que uma pessoa em cada duas mil apresenta a doença. Contudo, na cidade de Natal-RN, um estudo realizado por Villar e Sato (2001), demonstrou que a incidência do LES, no Rio Grande do Norte, é de 8,7/100.000/ano, o que parece ser maior do que em outras partes do mundo, em virtude da permanente presença de luz solar com alto índice de raios ultravioleta, os quais são capazes de induzir mutações genéticas.

A predominância da doença em mulheres sugere que alterações em hormônios esteróides sexuais, diferenças na expressão de receptores celulares para estrógenos, diferenças nas modulações e metabolismo de hormônios sexuais podem apresentar um papel importante na patogênese do LES. Mulheres em idade fértil possuem maiores riscos de desenvolver o LES e mulheres da raça negra são mais acometidas pela doença (Rus et al. 2002; Simard et al. 2007).

Acredita-se que a etiologia do LES possa estar associada com a exposição do ser humano a múltiplos fatores ambientais, que em conjunto com alterações genéticas celulares (HLA e Complemento), levam o indivíduo suscetível a desenvolver distúrbios imunológicos que desencadeiam a autoimunidade (Mok & Lau 2003; Simard et al. 2007). Segundo Ayed et al. (2004) há um aumento da suscetibilidade genética ao LES em indivíduos que apresentam alta expressão de certos genes do MHC que codificam moléculas da classe II do MHC, especialmente, os alelos HLA-DRB1, DQ-A1, DQ-B1 e alótipos da proteína C4 do Sistema Complemento. Também relatam que alguns alelos específicos do HLA (HLA-DRB1) podem estar associados com o perfil de autoanticorpos produzidos no LES. De acordo com Vargas-Alarcón et al. (2001), em mexicanos, o alelo HLA-DRB1 é o principal associado com a suscetibilidade genética ao LES, pois é altamente expresso em pacientes lúpicos, ressaltando que estas moléculas da classe II do MHC podem apresentar peptídeos imunogênicos próprios, na superfície das APCs, para os linfócitos T CD4⁺.

Numerosas anormalidades imunológicas estão implicadas na etiologia do LES, incluindo ativação de células T, células B e células dendríticas, além da falha na remoção de corpos apoptóticos, interações entre linfócitos T e linfócitos B, mimetismo molecular, quimerismo e seleção defeituosa de linfócitos (Tenbrock et al. 2007). A ativação de linfócitos T CD4⁺ por estímulos de antígenos microbianos ou mesmo por peptídeos próprios, leva a ativação e proliferação de linfócitos B capazes de produzir autoanticorpos, os quais formam imunocomplexos que se depositam nos tecidos, ativam a via clássica do Sistema Complemento, o que gera lise tecidual, induzindo inflamação tissular no microambiente de ativação dos Linfócitos B. Isto ocasiona o espectro de lesões teciduais encontrado no LES e, conseqüentemente, as suas manifestações clínicas (Jacobson et al. 1997; Simard et al. 2007; Tenbrock et al. 2007).

Em humanos, vários estudos foram realizados com o propósito de avaliar a frequência, fenótipo e função das células T_{REG} no sangue periférico de indivíduos com LES. Na avaliação realizada por Crispin et al. (2003), foi observada uma frequência de células T CD4⁺CD25⁺ significativamente diminuída em pacientes com a doença ativa, quando comparado com os pacientes com a doença inativa e os controles normais. Posteriormente, Liu et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes, contudo sem correlação significativa entre os níveis de células T_{REG} e a atividade da doença. Mais tarde Lee et al. (2006) demonstraram frequência diminuída de T_{REGS} no sangue periférico, e havendo uma correlação inversa entre os níveis de T_{REGS} e os níveis de anticorpos anti-dsDNA. Miyara et al. (2005) relataram ausência de diferenças fenotípicas e funcionais nas T_{REGS} de pacientes com LES e de indivíduos normais, mas confirmaram uma diminuição no número de T_{REGS} em pacientes com doença ativa quando comparados com os controles normais e com pacientes com doença inativa. O mesmo foi observado por Mellor-Pita et al. (2006) quanto à diminuição na porcentagem de células T_{REG} no sangue periférico de pacientes com LES, tanto na fase ativa quanto na inativa. Foi relatado que a queda no nível dessa população celular é mais acentuada quanto maior for o grau de atividade da doença. Segundo os autores, essa diminuição não está relacionada ao uso de medicamentos imunossupressores, pois tanto os pacientes que estavam sobre tratamento quanto os que não estavam recebendo nenhum tipo de fármaco, apresentaram uma queda equivalente no nível de T_{REGS} quando comparados aos indivíduos controles (Mellor-Pita et al. 2006). Foi demonstrado, também, uma redução na proporção de células T_{REG} nos tecidos de pacientes com lúpus cutâneo (Franz et al. 2007).

O diagnóstico do LES é realizado utilizando-se 11 critérios de classificação propostos, em 1982, pelo ACR, e revisados em 1987. O diagnóstico se baseia na presença de pelo menos quatro critérios dos onze estabelecidos: 1. Eritema malar, 2. Lesão discóide, 3. Fotossensibilidade, 4. Úlceras orais/nasais, 5. Artrite, 6. Serosite, 7. Comprometimento renal, 8. Alterações neurológicas, 9. Alterações hematológicas, 10. Alterações imunológicas e 11. Anticorpos antinucleares (autoanticorpos).

A avaliação laboratorial reforça o diagnóstico clínico quando se observam alterações tais como leucopenia, anemia, linfopenia, plaquetopenia e alterações

do sedimento urinário. De particular importância para o diagnóstico é a pesquisa de autoanticorpos por imunofluorescência indireta, utilizando como substrato as células HEp-2 (FAN-HEp-2) (Lima et al. 2007; Lora et al. 2007). A positividade desse teste, embora não específico, serve como triagem devido a sua sensibilidade maior que 95%, sendo altamente improvável a presença da doença se o teste for negativo. Nos raros casos da doença com pesquisa de FAN negativa, particularmente com lesões cutâneas fotossensíveis, recomenda-se a realização da pesquisa de anticorpos anti-SSa/Ro (antígeno nuclear extraível). A pesquisa de anticorpos como anti-DNA nativo, anti-Sm, anti-RNP (SSA/SSB/Sm/RNP/Scl-70/Jo-1, são antígenos nucleares extraíveis) e células LE pode contribuir para melhor caracterização laboratorial do quadro. É importante o diagnóstico diferencial entre atividade da doença e infecção, lembrando da possibilidade de coexistência de ambas, assim como da presença de co-morbidades (Bombardier et al. 1992; Hochberg et al. 1997; Lora et al. 2007).

O tratamento medicamentoso do LES é bem semelhante ao da AR, visto que as manifestações clínicas destas doenças são bastante similares. A terapêutica do LES é individualizada e depende dos órgãos ou sistemas acometidos pela doença e da gravidade destes acometimentos. É baseado na associação de antimaláricos (cloroquina) e corticosteróides (prednisona) com medicamentos imunossupressores (DMCDs: azatioprina e metotrexato) (Reilly et al. 1990; Hochberg et al. 1997; Rus et al. 2002; Doria et al. 2008).

Ambas as doenças, AR e LES, descritas acima, apesar de apresentarem etiologia desconhecida, sofrem fortes influências de fatores ambientais e microrganismos infecciosos. Os micoplasmas são fortes candidatos à patogênese do LES ou da AR, pois são capazes de causar infecções inflamatórias crônicas, artrite em animais e artrite séptica em indivíduos imunologicamente suscetíveis, reações cruzadas de anticorpos com antígenos próprios, podendo levar ao surgimento ou exacerbação de doenças autoimunes (Ginsburg et al. 1992; Schaeverbek et al. 1996; Haier et al. 1999; Gilroy et al. 2001; Machado et al. 2001; Johnson et al. 2007).

1.2 Micoplasmas

1.2.1 Descrição Geral

Entre os procariontes, os micoplasmas são as menores bactérias conhecidas, medem de 0,3 a 1,0 μm , em média. Estas bactérias evoluíram por perda de material genético, a partir de ancestrais de bactérias Gram positivas. A palavra micoplasma é derivada das palavras gregas, *mykes* (fungo/filamentos) e *plasma* (forma). O primeiro isolamento de micoplasma foi obtido por Nocard & Roux na França (1898), a partir de material pulmonar bovino durante um surto de pleuropneumonia contagiosa. Microrganismos semelhantes foram descobertos posteriormente por outros pesquisadores em outros hospedeiros e foram, em sua grande maioria por várias décadas, denominados genericamente de PPLO (do inglês, *PleuroPneumonia-Like Organisms*). Devido ao seu tamanho foram inicialmente confundidos com vírus, porém são capazes de crescer e se reproduzir fora das células. Os micoplasmas não possuem parede celular e são limitados apenas por uma membrana plasmática trilamelar, o que os inclui na classe dos Mollicutes (Bové, 1999). Estas membranas são ricas em lipoproteínas, as quais são importantes fatores de virulência destas bactérias. Possuem um genoma constituído de um simples cromossomo circular contendo 0.58 a 2.2 Mbp, constituindo assim o menor genoma conhecido, resultante da redução gradual do genoma de um ancestral comum, por um processo conhecido como evolução degenerativa (Rottem & Naot, 1998; Rottem S, 2003; Waites & Talkington, 2004).

Os micoplasmas estão bastante disseminados no meio ambiente e podem colonizar plantas, animais e o ser humano, fazendo parte da microbiota urogenital e respiratória humana. Sua limitada capacidade de biossíntese faz com que a maioria dos micoplasmas exerça uma relação de parasitismo com seus hospedeiros, podendo, assim, causar doenças (Rawadi, 2000). Os micoplasmas colonizam as mucosas, crescendo aderidos às superfícies das células epiteliais. No entanto, algumas espécies crescem também intracelularmente, em linfócitos e células epiteliais de mucosas, essas incluem *Mycoplasma penetrans*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium* e *M. gallisepticum* (Rotten, 2003). Algumas espécies causam doenças do trato respiratório, como a pneumonia atípica; doenças do trato genitourinário, como a uretrite não gonocócica; doenças articulares, como a artrite séptica e estão associados a algumas desordens autoimunes. Além disso, algumas espécies

agem como co-fatores associados à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), provocando infecções oportunistas em indivíduos imunodeprimidos ou imunodeficientes (Blanchard & Montagnier 1997; You et al. 2006). Infecções por micoplasmas são mais freqüentes em indivíduos imunodeprimidos, com insuficiências orgânicas, imunodeficiências e hipogamaglobulinêmicos (Wise et al. 1993; Garcia-Pórrua et al. 1997; Rawadi et al. 2000).

Por meio de proteínas chamadas adesinas, os micoplasmas aderem-se às células hospedeiras e interferem com os receptores das membranas, alteram o mecanismo de transporte iônico e exaurem os nutrientes das células hospedeiras. A falta da parede celular facilita a fusão da membrana do micoplasma à da célula hospedeira. Essa associação íntima proporciona um microambiente no qual ocorre a concentração de produtos tóxicos do metabolismo dos micoplasmas, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxidos e amônia, podendo levar à morte da célula hospedeira e danos tissulares com conseqüente instalação de um processo inflamatório local. Este processo, tornando-se contínuo, produzirá danos oxidativos aos compartimentos vitais da célula hospedeira (Rottem & Naot, 1998; Glass et al. 2000; Rottem et al. 2003).

A maioria das espécies de micoplasma, no curso de suas interações com células do sistema imune, apresenta um amplo potencial de provocar efeitos imunomoduladores. Estes efeitos incluem a estimulação policlonal da proliferação de linfócitos, ativação de APCs, células NK (do inglês, *Natural Killer*), estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e indução do aumento da expressão de moléculas do MHC na superfície de APCs. Tais efeitos cumulativos podem induzir a elaboração de reações autoimunes no hospedeiro e podem ser substancialmente importantes para a patogênese de doenças autoimunes, como a AR e o LES (Stuart et al. 1993). Os micoplasmas ativam as células do sistema imune, mas são capazes de escapar dos mecanismos de defesa, por meio do mimetismo molecular e da variação antigênica, ocasionando infecções crônicas (Rottem & Naot, 1998).

Em paralelo à indução de respostas imunes específicas, várias espécies de micoplasmas são ativadores policlonais de linfócitos B e T *in vivo* e *in vitro* com subseqüente secreção de imunoglobulinas e ativação de linfócitos T citotóxicos (Simecka et al. 1993). Por outro lado, também foi descrito que os

micoplasmas podem ser supressores para a produção de anticorpos (Ruuth & Praz 1989). Os micoplasmas também são capazes de ativar monócitos/macrófagos, aumentando a expressão das moléculas classe I e II do MHC, a produção de óxido nítrico (NO, do inglês, *Nitric Oxide*) e a liberação de citocinas pro-inflamatórias (Stuart et al.1993; Ribeiro-Dias et al. 1999).

Em relação ao diagnóstico de infecção por micoplasmas, a falta de conhecimentos conclusivos quanto à patogenicidade dos micoplasmas em muitas condições clínicas, é devido, principalmente, ao desconhecimento de modo geral, de médicos e laboratoristas em relação às condições de isolamento e de crescimento destes microrganismos fastidiosos, levando-se em consideração que suas exigências de crescimento tornam difícil a sua detecção. Várias espécies de micoplasmas já foram detectadas ou isoladas de fluidos biológicos humanos, tais como: urina, sangue, secreções genitais, líquido sinovial, sêmem, e em tecidos, biópsias de órgãos transplantados e outros, demonstrando a sua capacidade de provocar infecção e doenças no ser humano (Hakkarainen et al. 1992; Simecka et al. 1993; Garcia-Pórrua et al. 1997; Rawadi et al. 2000).

Quanto ao tratamento, devido às características morfológicas dos micoplasmas, estes não são suscetíveis à penicilina e outros antibióticos que agem nas estruturas da parede celular das bactérias em geral, mas são sensíveis a uma variedade de antibióticos de largo espectro. As tetraciclinas e doxaciiclina são utilizadas na maior parte das infecções por micoplasmas em humanos (Taylor-Robinson & Bebear 1997, Hata et al. 2008; Jernberg et al. 2008).

1.2.2 *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma arthritidis*

Sabe-se que os micoplasmas colonizam os tratos urogenital e respiratório e que evidências do isolamento de certas espécies, tais como: *M. hominis*, *M. genitalium* e *M. fermentans*, em amostras biológicas humanas, tornam estas bactérias representantes de um grupo de microrganismos que têm sido associados a um vasto número de doenças infecto-contagiosas em adultos e crianças.

M. hominis faz parte da microbiota urogenital dos seres humanos e está bastante relacionado com infecções genitais em mulheres. Esta bactéria pode ser transmitida por meio de relações sexuais, causando doenças sexualmente transmissíveis. Este micoplasma também pode causar artrite séptica em humanos (Garcia-Pórrua et al. 1997; Lo et al. 2003; Phuah et al. 2007).

M. hominis, assim como *M. fermentans*, tem sido detectado (por meio de PCR, ou sorologia) ou isolados (cultura) de secreções vaginais de mulheres com vaginites, secreções de colo uterino, sêmen e secreções uretrais de homens adultos, bem como do líquido sinovial do joelho de pacientes portadores de AR e de outras doenças reumáticas autoimunes (Verinder et al. 1978; Taylor-Robinson et al. 1994; Machado et al. 2001; Lo et al. 2003; Daxboeck et al. 2003; Phuah et al. 2007).

No trato urogenital, espécies bacterianas do gênero *Ureaplasma sp* e a espécie *M. hominis*, são comumente implicadas como causadoras de infecções, alterações perigestacionais e distúrbios da reprodução, como infertilidade, abortos espontâneos, nascimentos de natimortos, partos de prematuros e crianças com baixo peso, entre outras (Koch et al. 1997; Daxboeck et al. 2003; Gdoura et al. 2007; Phuah et al. 2007).

Existem relatos de 18 casos de artrite séptica em seres humanos, principalmente em pacientes imunodeprimidos e pós-parto, causados por *M. hominis* (Luttrel et al. 1994; Phuah et al. 2007). Esta espécie também está associada com infecções em pacientes politraumatizados e em indivíduos que usam próteses articulares (Hakkarainem et al. 1992; Garcia-Pórrua et al. 1997). *M. fermentans*, originalmente isolado do trato urogenital de humanos, comprovadamente induz artrite séptica em animais experimentais. Também foi isolado na urina e tecidos de pacientes com AIDS (Wang et al. 1992; Schaeffer et al. 1996; Schaeffer et al. 1997; Johnson et al. 2000; Rivera et al. 2002; Kawahito et al. 2008). Em contraste à maioria das espécies de micoplasmas que são extracelulares, *M. fermentans* e também *M. penetrans* podem apresentar-se primariamente como intracelulares (Lo et al. 1991; Taylor-Robinson, 1991). Esta localização intracelular pode ser um dos fatores de proteção destes microrganismos contra anticorpos e antibióticos, contribuindo para a cronificação de suas infecções. Ainda, Frangoso et al. (1992) atribuem ao *M. fermentans* a capacidade de fusão com linfócitos do sangue periférico, sendo

um processo que pode resultar da interação entre componentes da membrana deste micoplasma com a dos linfócitos, podendo gerar alterações funcionais nestes leucócitos.

M. arthritidis é um patógeno bacteriano que acomete animais roedores, principalmente ratos e camundongos, além de coelhos, ocasionando artrite séptica e até toxicidade letal em camundongos, principalmente devido à ação do superantígeno MAM (do inglês, *Mycoplasma arthritidis Mitogen*), secretado por este micoplasma. Pode ser transmitido de animais ou mesmo do ambiente para o ser humano (Wenyi et al. 2008). Alguns estudos já demonstraram a presença deste micoplasma aderido a leucócitos, sinoviócitos, fibroblastos e células epiteliais de animais (Tu et al. 2005). *M. arthritidis* já foi isolado do líquido sinovial de coelhos com artrite séptica. A artrite experimental em camundongos pode ser induzida por inoculação intravenosa ou intraperitoneal de *M. arthritidis*. Esta artrite é muito similar, histologicamente, à AR em humanos. Diferentes cepas de *M. arthritidis* variam na sua habilidade de provocar doenças, existindo cepas que são mais virulentas do que outras, dentro da mesma espécie (Tu et al. 2005; Cole et al. 2005; Dybvig et al. 2008; Wenyi et al. 2008). *M. arthritidis* apresenta um pequeno genoma (820,45 pb) o qual é capaz de induzir variações nas proteínas expressas em sua membrana celular (Dybvig et al. 2008). Os mecanismos patogênicos mediados por *M. arthritidis* não são menos complexos do que aqueles associados a muitas outras doenças infecciosas microbianas, envolvendo a ação dos seus fatores de virulência: proteínas de adesão (MAAs, do inglês, *Mycoplasma arthritidis adhesins*), produção de superantígeno MAM, produção de superantígeno MAV1 bacteriófago, variação antigênica e mimetismo molecular, os quais colaboram para garantir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro, além de estarem associados com a capacidade de infecção das cepas de *M. arthritidis* (Cole et al. 2005; Dybvig et al. 2008; Wenyi et al. 2008).

1.3 Lipoproteínas de Micoplasmas

Wise et al. (1993) caracterizaram as LAMPs (do inglês, *lipid-associated membrane proteins*) de *M. fermentans*, destacando as seguintes propriedades: as LAMPs constituem a maioria das proteínas de membrana, são antigênicas,

podendo ser distinguidas por anticorpos monoclonais, e as mesmas são expostas na superfície do microrganismo. Segundo Lo et al. (2003), as LAMPs de micoplasmas apresentam alta antigenicidade e constituem os principais alvos moleculares da resposta imune humoral do hospedeiro, podendo apresentar variações de tamanho e massa molecular de uma espécie de micoplasma para outra. As LAMPs têm sido bastante usadas como alvos antigênicos nos testes laboratoriais sorológicos para a pesquisa de anticorpos séricos específicos para micoplasmas. Em estudo sorológico, utilizando-se como antígenos de micoplasmas as suas respectivas LAMPs, foram identificados 14 distintos sorotipos de *M. hominis*, trabalho realizado por Lo et al. (2003). A extração de LAMPs da membrana dos micoplasmas, seguida de partição em fases detergente e aquosa, demonstra que a fração detergente, onde se localizam os componentes hidrofóbicos da membrana, é a que possui a capacidade de ativar células da linhagem monocítica humana (Rawadi & Romam-Romam, 1996).

As LAMPs de micoplasmas ativam monócitos humanos e macrófagos murinos induzindo a produção de TNF e NO (Gallily et al. 1992; Ribeiro-Dias et al. 2003; Cole et al. 2005). A interação dos micoplasmas com estas células do sistema imune é mediada principalmente por LAMPs presentes na superfície dos micoplasmas. Mühlradt et al. (1994) demonstraram que proteínas de alta massa molecular (*MDHM*, do inglês *M. fermentans derived high molecular-weight material*) derivadas da membrana de *M. fermentans* são capazes de induzir a liberação de mediadores inflamatórios, tais como a IL-1, a IL-6 e o TNF- α em monócitos e macrófagos de camundongos.

As LAMPs de micoplasmas ativam monócitos, macrófagos e células dendríticas via receptores similares a proteína *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e a sinalização na via TLR das APCs pode quebrar a tolerância imunológica (Takeuchi et al. 2001), induzindo proliferação de linfócitos autorreativos e produção de anticorpos que podem reagir com antígenos próprios (Simecka et al. 1993; Abdollahi-Roodsaz et al. 2008).

As LAMPs triaciladas de micoplasmas podem interagir com o TLR2 associado com o TLR1, enquanto que as LAMPs diaciladas interagem com o TLR2 associado com o TLR6, formando heterodímeros. Estas interações induzem a ativação de diversos tipos de células imunológicas, principalmente as

APCs (Cole et al. 2005). O reconhecimento de TLR2 como receptor para as LAMPf (LAMP de *M. fermentans*) foi comprovado em experimentos com camundongos deficientes em TLR4 (Receptor para Lipopolissacarídeo-LPS de bactéria Gram negativa), nos quais as células produziram TNF em resposta a um lipopeptídeo de *M. fermentans* (MALP-2), enquanto que, células de camundongos deficientes em TLR2 não produziram TNF. Estes resultados indicaram que a produção da citocina induzida pela LAMPf é via ativação de TLR2 (Nishiguchi et al. 2001), ficando assim, estabelecido que o TLR2 é um receptor para as LAMPs. A ativação de monócitos/macrófagos via TLR induz produção de citocinas inflamatórias podendo ocasionar danos teciduais no hospedeiro. O tratamento de células mononucleares humanas com anticorpo anti-TLR2 inibe a indução de TNF- α pelas LAMPf (Lien et al. 1999).

Segundo Simecka et al. (1993), as LAMPs podem induzir efeito mitogênico em células B, ocasionando produção de anticorpos inespecíficos e aumento nos níveis sanguíneos de imunoglobulinas. Reconhecimento específico ou não-específico de antígenos de micoplasmas por linfócitos B pode produzir respostas imunes humorais importantes para a patogênese de doenças autoimunes. Por outro lado, as LAMPs também estimulam a produção de anticorpos específicos (Cole et al. 1977; Ruuth & Praz 1989; Simecka et al. 1993).

1.4 Aspectos gerais dos Superantígenos

Os superantígenos (SAGs) constituem um grupo de proteínas imunorreguladoras, secretadas por certas espécies de bactérias e vírus, são consideradas exotoxinas, exibem alto potencial mitogênico para linfócitos e ativam APCs. Os SAGs diferem dos antígenos protéicos convencionais pelo fato de que não necessitam ser previamente processados em peptídeos e apresentados, via moléculas de classe II do MHC, pelas APCs aos linfócitos T CD4⁺. Os SAGs se ligam a regiões não polimórficas das moléculas da classe II do MHC na superfície das APCs e a determinadas regiões do domínio variável da cadeia β do receptor de antígenos dos linfócitos T (TCR V β), induzindo, ativação simultânea e inespecífica destas células imunes (Howell et al. 1991;

Heide, 2001; Zhao et al. 2004; Li et al. 2005; Li et al. 2006).

Cada SAg se liga a um domínio V β de famílias de TCR e como o número de diferentes regiões V β no repertório de linfócitos T humano é restrito a aproximadamente 50 regiões V β distintas, contendo cerca de 24 tipos comuns destas regiões, um substancial número de linfócitos T são ativados por SAg. Assim, um SAg pode chegar a ativar cerca de 20% do repertório das células T humanas, enquanto apenas 1 em 10⁵ – 10⁶ linfócitos T virgens que são responsivos a antígenos protéicos apresentados de forma convencional são ativados (Proft & Fraser 2003).

Atualmente, 41 tipos de SAg bacterianos já foram descritos, os quais foram estruturalmente caracterizados pelo método de espectrometria de massa e análise cristalográfica. Os SAg podem diferir quanto à conformação estrutural e interações com regiões específicas (CDRs – regiões determinantes da complementaridade) do TCR ou com moléculas do MHC (Zhao et al. 2004).

Os SAg podem desempenhar um papel importante na patogenia das doenças autoimunes, visto que podem ativar de maneira específica ou inespecífica, um conjunto de linfócitos T que apresentam determinadas cadeias V β do TCR, incluindo clones de linfócitos T autoreativos (Cole et al. 2005). Além disso, ativam as APCs, o que contribui para a quebra da tolerância imunológica. Clones de linfócitos T autoreativos podem gerar respostas imunes exacerbadas ou descontroladas, podendo ocasionar autoagressão tissular e inflamação (Li et al. 2005). A contribuição dos SAg para a patogênese de doenças autoimunes tem sido investigada (Cole et al. 2000; Sawitzke et al. 2000; Proft & Fraser 2003; Li et al. 2005).

1.4.1 Superantígeno MAM (*Mycoplasma arthritidis* mitogen)

A única espécie de micoplasma conhecida que produz um SAg é *M. arthritidis*, que secreta o MAM. O superantígeno MAM é uma biomolécula de natureza protéica constituída por 213 aminoácidos e apresentando uma massa molecular de 25.704 Da (~26 KDa). A ligação do MAM é restrita às regiões V β do TCR, sendo influenciada pela conformação da região CDR3 deste receptor de antígeno, e às regiões não polimórficas de certas moléculas de classe II do MHC, permitindo interação entre o linfócito T específico e a APC induzindo a

ativação simultânea de certos linfócitos T CD4⁺ e APCs (Bhardwaj et al. 1994, Knudtson et al. 1997; Zhao et al. 2004; Li et al. 2005; Cole et al. 2005; Bode et al. 2007). Knudtson et al. (1997) demonstraram que o MAM estimula linfócitos T CD4⁺ expressando os seguintes tipos de TCR V β 3.1, 5.1, 7.1, 8.1, 10, 11.1, 12, 13.1, 14, 17, ou 20, mostrando “*in vitro*” que estes linfócitos podem ser expandidos policlonalmente, após inoculação com MAM. Estudo realizado por Li et al. (2005) demonstrou que existe uma elevada expansão de clones de linfócitos T apresentando TCR V β 3, V β 14 e V β 17 em pacientes portadores de AR.

O superantígeno MAM não utiliza apenas o mecanismo de interação entre moléculas de classe II do MHC e o TCR dos linfócitos T para ativar células do sistema imune, mas pode utilizar também o mecanismo de interação direta com TLRs, como o TLR2 ou o TLR4, expressos nas APCs (Mu et al., 2005; Mu et al., 2006). O MAM apresenta potente efeito imunomodulatório sobre diversas células do sistema imunológico, sendo capaz de ativar um grande número de diferentes células imunológicas, tais como APCs e linfócitos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6), NO, intermediários reativos do oxigênio (ROIs) entre outros mediadores moleculares da inflamação como o PAF - Fator Ativador de Plaquetas, do inglês *Platelet activating factor*) (Schiffenbauer et al. 1998; Sawitzke et al. 2000; Mu et al. 2000; Ribeiro-Dias et al. 2003; Shio et al. 2004; Cole et al. 2005; Mu et al. 2005). A ativação de clones de linfócitos autoreativos pode ocasionar alterações ou distúrbios das funções imunológicas do hospedeiro, resultando em produção de imunoglobulinas, incluindo o Fr, lesões teciduais, linfadenopatia, instalação de processos inflamatórios tissulares e outras perturbações imunes características da autoimunidade (Tumang et al. 1990; Paliard et al. 1991; Sawitzke et al. 2000; Mu et al. 2005; Mu et al. 2006; Wenyi et al. 2008).

É possível que a infecção por *M. arthritidis* seja capaz de induzir quebra de tolerância imunológica em indivíduos imunologicamente suscetíveis, possivelmente devido à ação do MAM na ativação policlonal de linfócitos T e de APCs, induzindo o desencadeamento de doenças autoimunes. Há evidências que o MAM possa ter um papel importante nas doenças inflamatórias associadas com infecção por *M. arthritidis*, embora isto geralmente não leve ao surgimento de sintomas clínicos no indivíduo (Cole et al. 2005; Dybvig et al.

2008; Wenyi et al. 2008).

1.5 Evidências do envolvimento dos Micoplasmas e superantígeno MAM na Artrite reumatóide e no Lúpus eritematoso sistêmico

Tem sido sugerido que a AR pode ser uma manifestação de uma resposta imune descontrolada a um agente infeccioso em um hospedeiro geneticamente suscetível. Vários possíveis agentes infecciosos associados à AR têm sido sugeridos, incluindo micoplasmas, *Chlamydia trachomatis*, vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus, parvovírus B19, vírus da rubéola, entre outros (Jefferies et al. 1998; Roudier et al. 2000, Fernandez et al. 2005). Uma possibilidade é que ocorra uma infecção persistente nas estruturas articulares ou retenção de produtos microbianos no tecido sinovial que induzem uma resposta inflamatória crônica que causa a quebra da tolerância aos antígenos próprios (Kawahito et al. 2008).

Certas espécies de micoplasmas causam doenças inflamatórias articulares crônicas em várias espécies animais, tais como bovinos, ovinos, suínos, aves e também em ratos (Taylor-Robinson, 1971). *M. arthritidis* causa artrite em roedores e coelho, histologicamente semelhante à AR humana (Cole et al. 1993). Em humanos, *M. pneumoniae* pode atingir o sistema músculo-esquelético, causando mialgia, artralgia e artrite séptica (Jansson et al. 1971; Davis et al. 1988; Barile et al. 1994). *M. hominis* e *M. fermentans* já foram relatados em casos de artrite séptica, identificados no fluido sinovial de pacientes com AR e no sangue ou secreção vaginal de pacientes com LES, por meio da PCR (Bartholomew et al. 1965; Jansson et al. 1971; Luttrell et al. 1994; Koch et al. 1997; Hoffman et al. 1997; Horowitz et al. 2000; Johnson et al. 2000; Gilroy et al. 2001; Machado et al. 2001; Kawahito et al. 2008).

Evidências do envolvimento de micoplasmas na AR e no LES têm sido demonstradas por meio da detecção de anticorpos anti-micoplasmas no soro, fluido sinovial e outras secreções biológicas dos pacientes, bem como pelo isolamento das bactérias ou identificação dos micoplasmas no fluido sinovial por meio da detecção de DNA destas bactérias, usando a PCR. Entre as espécies mais frequentemente encontradas estão: *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae* e *M. penetrans* (Cole et al. 1975; Schaeffer et al. 1997; Haier et

al. 1999; Horowitz et al. 2000; Johnson et al. 2000; Machado et al. 2001; Gilroy et al. 2001).

Machado et al. (2001) detectaram *M. hominis* no epitélio da endocérvice uterina de 20% das pacientes portadoras de LES, estes resultados sugerem haver uma associação entre infecção por *M. hominis* e LES.

Schaeffer et al. (1998) estudaram e compararam as características genotípicas de sete cepas de *M. fermentans* isoladas a partir do líquido sinovial de pacientes com AR. Outro estudo também demonstrou a presença de DNA de *M. fermentans* e anticorpos específicos para as bactérias no líquido sinovial de pacientes com AR (Horowitz et al. 2000). Esta espécie de micoplasma foi detectada no sangue de pacientes com AR, produzindo infecção sistêmica (Haier et al., 1999). Estes resultados sugerem que *M. fermentans* pode desempenhar um papel no desenvolvimento da AR. *M. fermentans* possui um potente produto imunomodulador chamado lipopeptídeo-2 ativador de macrófago (MALP-2) que ativa macrófagos para liberar citocinas, as quais aumentam a inflamação. O MALP-2 pode induzir a liberação de 5'-nucleotidase pelos macrófagos. Esta enzima pode ocorrer em articulações, em quantidades excessivas, quando *M. fermentans* está presente em pacientes com AR, induzindo lesões articulares no mesmo (Johnson et al. 2000).

O papel patogênico de *M. fermentans* ainda não foi completamente definido. Rivera et al. (2002) testaram e compararam a capacidade artritogênica de duas cepas diferentes de *M. fermentans* (P-140 e PG-18), isoladas de um paciente com asma. Uma suspensão da cepa de *M. fermentans* P-140 foi inoculada intratraquéia ou na cavidade articular do coelho e foi observado que estas cepas de micoplasmas eram capazes de induzir artrite. O estudo histológico do tecido sinovial revelou expressiva inflamação nos joelhos do animal com a cepa *M. fermentans* PG-18. No entanto, nos coelhos inoculados com a cepa *M. fermentans* P-140 houve uma menor resposta inflamatória local. *M. fermentans* P-140 tem sido isolado a partir do trato respiratório humano, enquanto a cepa *M. fermentans* PG-18 é um tipo de cepa mais isolada do trato geniturinário humano, ambos tem potencial artritogênico comprovado cientificamente (Rivera et al. 2002).

Acredita-se que o SA_g MAM ou moléculas estruturalmente similares a ele, as quais compartilham epítomos antigênicos comuns, possam iniciar e/ou

exacerbar doenças autoimunes, como por exemplo, a AR, pois evidências do encontro de elevados níveis de anticorpos séricos anti-MAM foram detectados em pacientes com AR nos Estados Unidos (Sawitzke et al. 2000) . Estudo realizado por Emery et al. (1985) relata que o SAg MAM pode induzir linfócitos B humanos a secretar Fr. Portanto, o MAM poderia contribuir para aumentar o processo de inflamação crônica e destruição da cartilagem e do osso na AR.

A ativação de células do sistema imune pelos micoplasmas induz respostas imunes específicas e inespecíficas, as quais podem contribuir para a proteção contra a infecção ou para exacerbá-la. A proteção é garantida especialmente por anticorpos neutralizantes, sendo os pacientes hipogamaglobulinêmicos altamente suscetíveis à infecção pelos micoplasmas (Roifman et al. 1986). Por meio do mimetismo molecular e da variação antigênica, os micoplasmas escapam das respostas imunes, o que contribui para a cronicidade das infecções e progressão das doenças. A produção crônica de anticorpos específicos ou inespecíficos pode desencadear reações de hipersensibilidade, incluindo reações citotóxicas, depósitos de imunocomplexos e ativação do sistema complemento, além de reações alérgicas mediadas por anticorpos IgE e indução de auto-anticorpos (Roifman et al. 1986; Gelfand 1993; Simecka et al. 1993; Sawitzke et al. 2000; Razin et al. 2002; Rottem, 2003).

A detecção de anticorpos anti-LAMPs de *M. fermentans* ou *M. hominis* ou de anticorpos anti-MAM e avaliação do perfil destes anticorpos IgG reagentes com as LAMPs no soro de pacientes portadores de AR ou LES pode contribuir para reforçar as evidências da associação entre infecção por micoplasmas e estas doenças.

1.6 Justificativa

Os micoplasmas são bactérias causadoras de doenças em animais e nos seres humanos. Algumas espécies, tais como, *M. fermentans* e *M. hominis* fazem parte da microbiota urogenital e respiratória humana, estando, freqüentemente, envolvidas em infecções do trato geniturinário, respiratório e das articulações (Luttrell et al. 1994; Razin et al. 2002; Rotten S, 2003; Phuah et al. 2007). Um dos principais fatores de virulência destas bactérias são lipoproteínas expressas na sua superfície, as quais são importantes alvos da resposta imune do hospedeiro (Lo et al. 2003). Outro produto antigênico produzido por uma espécie de micoplasma (*M. arthritidis*) é o superantígeno MAM o qual apresenta capacidade de ativar, de maneira específica ou inespecífica, diferentes leucócitos, principalmente linfócitos e APCs (Sawitzke et al. 2000; Cole et al. 2000). Este, juntamente com as LAMPs de micoplasmas, podem estar associados com a quebra de tolerância imunológica a antígenos próprios do ser humano, podendo induzir doenças autoimunes (Garcia-Pórrua et al. 1997). Algumas espécies de micoplasmas (*M. arthritidis*, *M. fermentans* e *M. hominis*) foram isoladas de diferentes líquidos biológicos humanos, causando doenças infecciosas, incluindo a artrite séptica (Luttrell et al. 1994). Em pacientes portadores de AR ou LES, estas espécies de micoplasmas também foram identificadas (Horowitz et al. 2000; Gilroy et al. 2001, Machado et al. 2001). A detecção de anticorpos IgG séricos anti-LAMPs de *M. fermentans* ou *M. hominis* ou anti-MAM e a avaliação do perfil de reatividade destes anticorpos IgG anti-LAMPs no soro de pacientes portadores de AR ou LES pode contribuir para uma melhor definição da associação entre infecção por micoplasmas e a gênese de doenças reumáticas autoimunes. Até o momento existe apenas um trabalho abordando a avaliação de anticorpos anti-MAM em pacientes portadores de doenças reumáticas autoimunes e poucos trabalhos demonstrando a presença de anticorpos IgG anti-LAMPs de micoplasmas em grupos de pacientes com doenças autoimunes. Ainda, pouco é conhecido sobre quais LAMPs seriam os principais antígenos de micoplasmas associados com a AR.

2. Objetivos

2.1 Geral

Detectar e caracterizar a resposta de anticorpos IgG contra superantígeno rMAM e LAMPs de *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma hominis* em soros de pacientes com artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico.

2.2 Específicos

2.2.1. Determinar o perfil eletroforético de LAMPs de membranas de *M. fermentans* PG18 e *M. hominis* PG21

2.2.2. Avaliar o perfil de anticorpos IgG reativos com LAMPs de *M. fermentans* PG18 e *M. hominis* PG21 para identificar as principais LAMPs imunogênicas candidatas a antígenos envolvidos na etiopatogenia da artrite reumatóide ou do lúpus eritematoso sistêmico.

2.2.3. Determinar a frequência de reatividade anticorpos IgG anti-rMAM no soro de pacientes portadores artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmicos e em indivíduos saudáveis.

3. Material e Métodos

3.1 Pacientes e aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás-UFG (Protocolo CEPMHA/HC/UFG N^o 051/2005). Os pacientes incluídos no estudo eram do sexo feminino, com idade entre 25 a 70 anos, sendo diagnosticados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas-UFG, com Artrite reumatóide (AR, n = 40) ou Lúpus eritematoso sistêmico (LES, n = 23), segundo os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR – Guidelines, 2002).

Foram selecionados pacientes com AR ou LES que apresentavam doença no estado inativo, isto é, doença em remissão, baseado nos índices compostos de atividade clínica. Para a AR, o índice composto de avaliação de atividade da doença foi o DAS-28 (Disease Activity Score). Sendo considerado paciente com AR em remissão aquele com pontuação do DAS-28 < 2,6 pontos, conforme Consenso Brasileiro para Diagnóstico e Tratamento da Artrite reumatóide (Bértolo et al. 2007). Este índice foi calculado pela equipe de médicos reumatologistas do Ambulatório de Reumatologia do HC/UFG. O DAS-28 é um índice composto por quatro variáveis: velocidade de hemossedimentação (VHS), número de articulações dolorosas (de um total de 28 articulações avaliadas), o número de articulações inflamadas/edemaciadas (entre 28 articulações avaliadas) e o grau de comprometimento causado pela doença, por meio de uma escala analógica visual para avaliar a dor do paciente (0 a 100 mm), indicada pelo próprio paciente. DAS28 é calculado pela seguinte fórmula: $0,56 + \text{raiz quadrada do numero de articulações dolorosas} + 0,28 \times \text{raiz quadrada do numero de articulações edemaciadas} + 0,70 \times \text{logaritmo neperiano do VHS} + 0,014 \times \text{escala visual analógica}$ (Prevoo et al. 1995).

A atividade de doença nos pacientes portadores de LES foi baseada no índice de atividade de doença no Lúpus eritematoso sistêmico – SLEDAI, adotando como critério de doença em remissão paciente LES com SLEDAI $\leq 2,0$ pontos. Foram incluídos pacientes com AR ou LES que estavam usando baixas doses de corticosteróides (prednisolona ≤ 10 mg/dia), associadas às drogas

modificadoras do curso da doença (DMCDs: Metotrexato, Hidroxicloroquina, Sulfasalazina, Azatioprina). Nenhum dos pacientes fazia uso de bloqueadores de TNF- α ou qualquer outro imunobiológico similar. O período de coleta das amostras sanguíneas dos pacientes e indivíduos controles foi de Março de 2006 a Agosto de 2007.

Os controles, também do sexo feminino (n = 83) eram mulheres saudáveis voluntárias, doadoras de sangue do Banco de Sangue do HC/UFG ou voluntárias saudáveis da comunidade. Ambos, pacientes e controles, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os indivíduos controles foram selecionados mediante critérios de seleção do Banco de Sangue (Hematócrito, peso, ausência clínica de doença) e realização de um hemograma, para confirmação dos padrões hematológicos de normalidade. Os grupos de pacientes e indivíduos controles foram pareados por sexo e faixa etária de maior prevalência da AR (n = 40, 40 – 70 anos) e do LES (n = 23, 25 – 45 anos).

3.2 Obtenção de amostras séricas

As amostras sanguíneas dos pacientes e indivíduos controles foram colhidas mediante uso de material descartável e antissepsia para punção venosa na fossa anticubital do antebraço. Foram colhidos 5,0 mL de sangue periférico, sem anticoagulante, em tubos vacutainer (BD vacutainerTM, Juiz de Fora, MG, Brasil) de cada indivíduo participante do estudo. Os soros foram separados, após coagulação em temperatura ambiente (T.a.), em torno de 60 min e em Banho-Maria (BM^a) a 37 °C, durante 15 min, seguida de centrifugação (1.500 g, 10 min), sendo glicerizados (v/v) e estocados à temperatura de -20 °C até o momento da realização dos testes sorológicos.

3.3 Obtenção do MAM recombinante

O superantígeno MAM recombinante (rMAM) foi produzido a partir do plasmídeo doado pelo Dr. Walid Mourad, Montreal, Canadá. Os processos de transformação da bactéria com o plasmídeo, expressão, solubilização e purificação do superantígeno rMAM foram executados pela Dr^a Marina Tiemi Shio, no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (USP). Brevemente, a cepa da bactéria *E.coli* – DH5 α foi transformada com o plasmídeo pGEX-6P contendo o cDNA do MAM (Langlois et al. 2000). Após 30

min a suspensão de bactérias foi incubada por 2 min/42 °C e depois mais 5 min no gelo. Foram adicionados 400 µL de meio SOB (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, MgCl 10 mM e Glicose 20 mM) às bactérias e estas foram incubadas por 45 min/37 °C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, as bactérias foram distribuídas em placas de cultura contendo meio LB sólido (Peptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5% e 100 µg/mL de ampicilina). A placa foi incubada por 18 h a 37 °C.

Uma colônia da placa de meio LB sólido foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido (Peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, e 100 µg/mL de ampicilina). A suspensão de bactéria foi incubada, sob agitação, por 18 h, a 30°C. Após a saturação da cultura, esta foi diluída 1/50 (bactéria/meio) e incubada, sob agitação, por 3 h, a 37 °C até atingir a densidade óptica (D.O. _{600 nm}) de 0,5. Logo após, as bactérias foram induzidas com IPTG 1,0 mM (Isopropiotiogalactosídeo, Invitrogen) e incubadas, sob agitação, por 18 h a 18 °C. Após este período de incubação, a suspensão bacteriana foi centrifugada (8.000 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi descartado, sendo o sedimento congelado a -20 °C.

Para a obtenção do rMAM, o sedimento foi ressuspendido na proporção 1:20 com PBS gelado, contendo 1 mM de PMSF (inibidor de protease, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) e 100 µg/mL de lisoenzima. A suspensão foi submetida a três ciclos de congelamento (1 min no nitrogênio líquido) e descongelamento (BM^a à 37 °C). Após a centrifugação (2000 rpm, 30 min, 4 °C), a parte solúvel (sobrenadante) contendo o rMAM foi recolhida. Depois de rompidas, 5 µL do sedimento e 15 µL do sobrenadante foram submetidos à análise por eletroforese e Western blotting, usando anticorpos IgG de coelho anti-MAM.

Em seguida, o sobrenadante foi incubado com a resina de sepharose Glutathione Transferase (GST)-mAMF. A purificação do rMAM foi realizada pelo método de cromatografia líquida (FPLC), usando resina de sepharose. A parte solúvel foi incubada com a resina, esta já estava equilibrada em PBS, por 45 min (T.a.), sob agitação. Depois da centrifugação (2.500 rpm/3 min/t.a.) a parte não ligada foi colhida e a resina lavada seis vezes com salina tamponada com fosfatos (PBS) 5x o volume da resina. As duas primeiras lavagens foram

colhidas para verificar a quantidade de proteína perdida. Em seguida, a resina+proteína foi incubada com o tampão de eluição (6,7 mg de GST reduzida, em tampão TRIS/HCl 0,1 M pH 8; NaCl 3,3 M, volume final de 1 mL) por 40 min/T.a., sob agitação. Após a centrifugação, o eluído, contendo a proteína, foi colhido, e a resina foi submetida a mais três eluições.

A concentração proteica das amostras obtidas foi determinada usando o Kit BCA Protein Assay, (Pierce, Rockford, IL, EUA) usando uma curva-padrão com concentrações conhecidas de gamaglobulina. O rendimento foi de 8 mg de proteína por litro de cultura. A obtenção do superantígeno rMAM, pelo processo acima descrito, forneceu o MAM solúvel associado à proteína GST, aqui referido como rMAM-GST.

3.4 Cultivo dos Micoplasmas

Os micoplasmas foram doados pelo Dr. Jorge Timenesky, do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo-USP, São Paulo. As cepas de *M. hominis* PG21 (ATCC) e *M. fermentans* PG18 (ATCC) eram mantidas congeladas em fase log de crescimento a -70 °C, sendo descongeladas e subcultivadas em meio líquido SP4 (Tully, 1995) e então expandidas até 1.000 mL (Senterfit, 1985). As culturas foram mantidas a 37 °C em aerobiose por três a cinco dias. Após o crescimento, as culturas de micoplasmas foram testadas para hidrólise de arginina, produção de colônias do tipo “ovo frito”, em meio SP4 sólido e a espécie de micoplasma foi confirmada por inibição de crescimento por anticorpos específicos (Clyde Jr. 1985). A cultura de micoplasmas, em meio líquido SP4, foi centrifugada, o sedimento ressuspensionado em 40 mL de PBS (pH 7,4, contendo timerosal 0,025%) e centrifugada a 20.000 g por 30 min, a 4 °C, por duas vezes consecutivas, para a retirada dos componentes do meio de cultura. O sedimento bacteriano foi utilizado para a extração das LAMPs dos micoplasmas como descrito abaixo.

3.5 Extração de Lipoproteínas (LAMPs) de Micoplasmas

A extração das LAMPs da membrana dos micoplasmas foi realizada pelo método de fracionamento de fase com detergente Triton X-114, baseado em Wang *et al.* (1992), com algumas modificações. Inicialmente, o sedimento de micoplasma foi inativado a 56 °C em BM^a por 45 min. Em seguida, o sedimento

foi ressuspensionado com 40,0 mL de tampão PBS com Timerosal (pH = 7,4) e centrifugado por 30 min a 20.000g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1,0 mL de Triton X-114 a 10% (Sigma) em água MilliQ (concentração final de 2% de detergente) e 4,0 mL do tampão de extração (Solução Tris HCl 50mM; NaCl 150mM; EDTA 1mM, pH 8,0). A preparação foi submetida de seis a oito ciclos de sonicação por 1 min, a uma potência de 100 watts (Desruptor de células UNIQUE), com intervalos de 1 min, em banho de gelo. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de Triton X-114 a 10% e 20 mL do tampão de extração (concentração final de 2% de detergente). Após incubação por 3 h a 4 °C, sob agitação, a mistura foi centrifugada a 20.000 g por 30 min, a 4 °C, para retirada de resíduos. O sobrenadante foi submetido à extração por partição de fase, sendo incubado a 30 °C por 5 min em BM^a e centrifugado a 2.500 g por 10 min, à temperatura de 30 °C. Duas fases se formaram e a fase aquosa superior, foi descartada. À fase inferior (detergente) foi adicionado igual volume de tampão de extração a 4 °C e a mistura foi submetida novamente à partição de fase, por duas vezes, como descrito anteriormente. A fase detergente foi tratada com etanol absoluto para precipitação das lipoproteínas (Rawadi & Roman, 1996). Para isto, ao volume final da fase detergente foi acrescentado igual volume de tampão de extração e duas vezes e meia o volume de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20 °C por 20 a 22 h, sendo em seguida centrifugada a 50.000 g por 1 h, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as lipoproteínas, no sedimento, foram solubilizadas em PBS (estéril) e adicionadas de inibidores de protease, na concentração de 0,1% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). A solução foi alíquotada e estocada a -20 °C até o momento do uso. A quantificação das lipoproteínas foi realizada com o kit BCA Protein Assay (Pierce, EUA), conforme instrução do fabricante, sendo a concentração proteica das amostras obtida em curva padrão preparada com diferentes concentrações de albumina.

3.6 SDS-PAGE de LAMPs e Superantígeno rMAM-GST

As LAMPs foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; Laemmli, 1970), sob condições redutoras, após diluições das alíquotas de LAMPs em tampão de amostra (glicerol a 20%, SDS a 4%, Tris HCl 60mM, azul de bromofenol a 0,03%, 2-Mercaptoetanol a 1%, concentrado 4

vezes), sendo utilizado um gel de corrida a 10% e gel de empilhamento na concentração de 3% para a eletroforese das LAMPs. O gel de poliacrilamida para a eletroforese do superantígeno rMAM-GST e GST foi preparado na concentração de 12% e o gel de empilhamento a 3%. Ambos os géis foram preparados com uma solução de Bis-Acrilamida 30% (28,42g de acrilamida –Bio Rad, Hercules, CA, EUA; 1,58g de bis–acrilamida - Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA, em água MilliQ), solução Tris - Base (Sigma) a 0,75 M, pH 8,8, para o gel de corrida; e para o gel de empilhamento foi usada uma solução Tris a 1,0 M, pH 6,8 e SDS a 10% (USB™, Cleveland, OH, EUA); persulfato de amônio a 10% (APS, Sigma) e tetrametiletenodiamina (TEMED, Sigma). A eletroforese foi realizada utilizando o sistema Mini-Protean®3cell (Bio Rad, EUA). As amostras do superantígeno rMAM-GST, GST e LAMPs de *M. fermentans* PG18 e de *M. hominis* PG21 foram diluídas em água MilliQ, de acordo com a concentração protéica, sendo ambos os antígenos acrescidos de tampão de amostra 4 vezes concentrado. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida, sendo: rMAM-GST (3,0 µg/canaleta), GST (3,0 µg/canaleta), LAMPs de *M. hominis* PG21 (1,5 µg/canaleta) e LAMPs de *M. fermentans* PG18 (5,0 µg/canaleta), após 3 min em BM^a fervente. Foi usado um padrão contendo proteínas com massas moleculares: 192; 102; 58; 49; 30; 20 e 15 KDa (Bio Rad, EUA), para a determinação das massas moleculares das LAMPs, do rMAM-GST e da GST. Após a adição de tampão de corrida na cuba eletroforética contendo o gel, foi aplicada uma corrente elétrica inicial de 60 V, até a entrada das amostras no gel de corrida, sendo em seguida, a corrente aumentada para 100 V. O tempo total estimado para a separação das proteínas foi de aproximadamente 145 min para o rMAM-GST e GST e de 155 min para as LAMPs. Após estes períodos, o gel era impregnado com o nitrato de prata, ou era realizada a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (para a técnica de Western blotting), como descrito abaixo. Para efetuar a impregnação pela prata, primeiramente o gel foi fixado por 15 min (metanol 50%, ácido acético 12%; formaldeído 0,3% em água deionizada). Em seguida, era lavado três vezes com etanol 50% por 10 min, tratado com tiosulfato de sódio 0,02%, lavado por três vezes com água deionizada e depois corado com solução de nitrato de prata 0,2% por 10 min, sendo em seguida, lavado com água. A solução reveladora foi adicionada (carbonato de sódio 0,6%; tiosulfato de sódio 0,0004%, formaldeído 0,3%), até

a visualização das bandas. A reação foi paralisada com solução contendo metanol 50% e ácido acético 12% em água deionizada, quando as bandas das proteínas tornaram-se nitidamente visíveis no gel de poliacrilamida.

3.7 Western blotting

A técnica foi realizada segundo padronização descrita por Towbin et al. (1979) e Cordova et al. (1999), com alterações. A transferência dos antígenos, do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, foi efetuada utilizando-se o sistema Mini-Protean®3cell (Bio Rad, EUA). No procedimento foi utilizado tampão de transferência gelado (3,03g Trizma; 14,04 g Glicina; 200 mL de Metanol; 1.000 mL água deionizada). O tempo médio de transferência foi de 65 min a 100 V, em banho de gelo. Para verificar a qualidade da transferência das LAMPs ou do superantígeno rMAM-GST e GST na membrana de nitrocelulose foi realizada a coloração desta com solução corante Ponceau Red 0,1% em ácido acético a 10% (dois min, sob agitação leve). Após a observação das bandas de proteínas perfeitamente coradas, a membrana foi lavada em recipiente contendo água destilada e depois cortada em tiras de aproximadamente 3 mm que eram bloqueadas com solução bloqueadora contendo leite desnatado em pó a 5% em PBS pH 7,4 por 2 h, à T.a., sob leve agitação.

As amostras séricas dos pacientes com AR ou LES e indivíduos saudáveis foram diluídas 1/100 em PBS contendo 2% de leite desnatado em pó para a reação com o rMAM-GST, GST e as LAMPs de *M. hominis* PG21 e diluídas 1/20 para a reação com as LAMPs do *M. fermentans* PG18. Os soros controles contendo IgG de camundongo anti-GST, doados pela Dra. Irene da Silva Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-USP, foram diluídos 1/500 em solução bloqueadora a 2% e aplicados sobre as tiras para testar sua reatividade às proteínas GST transferidas para a membrana de nitrocelulose. Também foi doado, pelo Dr Jorge Timenetsky, uma alíquota de um soro controle positivo contendo anticorpos IgG para *M. hominis*, obtido de um paciente com artrite séptica por esta espécie de micoplasma. Inicialmente, as tiras de nitrocelulose foram incubadas por 18 h a 4 °C, sob agitação, e depois lavadas por cinco vezes (10 min cada lavagem) com solução de lavagem (PBS Tween 20 - 0,05%; pH 7,4). Posteriormente, foram incubadas

por 60 min com o conjugado IgG-peroxidase anti-IgG humano (Bio Rad, EUA) diluído 1/4.000 em solução de bloqueio a 2%, ou conjugado IgG-peroxidase anti-IgG de camundongo, diluído 1/5.000 em solução bloqueadora a 2%. Novamente as tiras foram lavadas cinco vezes (10 min cada lavagem) com solução de lavagem e duas vezes com PBS, pH 7,4, sem Tween 20.

A reação foi revelada com PBS contendo diaminobenzidina (DAB, Sigma) e peróxido de hidrogênio (5 mg de DAB, 10 μ L de H₂O₂ a 30%, em 35 mL de PBS). Após o aparecimento das bandas (tempo médio de 7 min de revelação), a reação foi finalizada com água destilada e as tiras foram lavadas três vezes com água destilada. As tiras de Western blotting foram ordenadas, de acordo com a marcação da tira de padrão de massas moleculares e digitalizadas (Scanner Canon) para análises e confecção dos diagramas representativos dos perfis de bandas identificadas em cada grupo de amostras séricas avaliadas. Para cada soro testado foram quantificados o número total de bandas (LAMPs) e o número de bandas por faixa de massa molecular. As bandas foram marcadas por dois observadores isoladamente, em análise cega. Após a conferência das bandas identificadas foram definidos os diagramas representativos dos blottings.

3.8 Análises Estatísticas

Os dados representam valores individuais, freqüências e as médias \pm desvio padrão. Inicialmente, os dados foram avaliados, estatisticamente, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (KS) para determinar se a amostra é proveniente de uma população com distribuição contínua ou não (distribuição normal), e posteriormente, os dados foram submetidos ao Teste *t de Student*. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Foi utilizado o GraphPad Prism 4.0 Software (San Diego, CA, EUA). Para comparação de freqüências de soros reagentes por faixas de massas moleculares foi avaliado o intervalo de confiança a 95% (IC95%) e o teste χ^2 , utilizando o programa Epi Info versão 3.4.3, 2007 (Dean et al. 1996).

4. Resultados

4.1 Anticorpos IgG reagentes com o superantígeno rMAM em soros de pacientes com Artrite reumatóide (AR), Lúpus eritematoso sistêmico (LES) e em indivíduos controles

O superantígeno rMAM foi expresso em bactéria *E. coli* e purificado como rMAM-GST. O eluato contendo rMAM-GST foi submetido a SDS-PAGE. A Figura 1 mostra o perfil eletroforético do rMAM-GST, apresentando massa molecular de aproximadamente 52 KDa e da proteína GST, que tem massa molecular de 26 KDa.

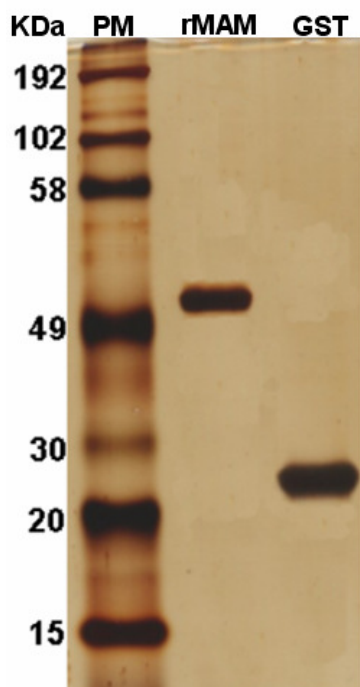


Figura 1. Análise do rMAM por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Eluato, contendo rMAM-GST (3,0 µg/canaleta), bem como a proteína GST (3,0 µg/canaleta), foi submetido a SDS-PAGE em gel a 12%. A impregnação pela prata revela o rMAM-GST (~52 KDa) e a GST (26 KDa). À esquerda, o padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas (PM).

A detecção de anticorpos IgG anti-rMAM nos soros de pacientes e controles foi realizada por meio da técnica de *Western blotting*. Como pode ser visto nas Tabelas 1 e 2, os resultados mostram que não há diferenças significantes entre as freqüências de soros reagentes de pacientes com AR ou LES vs controles (AR: 27,5% vs 18,8%, Tabela 1; LES: 21,7% vs 20,0%, Tabela 2, $p > 0,05$, Teste χ^2).

Tabela 1. Freqüência de soros reagentes para anticorpos IgG anti-rMAM em pacientes com AR e em indivíduos controles do sexo feminino^a.

Grupo	Reagentes n (%)	Não Reagentes n (%)	Total
AR	11 (27,5%)	29 (72,5%)	40
Controles	9 (18,8%)	39 (81,2%)	48
Total			88

^aSoros (D = 1/100) de pacientes com Artrite Reumatóide (AR, 52,5 ± 1,1 anos de idade) e indivíduos controles (51,3 ± 1,0 anos), ambos do sexo feminino, foram testados pelo método de *Western blotting*, para a presença de anticorpos IgG anti-rMAM ($p > 0,05$, *Teste X²*).

Tabela 2. Freqüência de soros reagentes para anticorpos IgG anti-rMAM em pacientes com LES e em indivíduos controles do sexo feminino^a.

Grupo	Reagentes n (%)	Não Reagentes n (%)	Total
LES	5 (21,7%)	18 (78,3%)	23
Controles	7 (20,0%)	28 (80,0%)	35
Total			58

^aSoros (D = 1/100) de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES, 34,8 ± 1,2 anos) ou indivíduos controles saudáveis (37,5 ± 0,8 anos), ambos do sexo feminino, foram avaliados para reatividade com rMAM pelo método de *Western blotting*. Estão representados os números de soros avaliados e as freqüências em % ($p > 0,05$, *Teste X²*).

Os resultados do *Western blotting* de todos os soros reagentes são apresentados na Figura 2.

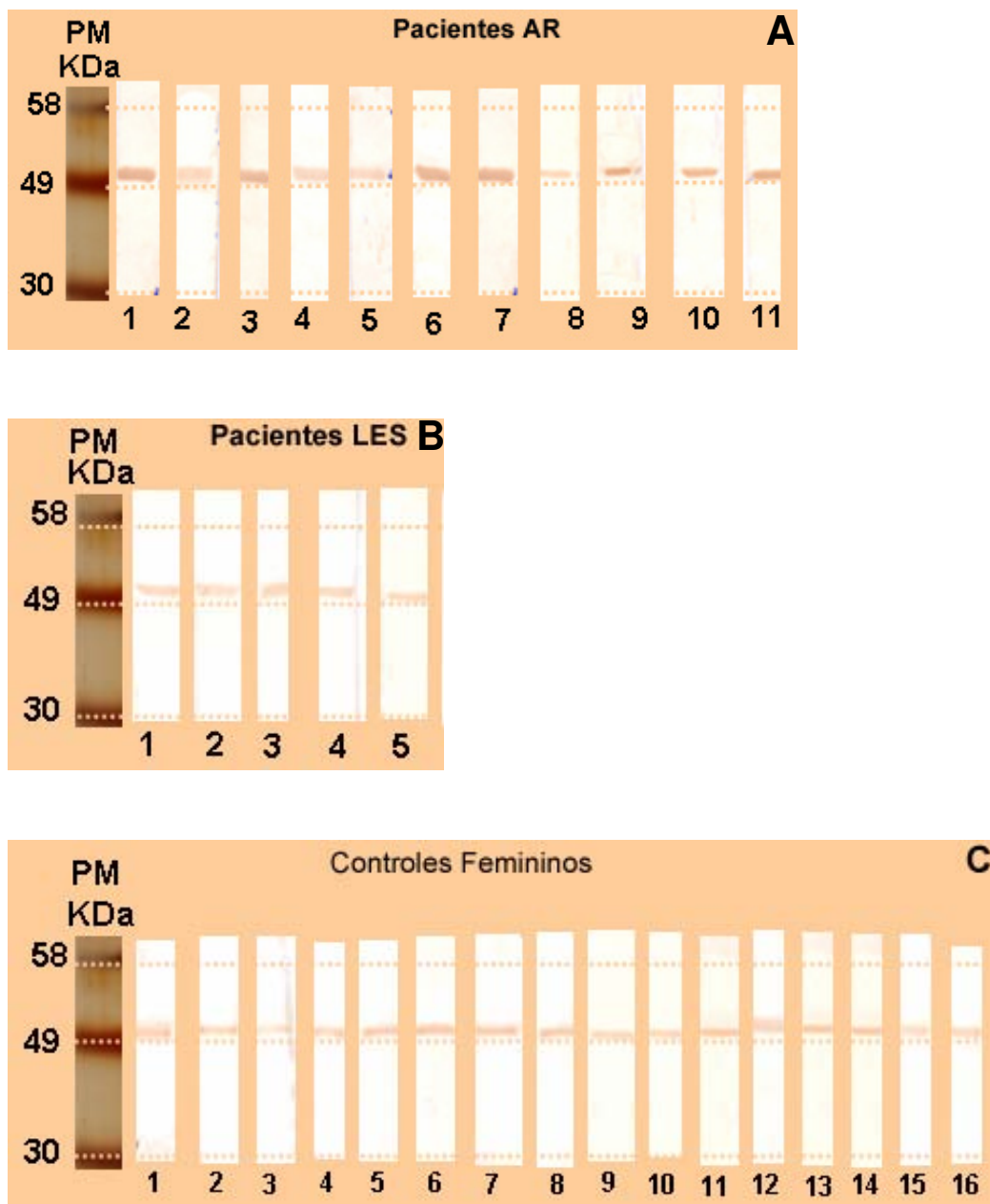


Figura 2. Soros reagentes para anticorpos IgG anti-rMAM detectados pela reação de *Western blotting*: amostras séricas de pacientes com Artrite Reumatóide (AR), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e de indivíduos controles femininos. Os soros ($D = 1/100$) de pacientes ou controles femininos foram avaliados pela reação *Western Blotting*, sendo aqui apresentados os resultados de todos os soros reagentes com o superantígeno rMAM. Em **A**: soros de pacientes com AR ($n = 11$); **B**: soros de pacientes LES ($n = 5$); **C**: soros de indivíduos controles ($n = 16$).

4.2 Anticorpos IgG séricos de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) reagentes com LAMPs de *M. hominis* ou *M. fermentans*

As preparações das LAMPs extraídas de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições redutoras, sendo demonstrado um predomínio de LAMPs de massas moleculares entre 49 e 102 KDa nas preparações de *M. hominis* PG21 e de massas moleculares entre 30 e 58 KDa nas preparações de *M. fermentans* (Fig. 3). Pelo menos 23 LAMPs foram detectadas nas preparações de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18 (Fig. 3).

A reatividade dos anticorpos IgG de soros de indivíduos saudáveis ou portadores de AR ou LES para LAMPs de *M. hominis* e *M. fermentans* foi analisada pela técnica de *Western blotting*. A Figura 4 mostra os resultados representativos de soros de pacientes com AR, LES e controles, reagentes com LAMPs de *M. hominis* (Fig. 4A) e *M. fermentans* (Fig. 4B). Posteriormente, todos os resultados dos soros testados para as LAMPs destas espécies de micoplasmas foram representados em diagramas, os quais mostram os perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG encontrados nas amostras de pacientes e controles, avaliados frente aos antígenos (LAMPs) de *M. hominis* PG21 (Fig. 5 e Fig. 6) e *M. fermentans* PG18 (Fig. 7 e Fig. 8).

Adotando como critério de reatividade do soro a reação dos anticorpos IgG com pelo menos uma LAMP (máximo de sensibilidade), o teste de *Western blotting* mostrou que para LAMPs de *M. hominis* PG21, houve maior frequência de soros reativos (AR 100% vs controles 97,15%, n = 35; LES 95,65% vs controles 91,30%, n = 23) do que para as LAMPs de *M. fermentans* PG18 (AR 94,30% vs controles 94,30%, n = 35; LES 82,60% vs controles 86,95%, n= 23). Não foram atestadas diferenças significantes entre as frequências de soros reagentes nos diferentes grupos.

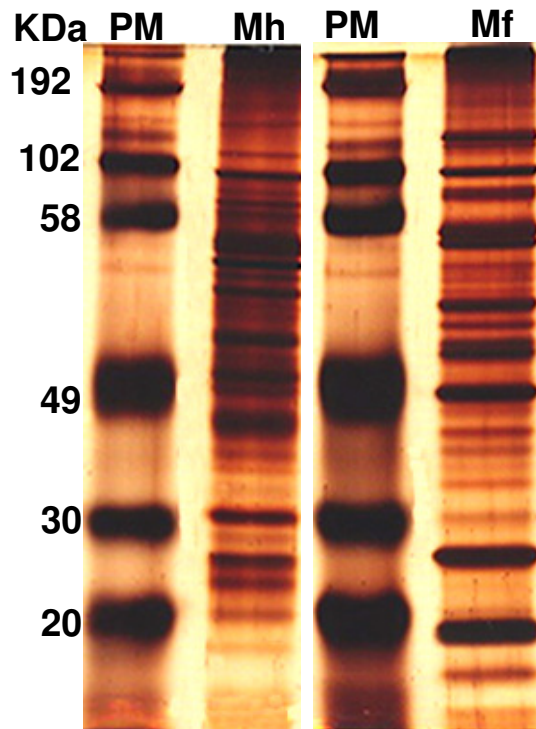


Figura 3. Perfil eletroforético das LAMPs dos micoplasmas. LAMPs de *M. hominis* PG21 (1,5 µg/canaleta, **Mh**) e *M. fermentans* PG18 (2,0 µg/canaleta, **Mf**) foram extraídas com detergente Triton X-114. Em seguida, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições redutoras, sendo o gel impregnado pelo nitrato de prata. São apresentados também os padrões proteicos de massas moleculares conhecidas, em KDa (**PM**).

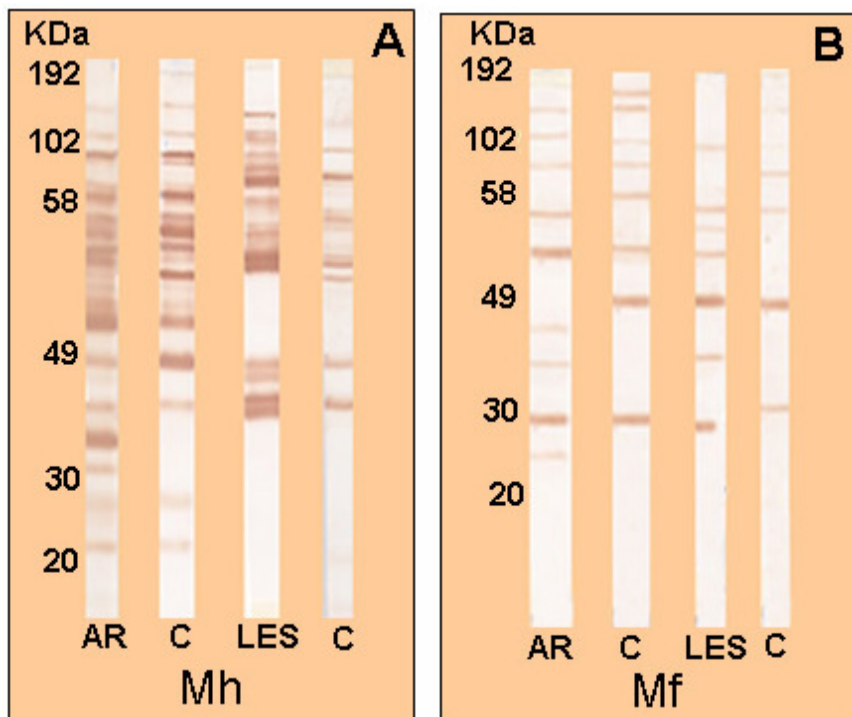


Figura 4. Resultados representativos de soros reagentes com LAMPs de micoplasmas. Os soros de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e de indivíduos controles (C) foram avaliados para reatividade com LAMPs de *M. hominis* PG21 (soros diluídos a 1/100, **Mh**, **A**) e de *M. fermentans* PG18 (soros diluídos a 1/20, **Mf**, **B**).

Apesar de não haver diferença nas freqüências de soros reagentes entre os diferentes grupos avaliados, considerando o critério máximo de sensibilidade descrito acima (≥ 1 LAMP reconhecida), os soros dos pacientes com AR continham anticorpos IgG reagentes com um maior número de LAMPs de *M. hominis* PG21 do que os soros controles (AR 11 ± 4 vs controles 7 ± 3 , $n = 35$; $p < 0,05$, Figura 10A). Embora alguns soros de pacientes com LES reconhecessem um elevado número de LAMPs (> 10 LAMPs), não houve diferença significativa entre pacientes e controles (8 ± 4 vs 6 ± 3 , Fig. 9B).

Um maior número de LAMPs de *M. fermentans* PG18 foi reconhecido por anticorpos IgG dos soros de pacientes com AR do que por soros dos indivíduos do grupo controle (AR 4 ± 2 vs controles 3 ± 2 , $n = 35$; $p < 0,05$, Fig. 10A). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com os soros dos pacientes com LES e dos controles (2 ± 2 vs 2 ± 1 , Fig. 10B).

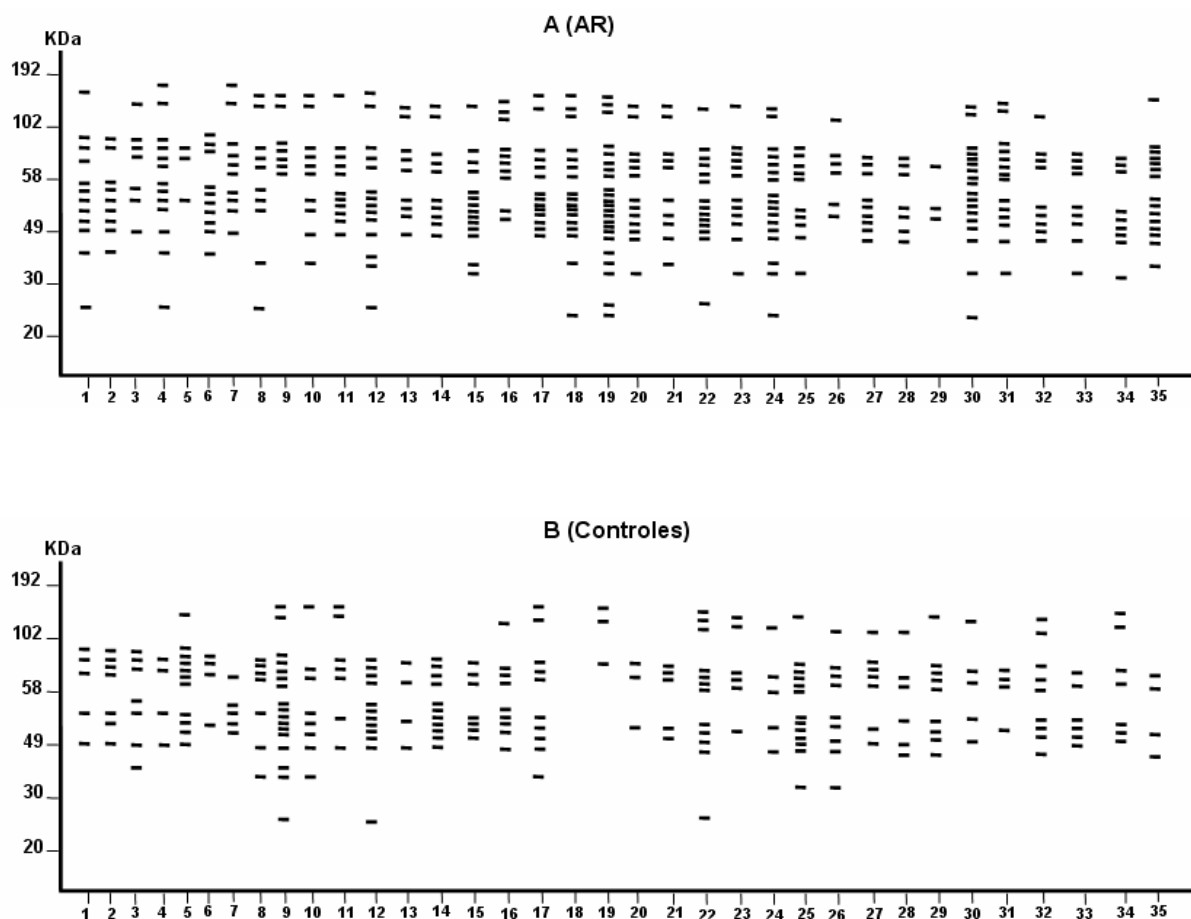


Figura 5. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Artrite reumatóide (AR) e do grupo Controle (Controles) com LAMPs de *M. hominis* PG21. Soros de pacientes e controles foram submetidos à técnica de *Western blotting* para detecção de anticorpos IgG anti-LAMPs. Após o desenvolvimento da reação, as imagens das fitas foram capturadas e cada LAMP identificada por anticorpo foi marcada. Em **A**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG de pacientes (AR, n = 35); **B**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG dos controles (Controles, n = 35); em ambos os grupos os indivíduos são do sexo feminino, faixa etária variando de 40 a 70 anos de idade.

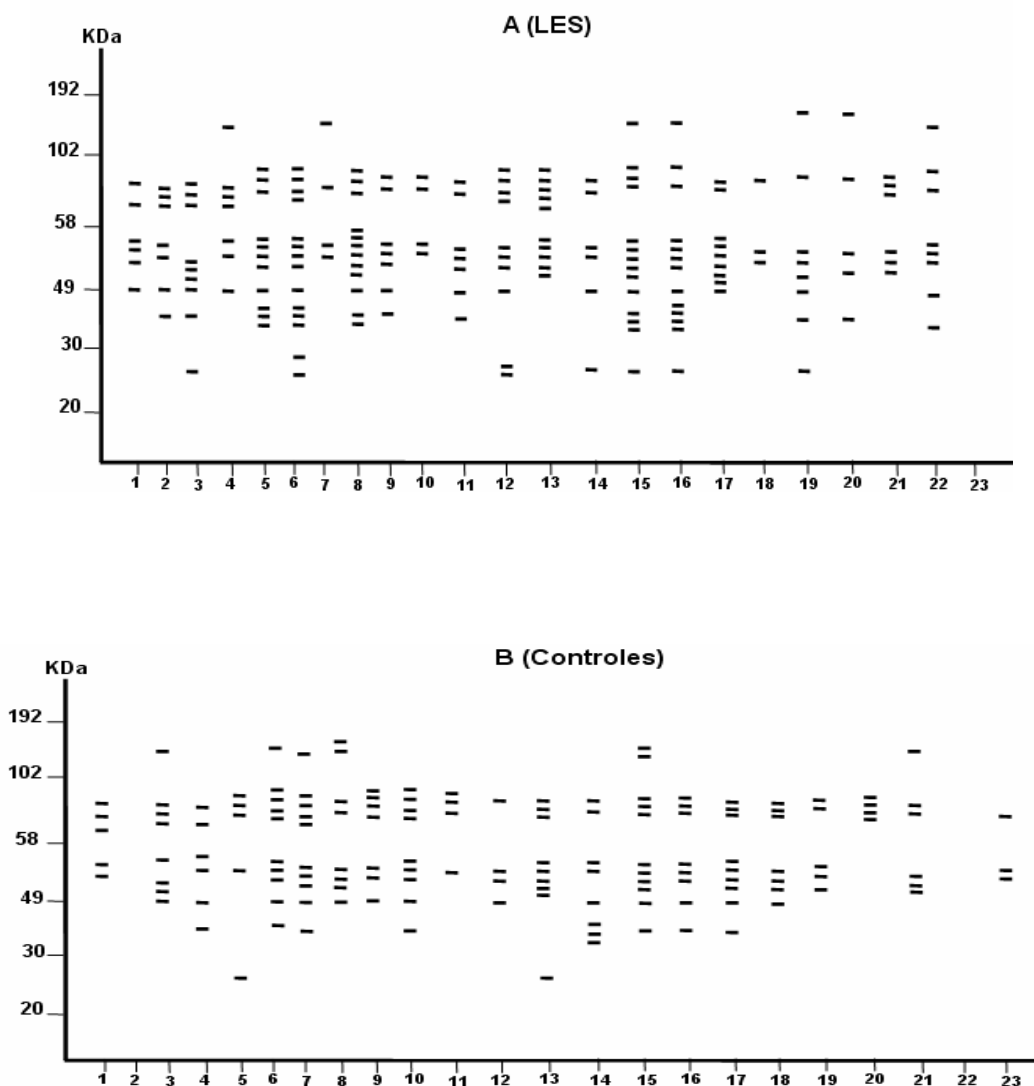


Figura 6. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de *M. hominis* PG21. Soros de pacientes e controles foram submetidos à técnica de *Western blotting* para detecção de anticorpos IgG anti-LAMPs. Após o desenvolvimento da reação, as imagens das fitas foram capturadas e cada LAMP identificada por anticorpo foi marcada. Em **A**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG de pacientes (LES, n = 23); **B**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG dos controles (Controles, n = 23); em ambos os grupos os indivíduos são do sexo feminino e faixa etária variando de 25 a 45 anos de idade.

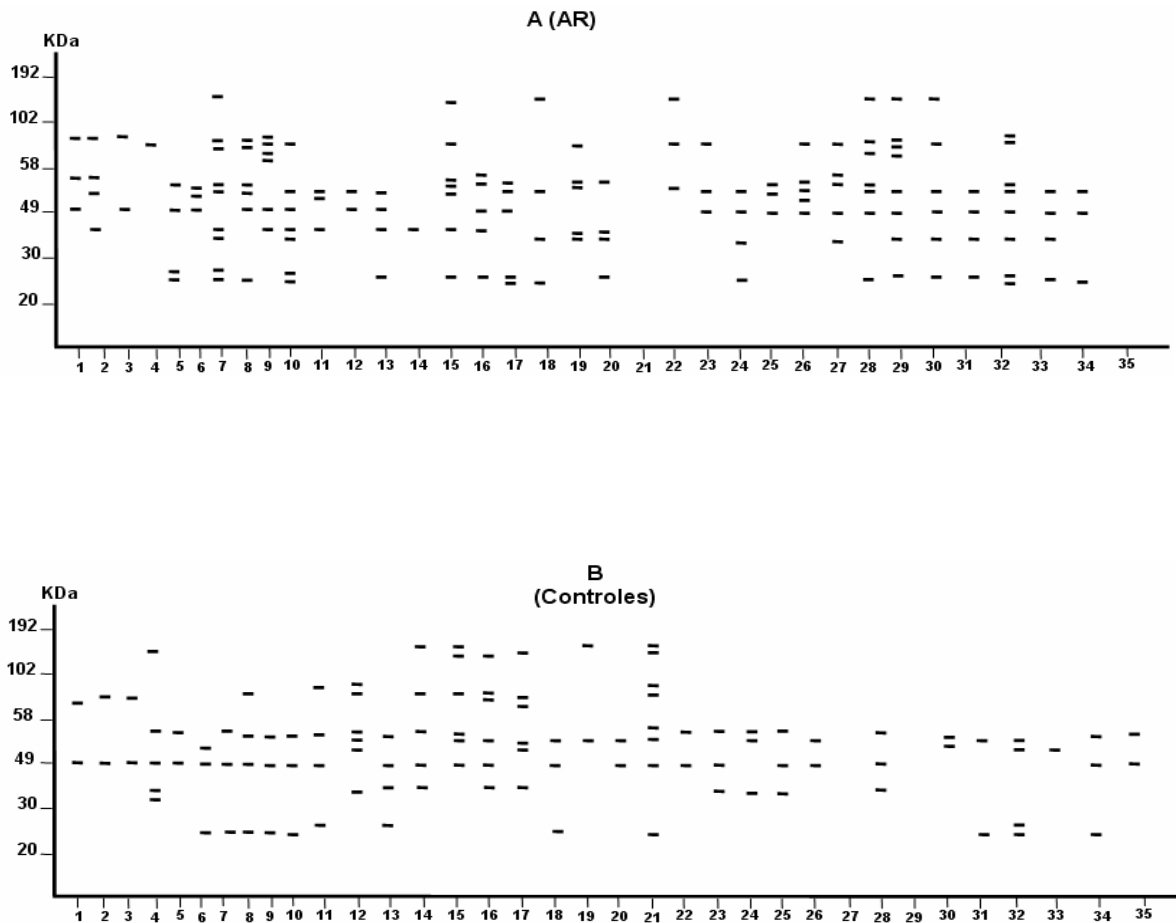


Figura 7. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Artrite reumatóide (AR) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de *M. fermentans* PG18. Soros de pacientes e controles foram submetidos à técnica de *Western blotting* para detecção de anticorpos IgG anti-LAMPs. Após a realização dos testes, as imagens das fitas foram capturadas e cada LAMP identificada por anticorpo foi marcada. Em **A**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG séricos de pacientes (AR, n = 35); **B**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG séricos dos controles (Controles, n = 35); em ambos os grupos os indivíduos são do sexo feminino e faixa etária de variando de 40 a 70 anos de idade.

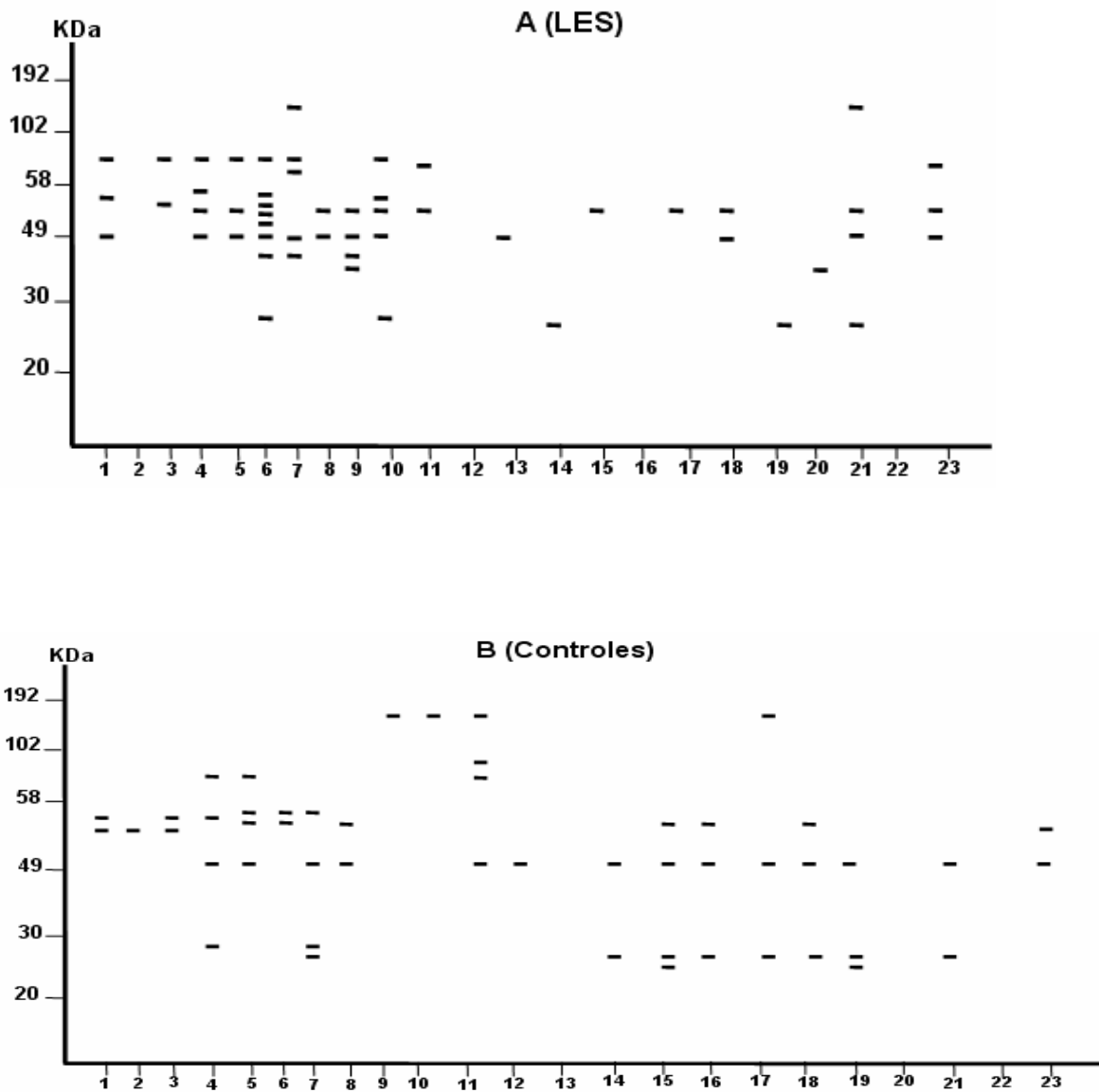


Figura 8. Diagramas representativos dos perfis séricos de reatividade dos anticorpos IgG de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) e do grupo controle (Controles) com LAMPs de *M. fermentans* PG18. Soros de pacientes e controles foram submetidos à técnica de *Western blotting* para detecção de anticorpos IgG anti-LAMPs. Após realização dos testes, as imagens das fitas foram capturadas e cada LAMP identificada por anticorpo foi marcada..Em **A**, LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG de pacientes (LES, n = 23); **B**, anticorpos IgG dos controles (Controles, n = 23); em ambos os grupos os indivíduos eram do sexo feminino e faixa etária de variando de 25 a 45 anos de idade.

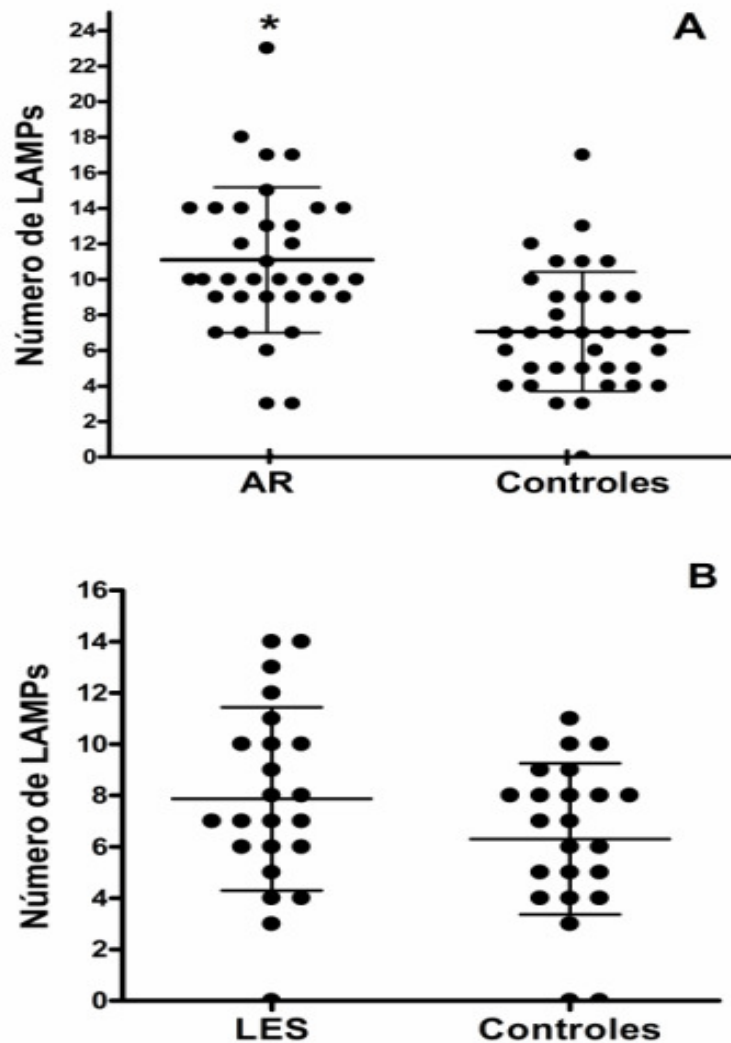


Figura 9. Anticorpos IgG séricos de pacientes com Artrite reumatóide (AR) ou Lúpus eritematoso sistêmico (LES) reconhecem várias LAMPs de *M. hominis* PG21. Após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, as LAMPs foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e foi realizado o *Western blotting* para detecção dos anticorpos. A quantidade de LAMPs reconhecidas pelos anticorpos foi determinada para cada indivíduo avaliado. Em **A**, as amostras séricas de pacientes com AR (n = 35) e indivíduos controles (n = 35). Em **B**, as amostras séricas de pacientes com LES (n = 23) e indivíduos controles (n = 23). Os dados representam as amostras individualmente testadas em cada grupo, sendo apresentadas as médias e os desvios padrões (linhas horizontais). *p < 0,05, Teste t de Student (AR vs Controles).

Baseado na média \pm desvio padrão do número de LAMPs identificadas pelos soros de pacientes com AR, os soros foram classificados em: reator forte, médio ou fraco. Assim, 23 em 35 (65,7%) pacientes com AR podem ser considerados reatores fortes para *M. hominis* PG21, enquanto apenas sete em 35 (20,0%) soros de controles são reatores fortes para esta espécie de micoplasma ($p < 0,05$, Fig. 10A, Tabela 3). Dez em 35 pacientes com AR seriam considerados reatores médios (28,5%) e apenas dois (5,7%, $n = 35$) seriam reatores fracos com LAMPs de *M. hominis* PG21. Nos indivíduos do grupo controle, 20 em 35 indivíduos (57,2%) seriam reatores médios e 22,8% (8/35) seriam reatores fracos para as LAMPs de *M. hominis* PG21 (Fig. 10A, Tabela 3).

Considerando que o grupo controle (dos pacientes com AR) apresentou uma média de 7 LAMPs de *M. hominis* PG21 reconhecidas pelos anticorpos IgG séricos, pode ser adotado que os soros com reatividade ≥ 10 LAMPs (bandas) são reatores fortes, os que reagem com um total de quatro a nove LAMPs possuem média reatividade (baseado no desvio padrão da média) e os que reagem com menos de quatro LAMPs são reatores fracos.

As amostras séricas do grupo controle (de pacientes com AR) reconheceram uma média de 3 LAMPs de *M. fermentans* PG18, adotando o mesmo critério acima, seriam considerados reatores fortes os soros que reconhecessem ≥ 5 LAMPs, o que correspondeu a 20% dos soros (7/35) controles testados. Os soros que reconhecessem entre duas a quatro LAMPs seriam reatores médios, correspondendo a 71,5% (25/35) dos soros controles; enquanto os soros que reconhecessem menos de duas LAMPs (1 ou 0) seriam reatores fracos, sendo estes 8,5% (3/35) dos soros avaliados. Por estes critérios, 40% (14/35) dos soros dos pacientes com AR foram reatores fortes, 48,5% (17/35) eram reatores médios e 11,5% (4/35), reatores fracos (Fig. 11A, Tabela 3). Nos pacientes com LES e seus controles, não foi demonstrada diferença entre número de LAMPs reconhecidas tanto de *M. hominis* quanto de *M. fermentans*, não sendo aplicados os critérios de reatividade acima descritos.

Após determinar que havia um maior número de LAMPs reconhecidas por anticorpos IgG dos soros dos pacientes com AR, foi realizada uma análise para determinar quais LAMPs eram preferencialmente detectadas pelos anticorpos. Como demonstra a Tabela 4, foi observada uma maior freqüência de soros de pacientes com AR ou LES e dos grupos controles reconhecendo LAMPs de *M.*

hominis PG21 ou de *M. fermentans* PG18 de massas moleculares entre 49 e 102 KDa e entre 49 e 58 KDa, respectivamente. As diferenças entre as frequências de soros reagentes de pacientes com AR e controles, no entanto, foram demonstradas para o reconhecimento das LAMPs de *M. hominis* PG21 com massas moleculares mais baixas, abaixo de 49 e maior ou igual a 20 KDa ($p < 0,05$, Tabela 4). Este resultado é também facilmente observado nos diagramas da Figura 6. Por outro lado, os soros de pacientes com AR reconheceram mais frequentemente as LAMPs de *M. fermentans* PG18 de massas moleculares entre 58 e 102 KDa ($p < 0,05$, Tabela 4). Estas diferenças podem ser visualizadas nos diagramas da Figura 8. Não foi detectada diferença significativa entre as frequências de soros de pacientes com LES ou controles com LAMPs distribuídas por faixas de massas moleculares (Tabela 4).

A LAMP com massa molecular de ≈ 49 KDa das duas espécies de micoplasma avaliadas foi detectada em alta frequência pelos anticorpos dos soros tanto de pacientes quanto de controles (*M. hominis*: AR vs Controles = 82,8% vs 62,8%; LES 69,6% vs Controles = 56,5%; e *M. fermentans*: AR vs Controles = 65,7% vs 65,7%; LES vs Controles = 56,5% vs 60,8%; AR/Controles $n = 35$ e LES/Controles $n = 23$).

Tabela 3. Reatividade dos soros classificada de acordo com o número de LAMPs de *M. hominis* e *M. fermentans* identificadas^a.

Grupos	Reatividade n (%)		
	Forte	Média	Fraca
<i>M. hominis</i> PG21			
AR	23* (65,7%)	10 (28,6%)	2 (5,7%)
Controles	7 (20%)	20* (57,2%)	8* (22,8%)
<i>M. fermentans</i> PG18			
AR	14 (40%)	17 (48,5%)	4 (11,5%)
Controles	7 (20%)	25 (71,5%)	3 (8,5%)

^aAnticorpos IgG séricos de pacientes com AR e indivíduos controles reagentes com LAMPs de *M. hominis* PG21 ou *M. fermentans* PG18 são representados segundo o número de LAMPs que reagiram em três grupos: reatores forte, médio ou fracos. * $p < 0,05$, Teste χ^2 ($n = 35$, AR e Controles). Critério de classificação baseado na Média de reatividade dos soros com LAMPs + Desvio Padrão. *M. hominis*: Forte ≥ 10 , Média 4 – 9 e Fraca < 4 LAMPs.

M. fermentans: Forte ≥ 5 , Média 2 – 4, Fraca < 2 LAMPs.

Tabela 4. Frequências dos soros contendo anticorpos IgG reagentes com LAMPs de micoplasmas: distribuição por faixa de massa molecular das LAMPs^a.

Massa molecular (KDa)	Número de soros reagentes (%)			
	AR ^b	Controles ^c	LES ^d	Controles ^e
<i>M. hominis</i> PG21				
≤ 192 e ≥ 102	26 (74,3%) ^f	18 (51,4%)	06 (26,1%)	07 (30,4%)
< 102 e ≥ 58	35 (100,0%)	34 (97,1%)	22 (95,6%)	21 (91,3%)
< 58 e ≥ 49	34 (97,1%)	33 (94,3%)	22 (95,6%)	20 (87,0%)
49	29 (82,8%)	22 (62,8%)	16 (69,6%)	13 (56,5%)
< 49 e ≥ 30	20 (57,1%)* ¹	07 (20,0%)	12 (52,2%)	07 (30,4%)
< 30 e ≥ 20	09 (25,7%)* ²	02 (5,7%)	08 (34,8%)	02 (8,7%)
<i>M. fermentans</i> PG18				
≤ 192 e ≥ 102	07 (20%)	07 (20%)	02 (8,6%)	04 (17,3%)
< 102 e ≥ 58	18 (51,4%)*	08 (22,8%)	09 (39,1%)	03 (13,0%)
< 58 e ≥ 49	31 (88,5%)	33 (94,2%)	16 (69,5%)	18 (78,2%)
49	23 (65,7%)	23 (65,7%)	13 (56,5%)	14 (60,8%)
< 49 e ≥ 30	19 (54,2%)	12 (34,2%)	03 (13,0%)	0 (0,0%)
< 30 e ≥ 20	18 (51,4%)	13 (37,1%)	07 (30,4%)	09 (39,1%)

^aA presença de anticorpos IgG anti-LAMPs de *M. hominis* PG21 ou *M. fermentans* PG18 foi avaliada pelo método de Western blotting. Foram avaliados soros de pacientes com ^bAR (Artrite reumatóide, n = 35), ^cControles do grupo AR (n = 35), pacientes com ^dLES (Lúpus eritematoso sistêmico, n = 23) e ^eControles do grupo LES (n = 23). Todos os indivíduos (pacientes e controles) eram do sexo feminino pareados por faixa etária. Foi avaliado um total de 116 amostras séricas, sendo apresentados os números absolutos e as ^ffreqüências (%) de soros reagentes com as LAMPs, distribuídas por faixas de massas moleculares. *p < 0,05, *¹AR (39,3 – 73,7%) vs Controles (8,4 – 36,9%) para *M. hominis* PG21, *²p < 0,05 AR (12,5 – 43,2%) vs Controles (0,7 – 19,1%) para *M. hominis* PG21, *p < 0,05 AR (33,9 – 68,6%) vs Controles (10,4 – 40,1%) para *M. fermentans* PG18, (IC 95%) e Teste χ^2 .

5. Discussão

Neste estudo foi padronizado o ensaio de *Western blotting* para detectar anticorpos IgG séricos anti-superantígeno rMAM e anti-LAMPs extraídas de duas cepas de micoplasma (*M. hominis* PG21 e *M. fermentans* PG18), sendo realizados testes com os soros de pacientes portadores de AR ou LES e em indivíduos controles, frente a estes antígenos de micoplasmas.

A seleção de pacientes com AR ou LES do sexo feminino foi baseada na maior incidência destas doenças reumáticas autoimunes neste sexo (LES 9 mulheres:1 homem e AR 3:1) e nas faixas etárias mais prevalentes (AR: 40 – 70 anos; LES: 25 – 45 anos). Foram incluídos pacientes reumáticos apresentando a doença no estado inativo (remissão) e sob tratamento medicamentoso com baixas doses de corticosteróides (prednisona). Todos os pacientes com AR ou LES incluídos no estudo usavam doses de prednisona menores ou iguais a 10 mg/dia. Nenhum dos pacientes incluídos no estudo fazia uso de imunobiológicos, tais como bloqueadores de TNF ou similares. De acordo com Collins et al. (1980), Barnes et al. (1998) e Morand (2007) os corticosteróides apresentam efeito imunossupressor, inibindo a ativação e atividade efetora dos linfócitos, diminuindo a expansão clonal de linfócitos, a produção de anticorpos e aumentando a apoptose destas células, provocando, geralmente, uma linfopenia. Doses altas de prednisona (> 30 mg/dia) podem inibir ou reduzir a produção de anticorpos plasmáticos devido à inativação ou deleção de clones de linfócitos B, o que poderia interferir nos resultados quanto à reatividade sérica das amostras dos pacientes às LAMPs extraídas de *M. hominis* ou de *M. fermentans* e até mesmo ao superantígeno rMAM (Anti et al. 2008).

Este é o segundo trabalho, até o momento, avaliando a reatividade de amostras séricas de pacientes reumáticos com AR ou LES com o superantígeno rMAM. O primeiro trabalho foi realizado nos Estados Unidos por Sawitzke et al. (2000). Os resultados do presente trabalho mostram uma tendência de maior frequência de soros reagentes com rMAM no grupo de pacientes com AR (~28%) em relação ao grupo de controles (~19%), não havendo, no entanto, diferença estatisticamente significativa. Para pacientes com LES, a frequência de soros reagentes foi similar àquela encontrada nos controles saudáveis

(~20%). O estudo de Sawitzke et al. (2000) demonstrou uma elevada reatividade de soros ao rMAM em um grupo de pacientes com AR, em relação aquelas obtidas em grupos com outras doenças reumáticas estudadas (LES, Espondilite Anquilosante, Síndrome de Reiter's, Artrite Psoriática) e controles saudáveis. Naquele estudo, o ensaio imunoenzimático (ELISA) foi escolhido, teste com alta sensibilidade analítica, o que pode ter levado a obtenção de um maior número de soros reagentes, tendo em vista que a técnica de *Western blotting*, usada no presente estudo, é mais específica do que o ELISA. Foi observado que a reatividade dos soros de pacientes com AR é mais forte do que aquela dos soros dos indivíduos controles (maior intensidade da banda do rMAM detectada), sugerindo uma maior concentração de anticorpos nas amostras dos pacientes. Um ELISA poderia ser usado para quantificar os anticorpos IgG nos soros dos indivíduos reatores, a fim de observar se há alguma diferença quantitativa mais do que qualitativa entre as reatividades dos soros de pacientes com AR e controles ao superantígeno MAM.

Há evidências de que o MAM ou moléculas estruturalmente similares a ele, as quais compartilham epítopos antigênicos comuns, possam iniciar e/ou exacerbar doenças autoimunes, como por exemplo, a AR. A detecção de anticorpos séricos anti-MAM em pacientes com AR é uma evidência da exposição destes pacientes ao MAM. A presença do SAg MAM em indivíduos que tenham linfócitos T apresentando TCR V β específicos e APCs expressando moléculas de MHC da classe II apresentando regiões capazes de interagir com o MAM, pode propiciar um ambiente adequado para a ativação de linfócitos, incluindo clones de linfócitos autorreativos, e de APCs, o que pode causar ou exacerbar a AR ou o LES. O SAg MAM pode contribuir para aumentar o processo de inflamação crônica e destruição da cartilagem e do osso na AR, devido ao seu potencial de ativar células imunológicas de maneira específica ou não-específica, as quais formam infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial da articulação afetada (Sawitzke et al. 2000; Mu et al. 2000; Cole et al. 2005). Como o MAM é um SAg de *M. arthritidis*, que causa artrite em roedores, mais estudos são necessários para identificar se é o MAM ou moléculas relacionadas a ele que induzem a produção de anticorpos nos seres humanos.

Na presente pesquisa também foi avaliada a frequência de soros reagentes de pacientes com AR ou LES e em indivíduos saudáveis com LAMPs

de *M. hominis* PG21 ou de *M. fermentans* PG18. Para isto, inicialmente foram extraídas e purificadas as LAMPs de duas espécies de micoplasmas e avaliado o perfil de proteínas obtidas por SDS-PAGE. Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos obtidos por Stadtlander et al. (1991); Wise et al. (1993) e Kostyal et al. (1994), o quais demonstraram um total de 21 LAMPs no extrato de *M. fermentans* PG18, com massas moleculares variando de 30 a 102 KDa, com predomínio de LAMPs de massas moleculares entre 41 e 102 KDa. O extrato de LAMPs desta cepa de micoplasma, obtido no presente estudo, usando a técnica de partição de fase com detergente Triton X-114 (Wise et al. 1987), demonstrou um total de pelo menos 23 LAMPs, predominando LAMPs com massas moleculares entre 49 e 102 KDa, demonstrando que a realização da técnica de extração de LAMPs foi bastante eficiente, no sentido de obter significativa quantidade de LAMPs com variadas massas moleculares. O perfil do extrato das LAMPs, em gel de poliacrilamida a 10%, obtido de *M. hominis* PG21 demonstrou a presença de 23 LAMPs de massas moleculares variadas, predominando LAMPs de massas moleculares entre 49 a 192 KDa, sendo compatível com o perfil de LAMPs de *M. hominis* PG21 demonstrado no trabalho de Lo et al. (2003).

Após a determinação do perfil eletroforético das LAMPs extraídas dos dois isolados de micoplasmas, foi padronizado o ensaio de *Western blotting* para avaliar a reatividade dos soros de pacientes com AR ou LES e dos grupos controles. Considerando como critério máximo de sensibilidade a detecção de uma única LAMP reativa com anticorpos séricos dos pacientes e controles, uma elevada frequência de soros reagentes foi detectada (> 82% dos soros) nos quatro grupos avaliados: AR e Controles, LES e Controles. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências de soros reagentes nos diferentes grupos com os antígenos avaliados, porém, pode ser observada uma menor frequência de soros reagentes no grupo LES com as LAMPs de *M. fermentans* PG18 do que com as LAMPs de *M. hominis* PG21 (82,60% vs 95,65% controles). Os resultados são compatíveis com a freqüente exposição da população humana a estas espécies de micoplasmas, que fazem parte da microbiota humana, e demonstram também que as LAMPs de micoplasmas são altamente imunogênicas, como anteriormente descrito (Koch et al. 1997; Horowitz et al. 2000; Rottem et al. 2003; Kawahito et al. 2008).

Em ensaios imunoenzimáticos (ELISA), uma elevada frequência de soros de indivíduos saudáveis reagentes com antígenos de micoplasmas determina um alto limiar de reatividade (*cut-off*), a fim de separar indivíduos saudáveis de indivíduos doentes (Lo et al. 2003). No presente estudo, apesar de não ter sido detectada diferença significativa entre as frequências de soros reagentes de pacientes e controles, o número de LAMPs detectadas pelos soros dos pacientes com AR foi significativamente maior do que o detectado por soros dos controles, sugerindo uma maior imunogenicidade das LAMPs nos pacientes ou até mesmo por que estes sejam mais infectados por micoplasmas.

Utilizando ELISA, Lo et al. (2003) mostraram uma alta frequência de soros reagentes com LAMPs de *M. hominis* GTU83 em doadores saudáveis (de 30,1 a 38,8%). Os autores referiram que os anticorpos séricos são altamente específicos para LAMPs de diferentes espécies de micoplasmas e que apesar da variação antigênica das LAMPs de uma mesma espécie de micoplasma, os perfis antigênicos das LAMPs de diferentes cepas ou isolados de *M. hominis* são similares, embora uma variabilidade na imunorreatividade dos soros de diferentes indivíduos fosse detectada. Assim, LAMPs de cepas ou isolados distintos podem ser utilizados em inquéritos epidemiológicos. No presente trabalho, diferentes perfis de soro-reatividade com as LAMPs de *M. hominis* PG21 foram obtidos, similarmente ao obtido por Lo et al. (2003). Apesar das pequenas variações técnicas nas extrações das lipoproteínas descritas em outros trabalhos, o perfil lipoprotéico encontrado no presente trabalho foi similar àqueles anteriormente obtidos para LAMPs de *M. hominis* e *M. fermentans* PG18 (Liepmann et al. 1991; Hoffman et al. 1997; Lo et al. 2003). Neste trabalho, os mesmos soros foram avaliados contra LAMPs de *M. hominis* e de *M. fermentans*, sendo encontrado um maior número de LAMPs da cepa de *M. hominis* PG21 do que da cepa de *M. fermentans* PG18 reagentes com os anticorpos séricos. Além disto, os anticorpos de uma amostra de líquido sinovial contendo anticorpos anti-LAMPs de *M. hominis* PG21, usado como controle positivo nas reações, não reagiu cruzadamente com LAMPs de *M. fermentans* PG18 (dados não mostrados). Estes dados indicam a especificidade nas interações entre anticorpos anti-LAMPs de *M. hominis* e de *M. fermentans*.

Uma alta frequência de anticorpos anti-*M. hominis* PG21 e anti-*M. fermentans* PG18, detectada por meio de *Western blotting*, foi também descrita

por Hoffman et al. (1997) em pacientes com diferentes artrites, especialmente no fluido sinovial. Os autores demonstraram a presença de anticorpos IgG anti-LAMPs de *M. hominis* em pacientes com AR (~21%), porém as frequências foram mais elevadas em pacientes com AR Juvenil (ARJ, 88% para *M. hominis* e 90% para *M. fermentans*) e osteoartrite (OA, 90% para *M. hominis* e 50% para *M. fermentans*). Os autores confirmaram a infecção pelos micoplasmas, nos pacientes, usando anticorpos monoclonais específicos para o extrato de LAMPs de cada espécie estudada (*M. hominis* ou de *M. fermentans*) e por meio da análise do líquido sinovial quanto à presença de DNA de *M. hominis* ou de *M. fermentans*, usando a PCR. A detecção de anticorpos anti-*M. hominis* e anti-*M. fermentans* PG18, por estes autores, foi menos freqüente nos pacientes com AR (55% e 15%, respectivamente) e nenhuma diferença pode ser observada entre os perfis de reatividade dos anticorpos anti-LAMPs das duas espécies de micoplasma, nos diferentes grupos de pacientes avaliados (AR, ARJ, OA e outras artropatias). Na presente pesquisa, apenas a reatividade de anticorpos IgG presentes no soro foi avaliada e a mais alta freqüência de reatividade das amostras encontrada talvez reflita o fato de que os anticorpos sejam mais freqüentes no soro do que no fluido sinovial dos pacientes devido a infecções sistêmicas, por micoplasmas, ou infecções por estas bactérias em sítios distintos da cavidade articular. Com relação a mais elevada reatividade dos soros dos pacientes com AR com LAMPs de *M. hominis*, isto reforça os dados obtidos no presente trabalho e naquele de Hoffman et al. (1997).

Liepmann et al. (1991) verificaram, por meio da técnica de *Western blotting*, alta reatividade de anticorpos IgG do soro de mulheres, com cultura de secreção vaginal positiva para *M. hominis* PG21, com as LAMPs extraídas deste micoplasma, com predomínio de reação dos anticorpos IgG com LAMPs apresentando massas moleculares entre 102 e 116 KDa. Um resultado similar foi observado no presente trabalho, pois uma alta freqüência de soros de pacientes com AR e controles (AR 74,30% vs Controles 51,45%) reagentes com LAMPs com massa molecular acima de 102 KDa foi detectada. É relevante ressaltar que, no presente estudo, LAMPs desta espécie de micoplasma, apresentando massas moleculares entre 58 e 102 KDa foram reconhecidas numa freqüência ainda mais elevada pelos soros de pacientes com AR e controles (AR 100% vs Controles 97,15%) em relação às LAMPs de maiores massas moleculares (102

a 116 KDa). O mesmo foi observado em relação a reatividade das amostras obtidas de pacientes portadores de LES e o grupo controle dentro deste intervalo de massa molecular para LAMPs entre 58 e 102 KDa (LES 95,6% vs Controles 91,3%). Estudo realizado por Ladefoged et al. (1988) demonstrou alta freqüência de soros de pacientes dinamarqueses expostos a infecção por *M. hominis* PG21 reagentes com LAMP de massa molecular de 98 KDa.

O maior número de LAMPs extraídas das duas espécies de micoplasmas utilizadas neste estudo, reagindo com os anticorpos IgG séricos dos pacientes com AR, sugere a possibilidade de que componentes celulares do sistema imune dos pacientes com AR podem ser significativamente mais ativados pelas LAMPs, induzindo a uma resposta imune específica humoral mais expressiva nestes pacientes.

Neste trabalho, foi observada uma alta freqüência de anticorpos IgG para LAMPs de *M. hominis* PG21 ou de *M. fermentans* PG18 com massa molecular de aproximadamente 49 KDa nos soros dos pacientes com AR ou LES e nos grupos controles. O dado demonstra que esta LAMP (~49 KDa) é um excelente alvo da imunidade específica humoral, sendo significativamente imunogênica, induzindo produção de anticorpos IgG específicos, a partir do estímulo antigênico por diferentes espécies de micoplasmas (*M. hominis* ou *M. fermentans*). Kostyal et al. (1994) avaliaram o papel imunogênico desta LAMP (~49 KDa), obtida de *M. fermentans*, na ativação de monócitos humanos, obtendo-se grande quantidade de TNF- α no sobrenadante da cultura de células mononucleares do sangue periférico humano, após estímulo destas células com a LAMP. No entanto, a LAMP de ~49 KDa não induz resposta imune seletiva em pacientes com AR ou LES, não constituindo um antígeno especificamente relacionado com as respostas imunes humorais nestes pacientes.

Horowitz et al. (2000) detectaram com freqüência uma LAMP de 29 KDa (de sonicação de *M. fermentans*) reativa com anticorpos presentes no líquido sinovial de pacientes com AR. Similar resultado foi obtido por Hoffman et al. (1997), utilizando lipoproteínas de *M. fermentans* PG18. Estes autores também detectaram com maior freqüência uma LAMP de *M. hominis* de cerca de 50 KDa reativa com anticorpos de líquido sinovial de pacientes com artrites, apesar de não relatarem diferenças entre os diferentes grupos de artrites avaliadas (ARJ, OA, AR, outras). Os dados do presente trabalho coletivamente sugerem que as

LAMPs de *M. hominis* com massa molecular < 49 e ≥ 20 KDa e às de *M. fermentans* < 102 e ≥ 58 KDa, devem ser antígenos investigados para análise de reatividade cruzada entre anticorpos dirigidos para LAMPs de micoplasmas e antígenos do próprio organismo. A ativação policlonal de linfócitos B por micoplasmas pode levar ao aparecimento de anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo que reagem cruzadamente com antígenos de micoplasmas ou ainda, o mimetismo molecular pelos micoplasmas, pode gerar anticorpos anti-antígenos de micoplasmas reatores com antígenos próprios.

Existem poucos trabalhos publicados (Ribeiro-Dias et al. 1999; Machado et al. 2001; Ribeiro-Dias et al. 2003) analisando a frequência de soros ou líquido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias crônicas reagentes com LAMPs de micoplasmas em grupos de brasileiros. Machado et al. (2001) detectaram a presença de *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* na urina e secreção endocervical de pacientes brasileiras com LES, reforçando a associação entre infecção por micoplasma e LES, anteriormente descrita por Ginsburg et al. (1992). Bartholomew (1965) isolou micoplasma de pacientes com LES e outros autores norte-americanos têm descrito a identificação de micoplasmas em pacientes com AR, LES e espondiloartropatias (Schaeffer et al. 1996; Hoffman et al. 1997; Haier et al. 1999; Horowitz et al. 2000; Johnson et al., 2000; Gilroy et al. 2001; Machado 2001). A associação entre AR e infecção por micoplasma vem sendo investigada desde os anos 70 e vários trabalhos mostraram evidências desta associação, conforme abordado anteriormente. No entanto, o perfil de anticorpos séricos anti-LAMPs de micoplasmas, analisando antígenos mais frequentemente reatores com os anticorpos nas doenças reumáticas autoimunes (AR ou LES) não havia ainda sido analisado como no presente trabalho.

Conforme abordado anteriormente, os micoplasmas estão amplamente distribuídos no ambiente, em animais domésticos, roedores e outros. Isto torna muito fácil a exposição dos seres humanos aos micoplasmas. Outro fato relevante, é que as duas espécies estudadas (*M. hominis* e *M. fermentans*) fazem parte da microbiota urogenital ou respiratória humana, podendo ser considerados agentes infecciosos oportunistas, que aproveitam o estado de imunodepressão do hospedeiro para estabelecer uma infecção (Roifman et al. 1986; Lo et al. 1991a; Blanchard et al. 1997; Lutrel et al. 1994; Daxboeck et al.

2003; Phuah et al. 2007; Simard et al. 2007). De acordo com Taylor-Robinson & Bebear (1997) nem sempre ocorrem manifestações clínicas das infecções por micoplasmas, o que torna difícil o diagnóstico clínico destas infecções. O patógeno consegue escapar do ataque de mecanismos efetores imunológicos do hospedeiro, como por exemplo, por meio da variação antigênica e do mimetismo molecular (Rottem & Naot 1998), permitindo a sua proliferação e sobrevivência em tecidos do hospedeiro e o desenvolvimento de doença infecciosa crônica. Embora nem sempre a infecção por micoplasmas seja detectada, pois esta pode manter o indivíduo infectado em estado subclínico, as lesões teciduais provocadas por certas espécies de micoplasmas artritogênicos podem ocasionar exacerbação de doenças autoimunes crônico-inflamatórias degenerativas, como a AR e o LES. O diagnóstico laboratorial também é ainda complexo, pois o isolamento do patógeno em cultura requer mão-de-obra especializada e alto custo, faltam testes sorológicos imunoenzimáticos no mercado para avaliar a exposição de indivíduos suspeitos às infecções por diferentes espécies de micoplasmas e os testes de biologia molecular, existentes até o momento, requerem laboratórios especializados e profissionais capacitados para a realização dos ensaios empregando a técnica da PCR, a qual permite a detecção e amplificação do DNA de micoplasmas.

Este estudo contribuiu para reforçar as evidências da associação entre AR, LES e micoplasmas. Os resultados confirmam que as LAMPs de micoplasmas e o SAg MAM são alvos antigênicos da resposta imune específica mediada por anticorpos e indicam a possibilidade de detecção de antígenos (LAMPs) de micoplasmas mais imunogênicos (LAMPs < 49 e \geq 20 KDa de *M. hominis* PG21 e < 102 e \geq 58 KDa de *M. fermentans* PG18) que podem ser indutores de uma resposta imune humoral, podendo gerar reações cruzadas de anticorpos com antígenos próprios, o que poderia contribuir para o processo de patogênese da AR ou do LES. Os resultados desta pesquisa mostram uma maior frequência de soros de pacientes com AR reagentes ao SAg rMAM e às LAMPs das duas espécies de micoplasmas utilizadas, em relação ao grupo de indivíduos controles e ao grupo de pacientes com LES. Uma possível hipótese para explicar estes resultados, seria o envolvimento do fator genético dos pacientes com AR ou LES, nesta resposta imunológica aos micoplasmas, pois é sabido que alelos, tais como, HLA-DR1/DR4/DQ-A1/DQ-B1 estão

significativamente relacionados com a seleção e expressão de peptídeos próprios ou estranhos (LAMPs de micoplasmas) que são imunogênicos (Roudier 2000). Assim, o aumento da expressão destas moléculas (MHC de classe II) poderia induzir uma ativação mais expressiva de linfócitos e APCs, gerando uma maior produção de anticorpos anti-MAM ou anti-LAMPs, detectáveis por meio do ensaio laboratorial empregado. Vale ressaltar que podem acontecer reações cruzadas de anticorpos com produtos de micoplasmas (LAMPs ou MAM) que compartilham epítomos semelhantes na sua estrutura, isto poderia aumentar a soro-reatividade dos pacientes com AR aos antígenos das duas espécies de micoplasmas estudadas (Stuart 1993; Simecka et al. 1993; Schiffenbauer et al. 1998; Roudier et al. 2000; Sawitzke et al. 2000; Zhao et al. 2004).

6. Conclusões

- Os resultados mostram que tanto no soro de pacientes com AR ou LES quanto nos soros dos indivíduos controles são detectados anticorpos IgG anti-MAM, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as frequências de soros reagentes nestes grupos.
- O perfil eletroforético das LAMPs mostrou um predomínio de LAMPs de massas moleculares entre 49 e 102 KDa nas preparações de *M. hominis* PG21 e de massas moleculares entre 30 e 58 KDa nas preparações de *M. fermentans*, sendo detectadas pelo menos 23 LAMPs nas preparações de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18.
- Foi detectada uma alta frequência de soros reagentes com LAMPs de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18 em todos os grupos avaliados: AR, LES e Controles (> 82%); no entanto, soros de pacientes com AR reconheceram um maior número de LAMPs de *M. hominis* PG21 e de *M. fermentans* PG18. A maioria dos soros dos pacientes com AR apresentou forte reatividade com LAMPs de *M. hominis* PG21.
- As LAMPs de *M. hominis* PG21 com massas moleculares <49 e ≥ 20 KDa e de *M. fermentans* PG18 < 102 e ≥ 58 KDa foram mais frequentemente reconhecidas por anticorpos IgG de soros de pacientes com AR do que por anticorpos dos soros controles. Portanto, estas LAMPs podem ser antígenos candidatos à etiopatogenia da artrite reumatóide. Não foi atestada diferença estatisticamente significativa entre o perfil de reatividade dos soros de pacientes com LES e controles.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Referências bibliográficas de acordo com as normas de Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

1. Abdollahi-Roodsaz S, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 118(1):205-216.
2. Aletaha D., Smolen J 2005: The simplified disease activity index (SDAI) and the clinical disease activity index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 23 (39):100-108.
3. Alivernini S, Fedele AL, Cuoghi I, Tulusso B, Ferraccioli G 2008. Citrullination: the loss of tolerance and development of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Reum* 60(2): 85 -94.
4. American College of Rheumatology subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines (ACR): Guidelines for the management of rheumatoid arthritis 2002. *Arthritis Rheum* 46:328-346.
5. Anti SMA, Giorgi RDN, Chahade WH 2008. Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoids. *Einstein* 6 (1):S159-65.
6. Araújo AD & Traverso-Yépez MA 2007. Expressões e sentidos do Lupus Eritematoso Sistêmico. *Est Psic* 12(2): 119-127.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger Jr.TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, and Hunder GG, 1988. The American Rheumatism Association 1987. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum* 31: 315 – 324.
8. Avouac J, Gossec L, Dougados M 2006: Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinate antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 65, 845-851.
9. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Bardi R 2004.The involvement of HLA - DRB1*, DQA1*, DQB1* and complement C4A loci in diagnosing systemic lupus erythematosus among Tunisians. *Ann Saudi Med* 24(1):31-5.
10. Baharav E, Gur H, Fishman P, Ziporen L, Blank M, Aelion J, Kotb M,

- Shoenfeld Y 1996. Superantigens and experimental SLE induced by idiotypic dysregulation. *Clin Exp Rheumatol* 14(4):359-66.
11. Barile MF, Kapatais-Zoumbos K, Snoy P, Grabowski MW, Sneller M, Miller L, Chandler DK 1994. Experimentally induced septic arthritis in chimpanzees infected with *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Ureaplasma urealyticum*. *Clin Infect Dis* 18 (5): 694 – 703.
 12. Barnes PJ 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94:557-72.
 13. Bartholomew LE 1965. Isolation and characterization of mycoplasmas (PPLO) from patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Reiter's syndrome. *Arth Rheum* 8: 376-388.
 14. Bertolo MB, Brenol CV, Schainberg CG, Neubart F, Lima FAC, Laurindo IM, Silveira IG, Pereira IA, Loures MAR, Azevedo MN, Freitas MVC, Neto MSP, Xavier RM, Giorgi RDN, Kowalski SC, Alvarenga SM 2007. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 47(3), 151-159.
 15. Bhardwaj N, Hochtsev AS, Nisanian A, Kabak S, Friedman SM, Cole BC, Posnett DN 1994. Human T-cell responses to *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen. *Infect Immun* 62(1):135-44.
 16. Blanchard A, Montagnier L, Gougeon ML 1997. Influence of microbial infections on the progression of HIV disease. *Trends Microbiol* 5: 326-331.
 17. Blanchard, A.; Browning G 2005. Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control. *Hor Biosc*, Wymondham Norfolk, UK , 603 p.
 18. Bode U, Lorchner M, Pabst R, Wonigeit K, Overbeck S, Rink L, Hundrieser J 2007. The superantigen-induced polarization of T cells in rat peripheral lymphnodes is influenced by genetic polymorphisms in the IL-4 and IL-6 gene clusters. *Int Immunol* 19(1):81-92.
 19. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arth Rheum* 35:630-40.
 20. Bové JM 1993. Molecular features of mollicutes. *Clin Infect Dis* 17 (Suppl 1): S10-S31.
 21. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C

- 2003: Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33(1): 215-23.
22. Choy EHS and Panayi GS 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 344 (12): 907 – 915.
 23. Clyde W Jr 1985. Demonstration of multiple antigenic determinants on *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 50(1):292-6.
 24. Cole BC 1999. Mycoplasma-induced arthritis in animals: relevance to understanding the etiologies of the human rheumatic diseases. *Rev Rheum Engl Ed*. 30:66(1 Suppl): 45S-49S.
 25. Cole BC, Griffiths MM 1993. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM. *Arth Rheum* 36: 994-1002.
 26. Cole BC, Knudtson KL, Oliphant A, Sawitzke AD, Pole A, Manohar M, Benson LS, Ahmed E, Atkin CL 1996. The sequence of the *Mycoplasma arthritidis* superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. *J Exp Med* 183(3):1105-10.
 27. Cole BC, Mu HH, Pennock ND, Hasebe A, Chan FV, Washburn LR, Peltier MR 2005. Isolation and partial purification of macrophage- and dendritic cell-activating components from *Mycoplasma arthritidis*: association with organism virulence and involvement with Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 73(9):6039-47.
 28. Cole BC, Mu HH, Sawitzke AD 2000. The mycoplasma superantigen MAM: role in arthritis and immune-mediated disease. *Int J Med Microbiol* 290(4-5):489-90.
 29. Cole BC, Sawitzke A 1995. *Mycoplasmas*, Superantigens and autoimmune arthritis, In: Henderson J, Edwards J, Pettipher E, editors. Mechanisms and models in rheumatoid arthritis. London: Acad Pres, 47-66.
 30. Collins TR, Byyny RL 1980. The clinical use of glucocorticoids. *Compr Ther* 6:63-72.
 31. Cordova, CMM; Takei, K.; Rosenthal, C; Miranda, MARB; Vaz, AJ; Cunha, RAF 1999. Evaluation of IgG, IgM, and IgA antibodies to *Mycoplasma*

- penetrans detected by ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients, in São Paulo, Brazil. *Microb Infect* (1): 1095-1101.
32. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J 2003: Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21(3):273-6.
33. Davis CP, Cochran S, Lisse J, Buck G, DiNuzzo AR, Weber T, Reinars J 1988. A. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from synovial fluid samples in a patient with pneumonia and polyarthritis. *Arch Intern Med* 148: 969-970.
34. Daxboeck F, Iro E, Tamussino K, Krause R, Assadian O, Wenisch C 2003. Bacteremia With *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients undergoing hysterectomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 608-611.
35. Dean, A.G., Dean, J.A., Colombla, D., Brindle, K.A., Smith, D.C., Burton, A.H., Dicker, R.C., Sullivan, K., Fagan, R.F. and Earner, T.G. 1996. Epi Info, version 6: a word processing, database and statistics program for public health on IBM – compatible microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
36. Doria A, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Tonon M, Sarzi-Puttini P 2008. Preventive strategies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* (7): 192-197.
37. Dybvig K, Cao Z, Ping L, David S. Jordan, C. Todd F, Anh-Hue T. Tu, and Ann E. Loraine 2008. Genome of *Mycoplasma arthritidis*. *Infect and Immun* 76 (9): 4000–4008.
38. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. 2004 : Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200(3): 277-85.
39. Emery P, Breedveld FC, Dougados M., Kalden Jr, Schiff MH, Smolen JS 2002. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Ann Rheum Dis* 61, p.290.
40. Fernandez RN, Ximenes AC, Alves MFC 2005. Detecção do DNA de *Chlamydia trachomatis* em Espondiloartropatias e Artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 45(5): 280-90.
41. Firestein GF 2003: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-61.

42. Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahi B, Sundan A, Espevik T 2001. Differential expression of toll-like receptor 2 in human cells. *J Leuk Biol* 69: 474-480.
43. Frangoso G, Dimitrov DS, Blumenthal R, Barile MF, Rottem S 1992. Fusion of *Mycoplasma fermentans* strain incognitus with T-lymphocytes. *FEBS Lett* 303:251-54.
44. Franz B, Fritzsching B, Riehl A, Oberle N, Klemke CD, Sykora J, et al. 2007: Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56(6):1910-20.
45. Gabriel SE 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Ann* 27: 269-81.
46. Gdoura R, Kchaon W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A, 2007. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect Dis* 8(7):129-132.
47. Galily R, Salman M, Tarshis M, Rottem S 1992. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) induces TNF- α and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. *Immun Let* 34: 27-30.
48. Garcia-Pórrua C, Blanco FJ, Hernandez A, Atanes A, Galdo F, Moure R. 1997. Septic arthritis by *Mycoplasma hominis*: a case reported and review of the medical literature. *Ann Rheum Dis* 56(11): 699-700.
49. Gelfand EW 1993. Unique susceptibility of patients with antibody deficiency to *Mycoplasma* infection. *Clin Infec Dis* 17 (1): 250 – 253.
50. Gilroy CB, Keat A and Taylor-Robinson 2001. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritidis. *Rheum (Oxford)* 40: 1355-1358.
51. Ginsburg KS, Kundsinn RB, Walter CW, Schur PH 1992. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35(4):429-433.
52. Glass JL, Lefkowitz ELJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassel GH 2000. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407:757-762.
53. Haier J, Nasralla M, Franco AR, Nicolson GL 1999. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheum (Oxford)*

- 38(6):504-9.
54. Hakkarainen K, Turunen H, Jansson E 1992. Mycoplasmas and arthritis. *Ann Rheum Dis* 51(10):1170-1172.
55. Harris Jr ED, Shur PH, 2006: Risk factors for possible causes of rheumatoid arthritis. *Arth Rheum* 48:2920-29.
56. Hata A, Honda Y, Asada K, Sasaki Y, Kenri T, Hata D, 2008. *Mycoplasma hominis* meningitis in a neonate: case report and review. *J Infect* 57(4):338-43.
57. Hau M, Schultz H, Tony HP 1999: Evaluation of pannus and vascularization of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis by High-Resolution Ultrasound (Multidimensional Linear Array). *Arthritis Rheum* 42: 2303-8.
58. Hochberg MC 1990. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 16:617–39.
59. Hochberg MC 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725.
60. Hodtsev AS, Choi Y, Spanopoulou E, Posnett DN 1998. Mycoplasma Superantigen in a CDR3-dependent ligand for the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 187: 319-27.
61. Hoffman RW, O'Sullivan FX, Schafermeyer KR, Moore TL, Roussel D, McKown RW, Kim MF, Wise KS 1997. Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum* 40: 1219 – 28.
62. Horowitz S, Evinson B, Borer A, Horowitz J. 2000. Mycoplasma fermentans in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *J Rheumatol* 27(12):2747-53.
63. Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA 1991. Limited T cell receptor beta-chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10921-5.
64. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 84 (2): 223-243.

65. Jansson E, Mäkisara P, Vaino K 1971. An 8 –year study of mycoplasmas in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 30: 506-508.
66. Jefferies WM 1998. The etiology of rheumatoid arthritis. *Med Hypot* 51: 111 – 114.
67. Jernberg E, Moghaddam A, Moi H 2008. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. *Int J STD AIDS* 19 (10):676-9.
68. Johnson S, Pitcher D 2000. Distribution of ecto 5' nucleotidase on *Mycoplasma* species associated with arthritis. *FEMS Microbiol Let* 192:59–65.
69. Johnson S; Sidebottom, D; Bruckner, F; Collins D 2000. Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 38: 90 – 93.
70. Johnson SM, Bruckner F, Collins D 2007. Distribution of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma salivarium* in the synovial fluid of arthritis patients. *J Clin Microbiol* 45 (3), 953-957.
71. Kawahito Y, Ichinose S, Sano H, Tsubouchi Y, Kohno M, Yoshikawa T, Tokunaga D, Hojo T, Harasawa R, Nakano T, Matsuda K 2008. *Mycoplasma fermentans* glycolipid-antigen as a pathogen of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* (2):11.
72. Knudtson KL, Manohar M, Joyner DE, Ahmed EA, Cole BC 1997. Expression of the superantigen *Mycoplasma arthritidis* mitogen in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Infect Immun* 65: 4965-71.
73. Kobayashi S, Momohara S, Kamatani N, Okamoto H 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *FEBS J* 275: 4456 – 4462.
74. Koch A, Bilina A, Teodorowicz L, Stary A 1997. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wien Klin Woch* 109:14-15, 584-85.
75. Kostyal DA; Butler GH; Beezhold 1994. A 48 Kilodalton *Mycoplasma fermentans* Membrane Protein Induces Cytokine Secretion by Human Monocytes. *Infect Immun* 62(9): 3793-3800.
76. Ladefoged SA & Christiansen G 1988. *Mycoplasma hominis* express two variants of a cell-surface protein, one a lipoprotein, and one not. *Microbiol* 144: 761-770.

77. Langlois MA, Etongué-Mayer P, Quellette M, Mourad W 2000. Binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to human MHC class II molecules via its N terminus is modulated by invariant chain expression and its C terminus is required for T cell activation. *Eur J Immunol* 30(6): 1748-56.
78. Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT, Chiang BL 2006: Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol* 117(2):280-6.
79. Li H, Van Vranken S, Zhao Y, Li Z, Guo Y, Eisele L, Li Y 2005. Crystal structures of T cell receptor (beta) chains related to rheumatoid arthritis. *Protein Sci* 14(12):3025-38.
80. Li H, Zhao Y, Guo Y, Li Z, Eisele L, Mourad W 2006. Zinc induces dimerization of the class II MHC molecule that leads to cooperative binding to a superantigen. *J Biol Chem*. Dec 13.
81. Li H, Zhao Y, Guo Y, Vanvranken SJ, Li Z, Eisele L, Mourad W 2007. Mutagenesis, biochemical, and biophysical characterization of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. *Mol Immunol* 44(5):763-773.
82. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carrol JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274. (47): 3419-3425.
83. Liepmann MF; Gireaudot P; Deletrez J; Decker L; Wattré P 1991. Use of the *Mycoplasma hominis* 102-116 KDa proteins as antigen an enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol* 65(262): 7-13.
84. Lima I, Barbosa L, Lopes M, Reis E, Reis M, Colossi K, Abreu M, Ferreira C, Santiago M 2007. Pesquisa de Anticorpos Antinucleossoma em Lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 47(3): 160-164.
85. Lipsky, PE; Davis LS 1998. The central involvement of T cells in rheumatoid arthritis. *Immunologist* 6(3): 121-128.
86. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR 2004 : Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 59(2):198-202.
87. Lo S-C, Hayes MM, Pierce PF, Kotani H, Shih JWK, Wang YHL 1991a. Newly discovered mycoplasma isolated from patients with HIV. *Lancet* 338:1415-18.

88. Lo SC, Wang RYH, Grandinetti, Zou N, Haley CLD, Hayes MM, Wear DJ, Shih JWK 2003. *Mycoplasma hominins* lipid-associated membrane protein antigens for effective detection of *M. hominis*-specific antibodies in humans. *Clin Infect Dis* 36:1246-53.
89. Lora P.S., Laurino CCFC, Freitas E, Brenol JCT, Montecielo O, Xavier RC 2007. Padrões de Imunofluorescência do Fator Antinuclear (FAN) em Células Hep-2 de Soros Reagentes para Anti-SSA/Ro. *Rev Bras Reumatol* 47: 4-9.
90. Luttrell LM, Kanj SS, Corey GR, Lins RE, Spinner RJ, Mallon WJ, Sexton DJ 1994. *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review. *Clin Infect Dis* 19: 1067-1070.
91. Machado AA, Zorzi AR, Gléria AEA, Donadi EA 2001. Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in women with systemic lupus erythematosus. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(3): 243-247.
92. Matsuda K, Li JL, Harasawa R and Yamamoto N 1997. Phosphocholine-containing glycolipids (GGPL-I and GGPL-III) are species-specific major immunodeterminants of *Mycoplasma fermentans*. *Biochem Biophys Res Commun* 233, p. 644-649.
93. Matsuda S, Matsuda K and Ito Y 2003. Separation of phospholipids and glycolipids using analytical toroidal-coil countercurrent chromatography. Comparison of the hydrophobicity between *Mycoplasma fermentans* and human-brain lipids. *J Liq Chrom Rel Technol* 26: 1135-1147.
94. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, et al. 2006: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65(4): 553-4.
95. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. 2005: Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175(12): 8392-400.
96. Mok CC, Lau CS 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481-490.
97. Morand EF 2007. Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 19(3):302-7.
98. Mu HH, Humphreys J, Chan FV, Cole BC 2006. TLR2 and TLR4 differentially regulate B7-1 resulting in distinct cytokine responses to the mycoplasma superantigen MAM as well as to disease induced by *Mycoplasma arthritidis*.

- Cell Microbiol* 8(3): 414-26.
99. Mu HH, Pennock ND, Humphreys J, Kirschning CJ, Cole BC 2005. Engagement of Toll-like receptors by mycoplasmal superantigen: downregulation of TLR2 by MAM/TLR4 interaction. *Cell Microbiol* 7(6):789-97.
100. Mu HH, Sawitzke AD, Cole BC 2000. Modulation of cytokine profiles by the Mycoplasma superantigen *Mycoplasma arthritidis* mitogen parallels susceptibility to arthritis induced by *M. arthritidis*. *Infect Immun* 68(3):1142-9.
101. Mühlradt PF 1994. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect Immun* 62(9): 3801-3807.
102. Mühlradt, PF; Schade U 1991. MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to *in vitro* interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogen in rabbits. *Infect Immun* 59: 3969-3974.
103. Nishida Y, Takamori Y, Ohrui H, Ishizuka I, Matsuda K and Kobayashi 1999. Synthesis and absolute configuration of a novel aminoglycoglycerolipid, species-specific major immunodeterminant of *Mycoplasma fermentans*. *Tetrah Lett* 2371-2374.
104. Nishiguchi M, Matsumoto M, Takao T, Hoshino M, Shimonishi Y, Tsuji S, Begum NA, Takeuchi O, Akira S, Toyoshima K, Seya T 2001. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol* 166:2610-2616.
105. Östör AJK 2008. Abatacept: a T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* (June)
106. Paliard X, West SG, Lafferty JA 1991. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253: 325-9.
107. Phuah C, Javid B, Aliyu SH, Lever ML 2007. A case of *Mycoplasma hominis* septic arthritis postpartum. *J Infect* 55:135-137.
108. Prevoo MLL, van't Hof M A, Kuper HH, van Leeuwen M A, van de Putte LBA; van Riel, PLCM; 1995. Modified Disease Activity Scores that Include Twenty-Eight-Joint Counts: Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 38

- (1):44-48.
109. Proft T & Fraser JD 2003. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 133: 299-306.
 110. Rawadi G, Romam-Romam S. 1996. Mycoplasma Membrane Lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect and Immun* 64. (2): 637-643.
 111. Razin S, Herrmann, R 2002. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *New York: Klu Acad/Plenum Pub* p.572.
 112. Reilly PA, Evison G, McHugh NJ, Maddison PJ 1990: Arthropathy of hands and feet in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 17: 777-84.
 113. Reveille JD 2005. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. *J Rheumatol* 72:10-13.
 114. Ribeiro-Dias F, Russo M, Barbuto JAM, Nascimento FRF, Timenetsky J, Jancar S 1999. *Mycoplasma arginini* enhances cytotoxicity of thioglycollate-elicited murine macrophages toward YAC-1 tumor cells through production of NO. *J Leuk Biol* 65: 808 – 814.
 115. Ribeiro-Dias, F; Shio, MT; Timenetsky, J; Oliane, APC; Metran, CC; Pessoa, FB; Jancar S 2003. *Mycoplasma arthritidis* superantigen (MAM)-induced macrophage nitric oxide release is MHC class II restricted, interferon γ dependent, and toll-like receptor 4 independent. *Exp Cell Res* 286: 345-354.
 116. Rindfleisch A, Muller D. 2005: Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Phys* 72: 1037-47.
 117. Rivera A, Yanez A, Leon-Tello G, Gil C, Giono S, Barba E and Cedillo L 2002 . Experimental arthritis induced by a clinical *Mycoplasma fermentans* isolat. *BMC Musculoskelet Disord* 3:15 -18.
 118. Roifman CM, Rao CP, Lederman HM, Lavi S, Quinn P, Gelfand EW 1986. Increased susceptibility to Mycoplasma infection in patients with hipogammaglobulinemia. *Am J Med* 80: 590 – 594.
 119. Rottem S 2003. Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. *Physiol Rev* 83: 417-432.
 120. Rottem S, Naot Y 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol* 6: 436- 440.
 121. Roudier J 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Association of RA with HLA-DR4: the role of repertorie selection. *Arthritis Research* 2:217-

220.

122. Rus V, Hochberg MC 2002. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois lupus erythematosus*. 6th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; p.66-83.
123. Ruuth E, Praz F 1989. Interactions between mycoplasmas and the immune system. *Immunol Rev* 112: 133-160.
124. Sato, EI 1999. Introdução. In EI Sato (Org.), Lúpus eritematoso sistêmico- O que é? Quais são suas causas? Como se trata?. *Rev Soc Bras de Reum.* (2) 5-8.
125. Sato, EI, Bonfá, E d, Costallat, LTL, Silva, NA, Brenol, JCT, Santiago, MB, Szajubok, JCM, Filho, AR, Barros, RT, & Vasconcelos, M. 2002. Consenso brasileiro para o tratamento do Lúpus eritematoso sistêmico (LES). *Rev Bras Reum* 42(6), 362-370.
126. Sawitzke A, Joyner D, Knudtson K, Mu Hong-Hua and Cole B 2000. Anti-MAM antibodies in Rheumatic Disease: Evidence for a MAM-like Superantigen in Rheumatoid Arthritis? *J Rheumatol* 27 (2): 358-364.
127. Schaefferbeke T, Gilroy CB, Bebear C, Dehais J and Taylor-Robinson D 1996. *Mycoplasma fermentans* in joints of patients with rheumatoid arthritis and other joint disorders. *Lancet* 347 p. 1418.
128. Schaefferbeke T, Gilroy CB, Bebear C, Dehais J and Taylor-Robinson D. 1996. *Mycoplasma fermentans*, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. *J Clin Pathol* 49, 824-828.
129. Schaefferbeke T, Renaudin H, Clerc M 1997. Systemic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction procedures in 209 synovial fluid samples. *Br J Rheumatol* 36:310-4.
130. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and Rheum* 43: 155-163.
131. Schiffenbauer, J; Soos, J; Johnson H 1998. The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Immun Today*

- 19 (3): 117-120.
132. Sczepanski L, Targonskaiotrowski M 1992: Deforming arthropathy and Jaccoud's syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 21: 308-9.
133. Shahrara S, Huang Q, Mandelin II AM, Pope RM 2008. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arth Res & Ther* 10: R93.
134. Shio MT; Ribeiro-Dias F; Timenetsky J; Jancar, S 2004. PAF is involved in the *Mycoplasma arthritidis* superantigen-triggering pathway for iNOS and COX-2 expression in murine peritoneal cells. *Exp Cell Res* 298: 296-304.
135. Simard JF, Costenbader KH 2007. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? *Int J Clin Pract* 61(7): 1170-1180.
136. Simecka JW, Ross, SE; Cassell, GH; Davis, JK 1993. Interactions of mycoplasmas with B cells: antibody production and nonspecific effects. *Clin Infect Dis* 17: 176 -182.
137. Stadtlander CTKH, Zuhua C; Watson HL; Cassell GH, 1991. Protein and Antigen Heterogeneity among Strains of *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immunol* 59(9): 3319-3322.
138. Stuart PM 1993. Mycoplasmal induction of cytokine production and major histocompatibility complex expression. *Clin Infect Dis* 17:187-191.
139. Symmons DP 2007. Classification criteria for rheumatoid arthritis – time to abandon rheumatoid factor. *Rheum* 10:1-2.
140. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S, 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 13 (7): 933-940.
141. Taylor Robinson D, Gilroy CB, Horowitz S 1994. *Mycoplasma genitalium* in the joints of the two patients with arthritis. *Eur J Clin Mic Infect Dis* 13: 1066-9.
142. Taylor Robinson D., Bebear C 1997. Antibiotic susceptibilities of *Mycoplasmas* and treatment of *Mycoplasma* infections. *J Anti-microb Chem* 40: 622-630.
143. Tenbrock K, Juang YT, Kyttaris VC, Tsokos GC 2007. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumat* 46: 1525-1530.
144. Toh ML, and Miossec P 2007. The role of T cells in rheumatoid arthritis:

- new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 19: 284 – 288.
145. Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 76(9): 4350-4.
 146. Tu AH, Clapper B, Schoeb TR, Elgavish A, Zhang J, Liu L, Yu H, Dybvig K 2005. Association of a major protein antigen of *Mycoplasma arthritidis* with virulence. *Infect Immun* 73 (1):245-9.
 147. Tully JG 1995. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: Razin S & Tully JG (Eds). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. San Diego: *Acad Pres* 1: 33- 40.
 148. Tumang JR, Posnett DN, Cole BC, Crow MK, Friedman SM. 1990. Helper T cell-dependent human B cell differentiation mediated by a mycoplasmal superantigen bridge. *J Exp Med* 171 (6): 2153-8.
 149. van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL et al. 1990: Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis* 49: 916-920.
 150. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS 2004: CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50(9): 2775-85.
 151. van Venrooij, Van de Putte LB 2005. Is assaying autoantibodies useful for diagnosing early rheumatoid arthritis? *Nat Clin Pract Rheumatol* 1: 4-5.
 152. Vargas-Alarcón G, Salgado N, Granados J, Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Alcocer-Varela J, Arnaiz-Villena A, Alarcón-Segovia D 2001. Class II allele and haplotype frequencies in Mexican systemic lupus erythematosus patients: the relevance of considering homologous chromosomes in determining susceptibility. *Hum Immunol* 62(8):814-20.
 153. Verinder DGR 1978. Septic arthritis due to *Mycoplasma hominis*. A case report and review of the literature. *J Bone Joint Surg* 60: p.224.
 154. Waites KB, Talkington DF 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microb Rev* 17 n.4: 697-728.
 155. Wang RYH, Hu WS, Dawson MS, Shih JWK, Lo SC 1992. Selective detection of *Mycoplasma fermentans* by polymerase chain reaction and by

- using a nucleotide sequence within the insertion sequence-like element. *J Clin Microbiol* 30:245–248.
156. Wang, RYH, Shih, JWK, Grandinetti, T.; Pierce, PF; Hayes, MM; Wear, D; Alter, HJ; Lo, SC 1992. High frequency of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected patients. *Lancet* 340: 1312-1316.
 157. Wenyi Luo, Huilan Yu, Zuhua Cao, and Trenton R. Schoeb, Michele Marron, Kevin Dybvig 2008. Association of *Mycoplasma arthritidis* mitogen (MAM) with lethal toxicity but not arthritis in mice. *Infect Immun* 10: 667-08.
 158. Wise KS, Kim MF 1987. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *J Bacteriol* 169:5546-5555.
 159. Wise KS, Kim MF, Theiss P, Lo S 1993. A Family of Strain-Variant Lipoproteins of *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 3327-3333.
 160. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y and Yoshikai Y 2007. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*.
 161. You X; Zeng , Wu Y 2006. Interactions between lipid-associated membrane proteins and host cells. *J Z U Science B* 7(5): 342-350.
 162. Zhao Y, Li Z, Drozd SJ, Guo Y, Mourad W, Li H 2004. Crystal structure of *Mycoplasma arthritidis* mitogen complexed with HLA-DR1 reveals a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex. *Struct* 12(2): 277-288.

8. Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Título Projeto de Pesquisa

Pesquisa de anticorpos séricos IgG anti-lipoproteínas de *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma hominis* ou anti-MAM (superantígeno do *Mycoplasma arthritidis*) em pacientes com Artrite Reumatóide ou Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Convite a participar

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa a ser realizada pelo Curso de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia (DMIPP) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da **Universidade Federal de Goiás (UFG)**. Esta pesquisa visa avaliar se os pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e principalmente, a Artrite reumatóide (AR), apresentam, nas suas amostras de soro, a presença de anticorpos IgG anti-lipoproteínas de micoplasmas e anticorpos anti-rMAM.

Procedimentos

Realizaremos um teste de **Western blotting** para detecção de anticorpos anti-lipoproteínas de *Mycoplasmas hominis* e *Mycoplasma fermentans* e anti-MAM nas amostras séricas dos pacientes portadores de Artrite Reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Serão colhidos cerca de 5,0 mL de sangue periférico sem anticoagulante, desses pacientes e de doadores do Banco de Sangue do HC/UFG, os soros serão separados, glicerizados e estocados numa temperatura de -20 °C até o momento dos testes serem realizados.

Riscos e Desconfortos

A coleta de sangue será realizada por um biomédico (Hermínio Sobrinho) ou estagiários treinados em coleta sangüínea venosa periférica, onde serão seguidas todas as normas de biossegurança necessárias. A punção para coleta de sangue pode causar leve dor local, podendo haver a formação de pequeno hematoma, inchaço e discreto sangramento.

Benefícios do experimento

Os resultados desta pesquisa poderão ajudar a comunidade científica e a classe médica a elucidar um pouco mais sobre os possíveis agentes causadores ou exacerbadores das doenças articulares crônicas, especialmente a Artrite Reumatóide, uma vez, que estas doenças são de etiologia desconhecida.

Confidencialidade

Toda informação obtida nesta pesquisa será confidencial. Em nenhum momento o seu nome será divulgado, sendo tratado apenas por número. Apenas as pessoas envolvidas no estudo terão acesso a informações, como os resultados dos exames realizados.

Tratamento emergencial

O paciente que vier a sofrer qualquer dano previsto ou não neste termo de consentimento, "resultante de sua participação nesta pesquisa", além do direito à assistência integral, tem direito à indenização prevista em lei. Qualquer dúvida em relação com a pesquisa pode ser contactado o Prof. Dr. Nilzio Antonio da Silva, Chefe do Serviço de Reumatologia HC/UFG e Clínico colaborador da referente pesquisa à 1ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário – CEP: 74605-050 – Fone: 3261 2029. Goiânia – Goiás.

Obrigações financeiras

Este projeto não implicará em qualquer ônus ao paciente. Do mesmo modo, o participante voluntário desta pesquisa não será beneficiado financeiramente ou receberá qualquer ajuda, prêmios ou bonificações.

Destino de materiais e/ou dados da pesquisa

Todos os resultados do trabalho em questão serão tornados públicos pelos meios normais de comunicação científica. Poderão ser apresentados através de publicações em periódicos científicos nacionais ou internacionais, apresentados oralmente como palestras e conferências e sob forma de painéis em encontros científicos ou congressos na área tratada.

Esclarecimento de dúvidas

O paciente terá a garantia de que receberá todas as informações, respostas e esclarecimentos sobre qualquer dúvida à cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a esta pesquisa. O paciente ainda será informado dos resultados dos exames aos quais se submeteu (Testes de Western blotting).

Retirada do consentimento

O paciente tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento que desejar e deixar de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua decisão em não participar desta pesquisa não afetará qualquer atividade presente ou futura que vier a ter com a Universidade Federal de Goiás (UFG).

Telefones para contato: Prof^ª. Dra Fátima Ribeiro Dias 3225 3751 - ou Profa. Dra Miriam L. Dorta 3209-6126 ou 3209-6116, Dr Hermínio Sobrinho 3282-1786.

CONSENTIMENTO PÓS – INFORMAÇÃO

Eu.....
...,certifico que li todas as informações contidas neste termo e que me foi eficientemente esclarecido todos os itens, não restando qualquer dúvida quanto a minha participação no estudo em questão.

A minha participação se restringirá ao teste já mencionado acima e à retirada de sangue em veia periférica, local onde normalmente é coletado sangue para exames de rotina. A coleta será realizada exclusivamente com material estéril, descartável, ou seja, utilizável uma única vez, eliminando os riscos de qualquer contaminação. A equipe pesquisadora terá acesso aos resultados dos exames realizados.

Tenho consciência que minha participação como voluntário não me conferirá nenhum privilégio, seja ele de caráter financeiro ou no prosseguimento de meu tratamento. Portanto, estou plenamente de acordo com a realização do teste. Assim, concordo em participar do trabalho de pesquisa exposto acima.

Nº do Paciente: _____

Nº Prontuário: _____

Nome:.....

Sexo:

Data de nascimento:.....

Nº da identidade (RG):.....

Endereço:.....

..

Telefone:.....

Assinatura do sujeito da
pesquisa: _____

Pesquisador
responsável: _____

Goiânia,.....de.....de 200.....

Questionário SLEDAI (Índice de Atividade do Lúpus eritematoso sistêmico)

NOME:.....

..

IDADE:.....

DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....

PRONTUÁRIO:

TRATAMENTO:

DATA DA COLETA:

Pontos			Parâmetros avaliados
1	sim	não	FEBRE (Fb) >38°C, após exclusão de infecção.
4	sim	não	ARTRITE (Ar) Dores articulares e presença de sinais inflamatórios em duas ou mais articulações.
4	sim	não	MIOSITE (Mi) Fraqueza ou dor de musculatura proximal, associada a elevação de aldolase, alterações eletromiográficas ou biópsia muscular compatível com miosite.
2	sim	não	ERITEMA MALAR (Em) Novo ou recorrente, do tipo inflamatório.
2	sim	não	ALOPÉCIA (Al) Padrão anormal de perda de cabelo.
2	sim	não	MEMBRANA MUCOSA (Mu) Ulcerações orais e/ou nasais, novas ou recorrentes.
2	sim	não	PLEURISIA (Pi) Dor torácica tipo pleural, com atrio, derrame ou espessamento pleural.
2	sim	não	PERICARDITE (Pc) Dor "pericardica" com pelo menos um dos seguintes sinais: atrio, derrame, alterações eletrocardiográficas ou confirmação por ecocardiograma.
8	sim	não	CONVULSÃO (Cv) Início recente, excluindo-se causas metabólicas e infecciosas ou decorrente do uso de drogas.
8	sim	não	PSICOSE (Ps) Incapacidade para exercer atividade normais devido a grave distúrbios na percepção da realidade. Inclui: alucinações, incoerência marcante, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganização ou catatônico, excluindo-se causas como uremia e uso de drogas.
8	sim	não	SÍNDROME ORGANICA CEREBRAL (Sc) Função mental alteada, com deterioração da memória ou outras funções intelectuais incluindo: 1 - rebaixamento do nível de consciência com concentração reduzida. 2 - Presença de 2 destes distúrbios de percepção: discurso incoerente, insônia, sonolência diurna, aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Estas manifestações

devem ser de início recente, oscilando com outras características clínicas (excluindo-se causas metabólicas ou devidas a drogas).

8	sim	não	OLHOS Alteração retinianas do LES: corpos citóides, hemorragias retinianas, exsudato seroso ou hemorragia na coróide (não devida a hipertensão ou drogas).
8	sim	não	NERVOS CRANIANOS (Nc) Neuropatia de início recente, acometendo nervos cranianos motores ou sensitivos.
8	sim	não	DOR DE CABEÇA DO LES (Dc) Dor de cabeça grave, persistente, podendo ser do tipo “enxaqueca”, não responsiva a analgésicos narcóticos.
8	sim	não	AVC (Av) Acidente vascular cerebral de início recente, excluindo-se arteriosclerose.
4	sim	não	LEUCOCITÚRIA (Le) > 5 leucócitos/campo ou 10.000/mm ³ , excluindo-se infecção.
1	sim	não	TROMBOCITOPENIA (Tp) Plaquetas abaixo de 100.000/mm ³ .
1	sim	não	LEUCOPENIA (Lp) Leucócitos abaixo de 3.000/mm ³ (não devido ao uso de drogas).
8	sim	não	VASCULITE (Vs) Petéquias, ulcerações, gangrena, nódulos digitais sensíveis ou infarto periungueal.
4	sim	não	CILINDRÚRIA (Ci) Cilindros hemático-granulares ou hemáticos.
4	sim	não	HEMATÚRIA (Hm) ➤ 5 hemácias/campo ou 8.000/mm ³ . Excluindo-se cálculos e infecção. PROTEINÚRIA (Pt) ➤ 0,5g/24horas. Início recente ou aumento recente da taxa.

Critérios para o diagnóstico do Lúpus eritematoso sistêmico:

Na prática, costuma-se estabelecer o diagnóstico utilizando-se os critérios de classificação propostos, em 1982, pelo *American College of Rheumatology*(B), e revisados em 1973. O diagnóstico baseia na presença de pelo menos quatro critérios dos onze citados a seguir:

- 1.** Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
- 2.** Lesão discóide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
- 3.** Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
- 4.** Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
- 5.** Artrite: artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
- 6.** Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
- 7.** Comprometimento renal: proteinúria persistente (>0,5g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
- 8.** Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
- 9.** Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/ml em duas ou mais ocasiões), ou linfopenia (menor que 1.500/ml em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/ml na ausência de outra causa).
- 10.** Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide baseado em:
a) níveis anormais de IgG ou IgM anti-cardiolipina;
b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso positivo para sífilis, por no mínimo seis meses.
- 11.** Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Table 6. The 1987 classification tree criteria and definitions for rheumatoid arthritis (RA)*

Criterion	Definition
1. Arthritis of 3 or more joint areas	At least 3 joint areas simultaneously have had soft tissue swelling or fluid (not bony overgrowth alone) observed by a physician. The 14 possible joint areas are right or left PIP, MCP, wrist, elbow, knee, ankle, and MTP joints
2. Arthritis of hand joints Wrist MCP MCP or wrist MCP and wrist	Soft tissue swelling or fluid (not bony overgrowth alone) of the specified area observed by a physician. Where 2 areas are specified, involvement must have been simultaneous
3. Symmetric swelling (arthritis)	Simultaneous involvement of the same joint areas (as defined in 1) on both sides of the body (bilateral involvement of PIPs, MCPs, or MTPs is acceptable without absolute symmetry)
4. Serum rheumatoid factor	Demonstration of abnormal amounts of serum rheumatoid factor by any method for which the result has been positive in <5% of normal control subjects
5. Radiographic changes of rheumatoid arthritis	Radiographic changes typical of rheumatoid arthritis on posteroanterior hand and wrist radiographs which must include erosions or unequivocal bony decalcification localized in or most marked adjacent to the involved joints (osteoarthritis changes alone do not qualify)

* A patient is said to have RA if he/she is included in 1 of the 5 RA subsets listed in Table 7 and has a clinical diagnosis of RA by his/her physician. Criteria 1, 2, and 3 must have been present for at least 6 weeks. See Table 3 for definitions of abbreviations.

ACR 1987, Arnett et al. 1988.