MURILO CHIAMOLERA

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES FC DE
IMUNOGLOBULINA A EM FAGÓCITOS DO SANGUE DE
PACIENTES COM BACTEREMIA**

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

**SÃO PAULO
2000**

MURILO CHIAMOLERA

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES FC DE IMUNOGLOBULINA A
EM FAGÓCITOS DO SANGUE DE PACIENTES COM
BACTEREMIA**

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

Área de concentração : Emergências Clínicas

Orientador : Prof.Dr. Irineu Tadeu Velasco
co-orientador : Prof.Dr. Renato Costa Monteiro Filho

**SÃO PAULO
2000**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Chiamolera, Murilo

Expressão dos receptores FC de imunoglobulina A em fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia / Murilo Chiamolera. -- São Paulo, 2000.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Irineu Tadeu Velasco.

Co-orientador: Renato Costa Monteiro Filho.

Descritores: 1.RECEPTORES FC/análise 2.IMUNOGLOBULINAS/análise.
3.IGA/análise 4.FAGÓCITOS/imunologia 5.BACTEREMIA/imunologia
6.CITOMETRIA DE FLUXO/métodos

USP/FM/SBD-302/00

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, minha família, minha primeira e maior referência.

A Pupi, pela companhia e inspiração e por ter ajudado a dar forma a este trabalho.

Aos pacientes e seus familiares que, a despeito das circunstâncias adversas, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Monteiro, pelo seu exemplo como cientista, pela simpatia e dedicação.

Ao Prof. Dr. Irineu Velasco, pelo estímulo e apoio constante para a realização esta empreitada.

A Profa. Dra. Eloísa Bonfa, por ter me acolhido em sua disciplina, pelo incentivo e pela simpatia.

Aos colegas da disciplina de emergências clínica e UTI neurológica, assistentes, residentes, enfermagem, fisioterapia, secretárias, por todo apoio para realização deste trabalho e pelo excelente ambiente humano que ajudam a compor.

As minhas colegas de laboratório, Martha, Ana Paula, Cleide, Erika, pela ajuda e amizade. A Dra. Viviane Montenegro, minha amiga, pela ajuda e inspiração.

As colegas do LIM 17 – Reumatologia, Francisca, Cleo, Margareth, Eliana, Solange, pelos valiosos ensinamentos e pela simpatia. A Dra. Vilma, pelo rigor científico, pelo dom para o ensino e pela dedicação.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina, cujo trabalho possibilitou e possibilita a pesquisa, o ensino e a assistência.

Aos colegas das UTIs da Nefrologia, Moléstias Infecciosas e Pneumologia, pelo apoio para realização deste trabalho.

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio para realização deste trabalho (projetos 95/9843-0, 96/10377-7 e 98/06432-8).

Aos Drs. Pierre Launay, Mathias Haury e Ana Jaleco, que nos brindaram com seus conhecimentos e sua simpatia

A Dra. Gleice M.S.Conceição, pela excelência da análise estatística.

A outros tantos colegas e professores que, apesar de não serem lembrado nesta página, jamais serão esquecidos.

RESUMO

Chiamolera, M. **Expressão dos receptores Fc de imunoglobulina A em fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia.** São Paulo, 2000. 110 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Expressão aumentada do receptor Fc de IgA (CD89) e da cadeia γ associada, avaliadas respectivamente por citometria de fluxo e por “immunoblotting”, foram encontradas em fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia por germes gram-negativos, em comparação com controles e pacientes com bacteremia por gram-positivos. A *Mr* do CD89 avaliada por SDS-PAGE estava diminuída, com núcleo protéico de 32kDa, sugerindo alteração de glicosilação. O aumento da expressão do CD89 correlacionou-se com aumento dos níveis séricos de IL-6. A cadeia γ estava fosforilada nos neutrófilos, sugerindo participação do CD89 na sepsis por gram-negativos.

SUMMARY

Chiamolera, M. **Expression of Immunoglobulin A Fc Receptors on Blood Phagocytes of Patients with Gram-Negative Bacteremia.** São Paulo, 2000. XX p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

The expression and function of Fc α RI (CD89) were analyzed on blood monocytes and neutrophils of patients with gram-positive and gram-negative bacteremia. Eighteen patients with gram-positive bacteremia, sixteen patients with gram-negative bacteremia and twenty healthy individuals were studied. CD89 expression were analyzed by flow cytometry using specific stained antibodies. Analysis of the surface iodinated CD89 molecules by SDS-PAGE and of the CD89 γ -associated chain by immunoblotting also were performed. A marked increase in expression of the α and γ subunits of the Fc α RI were found on both types of cells in patients with gram-negative bacteremia, but not in patients with gram-positive bacteremia. This increase was independent of serum IgA levels. Fc α RI *Mr* was lower on cells from gram negative patients than on cells from controls (50-65 kDa vs 55-75 kDa) despite of similar 32 kDa backbone, indicating altered glycosylation. Increased levels of Fc α RI on blood phagocytes correlated with enhanced serum IL-6 levels, but not with IFN- γ or TNF- α levels. The CD89 γ -associated chain was phosphorylated on neutrophils, suggesting an engagement of CD89 during gram negative sepsis.

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>1.1</u>	<u>Imunidade Inata</u>	<u>4</u>
1.1.1	O complemento	5
1.1.2	O Lipopolissacarídeo (LPS)	7
1.1.3	Proteínas do hospedeiro relacionadas ao LPS	8
1.1.4	Resposta do hospedeiro às bactérias gram-positivas	10
<u>1.2</u>	<u>Resposta Inflamatória</u>	<u>11</u>
1.2.1	Células envolvidas na resposta à infecção	11
1.2.1.1	<i>Transdução de sinal intracelular</i>	12
1.2.2	A resposta inflamatória à infecção	14
1.2.2.1	<i>A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)</i>	16
1.2.3	Mediadores inflamatórios	17
1.2.3.1	<i>Citocinas</i>	17
1.2.3.1.1	Fatores de necrose tumoral (TNF)	18
1.2.3.1.2	Interleucina 1	20
1.2.3.1.3	Interleucina 6	21
1.2.3.1.4	Interleucina 8	22
1.2.3.1.5	Interleucina 12	23
1.2.3.1.6	Interleucina 18	24
1.2.3.1.7	Interleucinas 4 e interleucina 13	24
1.2.3.1.8	Interleucina 10	25
1.2.3.1.9	Outros mediadores celulares	26
1.2.3.2	<i>Derivados do ácido aracônico e o fator de agregação plaquetária (PAF)</i>	27
1.2.3.3	<i>Moléculas de adesão</i>	28
1.2.3.3.1	Moléculas de adesão da família das imunoglobulinas	29
1.2.3.3.2	As Integrinas	29
1.2.3.3.3	As Selectinas	30
<u>1.3</u>	<u>Imunidade adaptativa</u>	<u>31</u>
1.3.1	Maturação de células T. Imunidade humoral e imunidade celular	31
1.3.2	Imunoglobulinas e Imunidade humoral	33
1.3.3	Receptores Fc de Imunoglobulinas	37
1.3.4	A cadeia gama associada aos receptores Fc de imunoglobulinas	40
1.3.5	Receptores Fc de imunoglobulina na resposta à infecção	42
1.3.5.1	<i>Receptores Fc de IgG (FcγR)</i>	42
1.3.5.2	<i>Receptor Fc de IgA (FcαRI)</i>	44
<u>2</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>45</u>
<u>3</u>	<u>CASUÍSTICA E MÉTODOS</u>	<u>47</u>
<u>3.1</u>	<u>Pacientes e grupo controle</u>	<u>48</u>
<u>3.2</u>	<u>Reagentes</u>	<u>49</u>
3.2.1	IgG Humana	49
3.2.2	Anticorpos anti- FcγR e relacionados	49
3.2.3	Anticorpos anti- Fcα RI e relacionados	50
3.2.4	Outros anticorpos	51

3.2.5	<u>Enzimas, detergentes e outros reagentes</u>	51
3.3	<u>Metodologia</u>	53
3.3.1	<u>Coleta de amostra</u>	53
3.3.2	<u>Marcação com anticorpos específicos e análise de fluorescência por citometria de fluxo</u>	53
3.3.3	<u>Análise da ocupação do receptor pela IgA endógena</u>	58
3.3.4	<u>Análise do aumento de expressão do FcαRI após incubação <i>ex vivo</i> a 37°C</u>	58
3.3.5	<u>Fracionamento celular, iodinação das proteínas de superfície e lise celular</u>	59
3.3.6	<u>Eletroforese em gel de poliacrilamida para análise de massa e glicosilação do receptor</u>	61
3.3.7	<u>“Immunoblotting” para análise de expressão e fosforilação da cadeia γ</u>	61
3.3.8	<u>Determinação da concentração de IgA do sangue</u>	62
3.3.9	<u>Determinação da concentração de citocinas no sangue</u>	63
3.3.10	<u>Análise estatística</u>	63
4	<u>RESULTADOS</u>	64
4.1	<u>Pacientes</u>	65
4.1.1	<u>Grupo controle</u>	66
4.2	<u>Expressão aumentada do FcαRI (CD89) nos fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia por germes gram-negativos</u>	66
4.3	<u>Expressão dos FcγR nos fagócitos do sangue dos pacientes com bacteremia</u>	69
4.4	<u>Concentração de IgA no sangue dos pacientes com bacteremia</u>	70
4.5	<u>Ocupação do FcαRI pela IgA endógena</u>	70
4.6	<u>Capacidade de aumento de expressão do FcαRI após incubação <i>ex vivo</i> a 37°C</u>	71
4.7	<u>Diminuição de massa molecular (M_r) do FcαRI em fagócitos de pacientes com bacteremia por gram-negativos</u>	73
4.8	<u>Aumento da expressão da cadeia γ associada ao FcαRI nos pacientes com bacteremia por gram-negativos</u>	75
4.9	<u>Fosforilação de tirosina na cadeia γ associada ao FcαRI em neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos</u>	76
4.10	<u>Aumento das concentrações de TNF-α e IL-6 no sangue dos pacientes com bacteremia e correlação da expressão do FcαRI em fagócitos com os níveis de IL-6</u>	78
5	<u>DISCUSSÃO</u>	81
6	<u>CONCLUSÕES</u>	90
7	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	91

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de terapias antimicrobianas é um dos mais notáveis avanços da medicina no último século e está diretamente implicado no aumento da expectativa de vida e da população mundial. Apesar dos progressos no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas a incidência de septicemia tem aumentado nas últimas décadas. O aumento no número de pacientes em extremos etários e imunocomprometidos, das infecções por bactérias resistentes a antibióticos e o desenvolvimento de tecnologias de manutenção da vida, com o uso de procedimentos e dispositivos invasivos, podem explicar este fato. Estima-se que ocorram nos Estados Unidos da América 500.000 casos de sepsis ao ano, com mortalidade média de 35% e com custo de até dez bilhões de dólares ¹⁻³.

As bactérias causadoras de infecções extracelulares são divididas por características de coloração, decorrentes de diferença de composição de seus invólucros, como gram-positivas ou gram-negativas. Metade dos casos de sepsis são causados por bacilos gram-negativos e em metade destes pacientes há bacteremia documentada. O choque séptico é complicação de 50 a 60% das bacteremias por germes gram-negativos e 5 a 10% das bacteremias por germes gram-positivos ^{4,5}.

A septicemia é a resposta sistêmica à infecção severa. A presença no sangue de bactérias ou produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), ou de mediadores inflamatórios, como as citocinas, podem desencadear resposta inflamatória sistêmica e insuficiência de um ou mais órgãos e sistemas. A Sepsis é caracterizada pela evidência clínica de infecção associada a sinais de resposta inflamatória sistêmica. Infecção é a resposta inflamatória à invasão de microorganismo normalmente ausente no tecido. A presença de bactérias no sangue, evidenciada pela positividade de hemoculturas, é

denominada bacteremia. A Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é caracterizada pela presença de febre ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e leucocitose ou leucopenia.^{6,7}

A capacidade de lisados de bactérias gram-negativas mortas pelo calor produzir choque é conhecida há cerca de um século. A identificação da caquetina ou fator de necrose tumoral (TNF) como mediador fundamental da sepsis, no último quarto de século, foi o marco de um período de desenvolvimento do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares da sepsis e da busca de agentes terapêuticos específicos, como os anticorpos para a inativação de LPS e de citocinas. Nenhum agente mostrou-se clinicamente eficaz até o momento e a terapia da sepsis mantém-se fundada no tratamento de suporte das insuficiências orgânicas e da infecção, principalmente através do uso de antimicrobianos⁸⁻¹¹.

A compreensão parcial dos mecanismos moleculares da sepsis é um dos fatores que limitam o desenvolvimento de terapias moduladoras da resposta imune nesta condição. Não falta, no entanto, entusiasmo aos pesquisadores que se dedicam ao tema, o que é atestado pelo volume de literatura científica produzido a cada ano. Trataremos inicialmente dos mecanismos moleculares da sepsis e tentaremos deixar aqui a nossa contribuição.

1.1 Imunidade Inata

A capacidade de defesa do hospedeiro depende de vários elementos (anatômicos, mecânicos, imunidade celular e humoral). O Comprometimento destes elementos aumenta o risco de infecção. Citamos como exemplos: o comprometimento de tegumentos como a pele no queimado e das mucosas no paciente submetido à quimioterapia; Alterações funcionais, como a ineficiência do clareamento muco-ciliar no paciente com fibrose cística, da tosse no doente em coma e do esvaziamento vesical no portador de bexiga neurogênica. O comprometimento da imunidade celular ou humoral, que pode ser inato, como nas deficiências de imunoglobulinas e na imunodeficiência combinada severa, ou adquirido, como na síndrome de imunodeficiência adquirida. Outras condições, como o alcoolismo, o diabetes melito, o uso de drogas imunossupressoras e a desnutrição podem afetar um ou mais destes elementos ¹²⁻¹⁹.

A imunidade inata ou natural consiste em mecanismos de reconhecimento e reação rápida a organismos e substâncias potencialmente nocivas. Alguns lipídeos e açúcares típicos de bactérias são reconhecidos por proteínas solúveis ou associadas à membrana celular em mamíferos. Várias proteínas solúveis de síntese hepática (as proteínas de fase aguda) como a proteína C reativa (PCR) e a proteína amilóide do soro (SAP), se ligam a polissacarídeos bacterianos e são capazes de ativar o sistema complemento e a fagocitose. O fator XII (Hageman) da cascata de coagulação é ativado por resíduos peptideoglicanos e do ácido teicóico, da parede celular de germes gram-positivos, e pelo LPS , ativando a coagulação e levando à clivagem do

cininogênio em bradicinina, que causa vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar^{20,21}.

1.1.1 O complemento

O sistema do complemento é um conjunto de mais de trinta proteínas solúveis ou de superfície celular que, a partir da identificação de imunocomplexos ou de carboidratos bacterianos com os quais pode estabelecer ligações tipo lectina, ativa uma série de proteases que conduzem à polimerização ordenada do complexo protéico de ataque à membrana (MAC), que permeabiliza e promove a lise bacteriana. A ativação do complemento ocorre por vias distintas que convergem para a formação do MAC e dependem da clivagem dos componentes C3 e C5 em C3b e C5b, que são críticos na seqüência de reações proteolíticas e de polimerização. Além disto os C3a e C5a, conhecidos como anafilotoxinas, são mediadores inflamatórios solúveis que causam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e migração e ativação de neutrófilos, além de induzir a produção de citocinas pelos monócitos, como o Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina 1 (IL-1) e a Interleucina 6 (IL-6). Componentes do complemento também podem ativar a coagulação. Os receptores de complemento estão presentes em diversos tipos celulares e são a via efetora de várias funções. O receptor tipo 1 (CR-1) promove a adesão dos complexos de complemento associados a imunocomplexos ou bactérias possibilitando a fagocitose, além do transporte de imunocomplexos pelas hemácias para as células de Küpffer no fígado. O receptor tipo 2 (CR-2) induz o crescimento de células B. Os

receptores tipo 3 e 4 (CR-3 e -4), presentes em fagócitos e células T e NK, possibilitam a fagocitose e desencadeiam a produção de espécies ativas de oxigênio e a citotoxicidade^{20,22-24}.

A via alternativa do complemento é ativada diretamente pelo LPS, por componentes da parede celular de gram-positivos ou pela IgA desnaturada e tem início com a lise do C3. O complemento é efetor de uma resposta imune inata nesta via, que é filogeneticamente anterior à via clássica, que é ativada principalmente pela ligação de componentes do complemento a imunocomplexos das imunoglobulinas G e M (IgG e IgM), e é uma das principais vias efetoras da resposta imune adaptativa humoral. Esta via envolve a formação de complexos protéicos de C1 e de C2 e C4^{20,22,23}.

A Lectina ligada a manose (MBL) é uma proteína oligomérica do soro, produzida pelo fígado, principalmente na resposta de fase aguda, que pertence à família das colectinas, assim como o C1. Estas proteínas se caracterizam pela presença de um domínio colágeno ligado a um domínio lectina tipo C, capaz de se ligar a diversos micróbios com afinidade heterogênea, promovendo sua agregação. A MBL se associa a duas serina-proteases (MASP-1 e MASP-2) que ativam o sistema complemento a partir dos componentes C2 e C4. A MBL também promove a fagocitose através de um receptor de complemento recentemente descrito (C1qR), ao qual se ligam diretamente C1q, a MBL e a proteína surfactante A pulmonar (SPA). Este receptor apresenta um domínio lectina tipo C e 5 domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) e é expresso em células de linhagem mielóide, plaquetas e células endoteliais. Um subgrupo (C1qRO₂-) deste receptor é capaz de desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ROE)²⁵⁻²⁷.

A cápsula das bactérias gram-positivas pode dificultar a ativação do complemento, protegendo estes germes deste mecanismo de defesa do hospedeiro. A deficiência de MBL ou de componentes do complemento expõem seus portadores a um maior risco de adquirir infecções bacterianas. As deficiências de complemento podem ser congênitas ou decorrer do consumo de seus componentes, como no Lupus Eritematoso Sistêmico (LES)^{20,22-27}.

1.1.2 O Lipopolissacarídeo (LPS)

O Lipopolissacarídeo (LPS), também denominado endotoxina, é um componente termo-estável, presente no lisado de bactérias gram-negativas, capaz de desencadear febre, choque e alterações metabólicas típicas da sepsis. O LPS está presente na membrana externa da bactéria e é composto por três porções distintas: O lipídeo A, que lhe confere atividade biológica, é a região intracelular composta por ésteres ou amidas de ácidos graxos, geralmente com 14 a 16 carbonos, ligados a resíduos difosforilados e diglucosaminados, tendo sua composição muito preservada entre as diferentes espécies de bactérias gram-negativas. A região central é transmembranar e é composta por 10 a 12 resíduos sacarídeos ligados ao lipídeo A por uma ligação éster. O antígeno O, hidrofílico e extracelular, é composto por 30 a 100 oligossacarídeos e confere especificidade sorológica às bactérias gram-negativas, além de ativar a via alternativa do complemento^{28,29}.

O LPS é o principal fator de virulência das bactérias gram-negativas. Os monócitos e macrófagos respondem a concentrações de ordem nanomolar do LPS com

a secreção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) e com o aumento da capacidade fagocítica e bactericida. Estas citocinas aumentam a capacidade local de defesa e podem ter efeitos sistêmicos na infecção severa, particularmente o TNF- α e a IL-1 β , produzindo lesão tecidual e insuficiência de órgãos. O LPS promove a proliferação policlonal de linfócitos B, sua diferenciação e a secreção inespecífica de imunoglobulinas. Os neutrófilos respondem ao LPS com aumento da aderência, quimiotaxia, fagocitose, produção de superóxidos e atividade bactericida. As células endoteliais expostas ao LPS aumentam a expressão de moléculas de adesão, produzem citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) e apresentam atividade pró-coagulante³⁰⁻⁴⁰.

1.1.3 Proteínas do hospedeiro relacionadas ao LPS

O CD14 é uma proteína de 55 kDa expressa na membrana de células mielóides através de uma ligação do tipo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), não possuindo porção intracelular. O CD14 solúvel pode se associar à membrana de linhagens celulares que não expressam seu mRNA. Os efeitos biológicos do LPS no organismo ocorrem a partir da ligação deste ao CD14. A transdução de sinal intracelular ocorre através de proteínas associadas de forma não covalente ao CD14, como os Receptores “Toll-like” tipo 2 e 4 (TLR2 e TLR4), que ativam proteínas-quinases, como a MAP-quinase

(proteína-quinase ativada por mitógenos), e o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Os TLR4 e o TLR2 parecem ser, respectivamente, mais importantes para a resposta ao LPS e a componentes da parede de gram-positivos. Estes receptores possuem uma sequência de aminoácidos conservada, presente nos receptores de IL-1 e IL-18 e em proteínas de espécies de vegetais e insetos que participam da defesa contra microorganismos. O receptor de acetil-lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode remover o LPS ligado ao LDL da circulação. O CD11-CD18, uma integrina presente em células fagocíticas, se liga ao lipídeo A, participando da fagocitose⁴¹⁻⁴⁷.

A proteína ligada ao LPS (LBP) presente no plasma se liga com grande afinidade ao lipídeo A, catalisando a transferência do LPS para o CD14, potencializando seus efeitos. A infusão de altas doses de LBP em modelos experimentais proporciona proteção contra a toxicidade do LPS, possivelmente por transferência do LPS para partículas de HDL. A proteína bactericida por aumento de permeabilidade (BPI) sintetizada por neutrófilos apresenta 40% de homologia com a LBP. A BPI apresenta atividade bactericida pela produção de poros na membrana dos germes gram-negativos e neutraliza a toxicidade da LPS^{42,48,49}.

A exposição ao LPS induz um fenômeno de tolerância caracterizado pela diminuição da expressão das citocinas inflamatórias, da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e aumento da produção de receptor solúvel de TNF tipo II (sTNFR-II) e interleucina 10 (IL-10), que têm efeitos antiinflamatórios. Monócitos de pacientes em sepsis, particularmente por germes gram-negativos, têm importante diminuição da produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α *in vitro* após estimulação com LPS. Os monócitos dos pacientes que sobrevivem, ao

contrário dos que não sobrevivem, são capazes de recuperar a capacidade de produção normal de citocinas após estímulo com LPS ^{50,51}.

1.1.4 Resposta do hospedeiro às bactérias gram-positivas.

As bactérias gram-positivas induzem resposta inflamatória pela secreção de toxinas, de superantígenos ou por bacteremia. A pneumolisina é uma toxina que forma poros nas membranas de células do hospedeiro, promove a ativação do complemento e estimula a liberação de citocinas. A toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócica (TSST-1) age como superantígeno ao interagir diretamente com a cadeia V do receptor da célula T (TCR) e com moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) das células apresentadoras de antígeno, levando à secreção maciça de citocinas pela célula T. Os ácidos teicóicos e os peptideoglicanos da parede celular dos gram-positivos se ligam ao CD14 e desencadeiam resposta inflamatória. Os ácidos teicóicos são fosfatos de poli-glicerol ou poli-ribitol. Os peptideoglicanos têm em sua constituição ácido N-acetilmurâmico (NAM) e D-aminoácidos, substâncias ausentes em células eucarióticas. Alguns componentes do pneumococo podem se ligar ao receptor do Fator de agregação plaquetária (PAF). A lectina ligada a manose (MBL) se liga aos ácidos teicóicos e participa da fagocitose das bactérias e da ativação do complemento ⁵²⁻⁵⁸.

1.2 Resposta Inflamatória

1.2.1 Células envolvidas na resposta à infecção

Os neutrófilos, monócitos, macrófagos e células endoteliais são as principais células envolvidas na resposta à infecção bacteriana, da qual também participam as células B, T e NK (“natural killer”) e os mastócitos. Os monócitos e macrófagos são células chave no reconhecimento dos micróbios, no início da resposta inflamatória e na sua regulação. Estas células fagocíticas sensíveis ao LPS produzem TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), Fatores estimuladores de colônia de granulócitos e de macrófagos (G-CSF e GM-CSF), sendo também sensíveis à modulação por TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, Fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), Interferon gama (IFN- γ) e C5a^{69,70}.

Os macrófagos são as principais células do sistema imune envolvidas no processo de fagocitose. A destruição de microorganismo após a fagocitose é mediada pelo metabolismo oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (ROE), ou pela liberação de enzimas lisossomais. As ROE são geradas pela redução da molécula de oxigênio, produzindo água e três intermediários ativos : o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-). Além de sua importância na resposta inflamatória, as ROE provocam peroxidação lipídica e alterações nos ácidos nucleicos⁷¹⁻⁷⁴.

Os neutrófilos produzem TNF- α , IL-1, IL-3 e IL-8 e são altamente responsivos a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, C5a e derivados do ácido aracdônico. São as células efetoras mais abundantes no início da resposta inflamatória. Além da fagocitose, produzem espécies ativas de oxigênio, liberam enzimas lisossomais citotóxicas e participam da modulação da ativação de células B e T ^{20,75-77}.

As células endoteliais produzem IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , endotelina-1, prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e fator de agregação plaquetária (PAF), além de moléculas de adesão, essenciais para a localização da área de inflamação pelas células imunes e sua migração. Plaquetas liberam PAF, Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β , serotonina, prostaglandinas, Tromboxano A₂ (TXA₂) e óxido nítrico (NO) e podem interagir com os neutrófilos para a produção de lipotoxina A₄ (LXA₄), que tem efeito antiinflamatório ^{22,78,79}.

O tecido linfóide associado às mucosas (MALT) é composto por vários tipos de células imunes presentes nas mucosas, nas placas de Peyer e nos linfonodos, que interagem entre si e têm várias funções importantes na resposta imune à infecção, inclusive a produção de anticorpos ⁸⁰.

1.2.1.1 Transdução de sinal intracelular

A transdução de sinal intracelular ocorre a partir da associação de um ligante, como o LPS ou uma citocina, ao seu receptor, fazendo com que ocorram modificações da estrutura quaternária do receptor. Esta modificação estrutural se transmite à porção intracelular do receptor ou a proteínas a ele associadas, possibilitando, por exemplo, a

exposição de sítios de fosforilação. Pode ser necessária para a transdução de sinal a internalização de parte do receptor e do ligante. A fosforilação de proteínas é catalisada por enzimas chamadas quinases. A JAK2 quinase (Janus quinase) associada aos receptores de IL-6 e IL-12, fosforila proteínas que se deslocam para o núcleo e se ligam a outras proteínas que estão fisicamente associadas ao DNA. Proteínas com atividade mitógena (MAP quinases), associadas ao CD14 e ao receptor de IL-1, são outro importante elemento de transdução de sinal do citosol e sua ativação envolve sua própria fosforilação anteriormente à fosforilação de seus alvos. A Tirosina quinase (TRK), associada aos receptores de células T (TCR) e de antígeno de células B, ativam fosfolipases, que hidrolisam fosfatidil-inositol trifosfato a inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Esta seqüência de ativação também ocorre através de proteínas G ligadas a receptores. O DAG aumenta a proteína quinase C (PKC), que fosforila componentes do complexo NF- κ B. A via da esfingomielina, relacionada ao receptor de TNF, envolve uma esfingomielinase neutra (SMase) da membrana plasmática, que hidrolisa esfingomielina (SM) a ceramida e fosfocolina. A ceramida age como segundo mensageiro, ativando proteínas quinases e fosfatases, que, ao contrário das quinases, desfosforilam proteínas. Participam da transdução de sinal decorrente da ligação do complexo LPS-LBP ao CD14 a fosfolipase C e a proteína quinase C (PKC). Algumas citocinas inflamatórias ativam estas mesmas proteínas, com efeitos biológicos semelhantes. A ativação de receptores com a seqüência “Toll / IL-1R” (TLR4, IL-1R), envolve várias proteínas como a MyD88, quinases associadas aos receptores de IL-1 (IRAK) e TNF (TRAF6) e a IKK, a quinase do I κ B^{35,45,59,60}.

Várias proteínas foram identificadas como elementos de ativação *Trans*, que se ligam a componentes *Cis* Presentes no DNA. O NF- κ B é o elemento de ativação *trans*

melhor estudado. Na célula não estimulada o NF- κ B esta presente como um complexo trimérico dos componentes p65, p50 e I κ B, um inibidor. A proteína quinase C (PKC) fosforila o I κ B, dissociando-o do complexo trimérico. Sem a presença do inibidor o NF- κ B move-se do citosol para o núcleo, onde se liga a um sítio específico. Este sítio de ligação está localizado na porção promotora (5') da sequência de codificação de citocinas, entre as quais o TNF- α ⁶¹⁻⁶⁴.

Ocorre elevação do cálcio intracelular em neutrófilos na sepsis e este evento está associado ao início da produção de superóxidos, secreção de enzimas e a transição da actina gel a sol, que tem importância na mobilidade da membrana celular. Outro mediador intracelular na sepsis é o mononucleotídeo-fosfato de adenosina cíclico (cAMP), cuja concentração intracelular é aumentada pela prostaglandina E₂ (PGE₂). O aumento do cAMP está associado à diminuição da síntese de TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-2 e ao aumento da síntese de IL-10 e IL-6, com efeitos antiinflamatórios e de estímulo para a diferenciação de células T auxiliares (CD4+/CD8-) imaturas (Th0) para células Th2 ⁶⁵⁻⁶⁸.

1.2.2 A resposta inflamatória à infecção

A resposta inflamatória à infecção compreende o reconhecimento da contaminação microbiana, a liberação de moléculas de sinalização, o recrutamento de efetores celulares, a destruição dos micróbios, o metabolismo dos tecidos lesados e a restauração da integridade tecidual. A lesão tecidual e destruição bacteriana ocorrem inicialmente pelo recrutamento de neutrófilos. A nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato (NADPH) oxidase gera espécies reativas de oxigênio (ROE), que são o maior mecanismo de lesão tecidual e destruição bacteriana. Enzimas dos grânulos dos neutrófilos são capazes de digerir proteínas intersticiais e da membrana basal, facilitando a migração direta e permitindo a digestão do tecido lesado. A elastase degrada uma série de proteínas funcionalmente importantes encontradas no sítio de inflamação, como os componentes do complemento, das cascatas de coagulação e da cinina⁸¹⁻⁸⁴.

Citocinas derivadas de monócitos e macrófagos são importantes mediadores da resposta inflamatória, além de participar do reparo dos tecidos. O TNF- α , as IL-1, IL-6 e IL-8 ativam as células de defesa, levando à liberação de outras citocinas e mediadores da resposta inflamatória, como os derivados do ácido aracdônico (PGE₂ e TXA₂), peptídeos vasoativos (bradicinina e angiotensina), o PAF, aminas (histamina e serotonina), óxido nítrico (NO) e derivados do complemento. Vários destes mediadores têm funções redundantes. Os mediadores inflamatórios ajudam a recrutar para o sítio da injúria neutrófilos, monócitos, macrófagos, células T e B e plaquetas, além de facilitar a mobilização de moléculas solúveis como os fatores de coagulação, componentes do complemento e imunoglobulinas^{20,85}.

A resposta inflamatória é acompanhada de uma resposta antiinflamatória que ocorre pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de seus receptores e pelo aumento da produção de IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF- β , receptor solúvel de TNF- α e do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). Esta resposta antagonica serve à circunscrição local do processo. Uma resposta compartimentalizada pode deter o insulto infeccioso, como pode não ser suficiente para impedir a

disseminação do processo ou pode ainda ser suficientemente intensa para que exerça efeitos a distância, como na resposta inflamatória sistêmica da sepsis⁸⁵⁻⁸⁷.

1.2.2.1 *A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)*

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) secundária à infecção, ou septicemia, é um processo contínuo no qual os mediadores inflamatórios produzidos atuam a distância do sítio de infecção, ativando leucócitos, endotélio e coagulação, alterando as funções de órgãos como o fígado e o coração, produzindo as alterações metabólicas e hemodinâmicas que compõe a síndrome. Ocorrem : A agregação das plaquetas, comprometendo a microcirculação e causando má distribuição do fluxo sanguíneo, isquemia e injúria por reperfusão; A ativação da coagulação, por inibição das proteínas C e S e ativação do fator de Hageman; A ativação da bradicinina, um potente hipotensor. O óxido nítrico (NO), produzido por células endoteliais e pelos macrófagos, também contribui para a hipotensão. A disfunção endotelial leva à perda de líquido dos vasos para os tecidos, diminuindo o volume intravascular e piorando a perfusão tecidual. Os neutrófilos ativados tornam-se aderentes uns aos outros e ao endotélio vascular e produzem derivados do ácido aracdônico, enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio que geram fenômenos vasoativos locais adicionais^{7,20,22,33,87-93}.

A ineficiência do tratamento de suporte e a incapacidade do organismo em restabelecer a homeostase levam à falência de múltiplos órgãos e sistemas (MODS), que tem alta mortalidade. A SIRS se autolimita pela depressão da série monocítica, com uma resposta antiinflamatória que, quando excessiva, aumenta o risco de

infecção. A Elevação persistente dos níveis séricos de citocinas inflamatórias ou antiinflamatórias se correlaciona com a mortalidade na sepsis^{22,33,92,93}.

1.2.3 Mediadores inflamatórios

1.2.3.1 *Citocinas*

As citocinas são proteínas que agem nas células como modificadores de resposta biológica, levando a inibição ou estímulo para a produção de substâncias, o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a apoptose. Seus efeitos podem ser autócrinos, parácrinos e endócrinos, podendo ser antagônicos em uma mesma célula, dependendo do estado de ativação e do micro-ambiente. Há similaridade estrutural entre várias citocinas, bem como entre seus receptores. As Interleucinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7 e IL-13 e o GM-CSF, por exemplo, pertencem à subfamília da cadeia curta 4- α hélice e as IL-6, IL-11 e IL-12 e G-CSF pertencem à subfamília da cadeia longa 4- α hélice. Os receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15, GM-CSF e G-CSF pertencem à família dos receptores de citocina do tipo 1, cuja molécula prototípica é a do hormônio de crescimento e que possui um domínio extracelular com 2 cisteínas conservadas e uma sequência Trp-Ser-X-Trp-Ser^{69,94,95}.

A presença de receptores específicos e a variação da sua expressão define a sensibilidade das células às citocinas. O aumento rápido da expressão dos receptores pode ocorrer por exocitose de receptores pré-formados. A diminuição da expressão pode ocorrer por internalização ou por clivagem proteolítica, que gera formas solúveis.

Os receptores solúveis de IL-4, IL-7, IL-10 e TNF- α tendem a inibir a atividade dos seus ligantes, ao contrário do receptor solúvel de IL-6, que aumenta a atividade da citocina. Alguns receptores compartilham componentes, o que explica o fato de que as citocinas podem ativar as mesmas vias intracelulares e provocar respostas celulares similares^{60,94}.

O organismo produz, em resposta às bactérias, TNF- α e IL-1, que são mediadores inflamatórios primários e induzem a produção de IL-6, IL-8 e IL-12, que são importantes na resposta inflamatória e de fase aguda. As IL-4, IL-10 e IL-13 são componentes principais da resposta antiinflamatória. Ocorre também a produção de fatores de crescimento celular como o GM-CSF e G-CSF.

1.2.3.1.1 Fatores de necrose tumoral (TNF)

O TNF- α é uma proteína de membrana de 26 kDa que, clivada por metaloproteinases, se torna um peptídeo solúvel de 17 kDa cujo trímero é biologicamente ativo. Ele é produzido por monócitos e macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e T. Seu mRNA está presente em células de tecidos saudáveis, possibilitando o encurtamento do tempo de liberação a partir do estímulo. É a primeira citocina liberada em resposta a endotoxina nos monócitos e macrófagos, com um pico em 1 a 2 horas após a infusão de LPS, tornando-se indetectável em 4 a 6 horas. Camundongos resistentes ao LPS não sintetizam o TNF- α em resposta ao LPS, mas a infusão do TNF- α nestes animais reproduz os efeitos da sepsis. Além do LPS e de componentes de bactéria gram-positivas sua liberação é estimulada por TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ , PAF e C5a, sendo inibida por IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β ,

corticoesteróides e por substâncias que aumentam o AMP cíclico (cAMP) intracelular, como a PGE₂, os inibidores da fosfodiesterase e os agonistas β 2 adrenérgicos. A PGE₂ induz a produção de TNF- α em monócitos não ativados e a inibe em monócitos ativados. O TNF- α induz a liberação de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PAF, eicosanóides, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e receptor de TNF solúvel (TNFR solúvel). Este padrão de liberação de agonistas e antagonistas inflamatórios é comum às citocinas. O TNF- α é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos e induz a proliferação, a produção de IL-1 e de moléculas de adesão por células endoteliais. Ele induz hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de neutrófilos nos pulmões, anorexia, diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, dano à mucosa intestinal, hiperglicemia, alterações no perfil lipídico, acidose, coagulação e, por ação direta no hipotálamo, hiperpirexia ^{10,22,75,76,96-104}.

Os receptores de TNF- α (TNFR) do tipo I (TNFR-55, CD120a) e tipo II (TNFR75, CD120b) ativam a produção do NF- κ B e de ceramidas por esfingomielinases. Eles não têm capacidade intrínseca de fosforilação da tirosina. Acredita-se que a transdução de sinal envolva os fatores associados ao TNFR (TRAFs) e as proteínas associadas ao domínio da morte do TNFR-55 (TRADD). O TNFR-I está envolvido com a citotoxicidade e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. O TNFR-II pode transportar o ligante para o TNFR-I. A Clivagem proteolítica destes receptores produz formas solúveis (TNFRs), que neutralizam o TNF- α circulante, mas, em baixas concentrações, podem aumentar sua meia-vida e atividade biológica. A modulação da resposta imune pelos TNFR na endotoxemia experimental se dá pela diminuição transitória da expressão dos receptores nos

monócitos e neutrófilos, tornando-os menos sensíveis ao TNF- α , e pela liberação de TNFR solúvel^{63,95,99,100,105}.

1.2.3.1.2 *Interleucina 1*

A interleucina 1 (IL-1) tem duas formas com pontos isoeletrônicos diferentes e que são codificadas por genes distintos, a IL-1 α e a IL-1 β . Ambas possuem precursores de 31 kDa processados em peptídeos de 17 a 22 kDa e são produzidas no citoplasma de monócitos e de células epiteliais e endoteliais. A IL-1 α é ativa na membrana celular, enquanto a IL-1 β , menos ativa, é liberada por clivagem pela enzima conversora de IL-1 β (ICE), respondendo pelos efeitos endócrinos da citocina. A expressão da IL-1 é estimulada pelo LPS, ácido teicóico, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, IFN- γ , TGF- β . As IL-4, IL-10, IL-13, PGE₂, corticoesteróides e cAMP inibem sua liberação. A produção de IL-1 pode ter modulação autócrina ou pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Vários de seus efeitos biológicos são semelhantes e sinérgicos aos do TNF- α mas ela não é capaz de induzir sozinha lesão celular ou apoptose. A IL-1 estimula a sua própria liberação e a de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , PAF, eicosanóides e Fatores estimuladores de colônia. Ela induz a ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, a expressão de moléculas de adesão no endotélio, a coagulação, hipotensão, febre e anorexia^{22,106,107}.

O receptor de IL-1 tipo I (IL-1rI, p80) tem domínios imunoglobulina extracelulares e uma sequência “Toll-like” intracelular e é expresso em variados tipos celulares. A transdução de sinal deste receptor depende da associação com uma proteína acessória e envolve a fosforilação de quinases e o NF- κ B. O IL-1rII (p68) expresso em células B e neutrófilos tem maior afinidade pela IL-1 β que o IL-1rI e não

induz resposta biológica, sendo considerado um regulador negativo da atividade de IL-1 β . O IL-1rII pode existir na forma solúvel, neutralizando a IL-1 β , e sua liberação pode ser induzida *in vitro* pelo LPS, TNF- α , IL-4 e glicocorticóides. A IL-1 induz diminuição da expressão dos IL-1r e dos TNFR. O antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), que se liga aos IL-1r sem desencadear a transdução de sinal, é produzido pelas mesmas células que produzem a IL-1, inclusive nas infecções bacterianas, e é outro regulador negativo da atividade de IL-1^{102,106-109}.

1.2.3.1.3 Interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) é uma proteína glicosilada com peso de 22 a 29 kDa, produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, B e T, megacariócitos, queratinócitos, astrócitos, fibroblastos e neutrófilos. Sua produção é induzida por TNF- α , IL-1, por IFN- γ , sendo inibida por IL-4, IL-10 e IL-13. A IL-6 é a maior indutora de produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, induzindo também o catabolismo protéico e a hiperpirexia. Sua interação com outras citocinas (IL-12, IL-4 e IL-5) possibilita tanto a produção de anticorpos por células B quanto a diferenciação de células T e NK citotóxicas. A infusão de IL-6 causa febre, mas não hipotensão. A IL-6 inibe a produção de TNF e IL-1 induzida por LPS em monócitos *in vitro* e induz um aumento do TNFR solúvel e do IL-1ra, com efeitos antiinflamatórios. Há correlação de seus níveis séricos com a mortalidade na sepsis^{77,102,110-113}.

O receptor de IL-6 pertence à família dos receptores de citocina do tipo 1, que têm um domínio imunoglobulina extracelular, além de vários resíduos de prolina e serina no domínio intracelular, que devem ser alvo de quinases. Este receptor não tem

atividade intrínseca de tirosina-quinase e está associado a várias famílias de quinases, como as Janus quinases (Jak quinases) e proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (proteínas STAT). A cadeia alfa do receptor, à qual se liga a IL-6, aumenta sua afinidade ao ligante quando associada à cadeia beta (gp130), que permite a transdução de sinal. As cadeias alfa e beta se associam por pontes dissulfídicas na porção extracelular somente quando ligadas à IL-6. A ligação da citocina à forma solúvel do receptor (IL-6rs), que é a porção extracelular da cadeia alfa, pode se associar à cadeia beta e efetuar a transdução de sinal ^{69,114,115}.

1.2.3.1.4 Interleucina 8

A interleucina 8 (IL-8) é uma proteína de 8 kDa, pertence à família das quimiocinas (ou citocinas quimiotáticas), proteínas catiônicas de 70 a 100 aminoácidos que têm 4 cisteínas amino-terminais envolvidas por duas pontes dissulfídicas. É produzida por macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, hepatócitos e megacariócitos (plaquetas), tendo sua liberação induzida por LPS, IL-1, IL-12 e TNF- α e inibida por IL-4, IL-10 e IL-13. Ela tem efeito quimioatraente e ativador sobre neutrófilos, regulando a adesão e migração trans-endotelial e induzindo a liberação de enzimas e a produção de superóxido. A infusão de IL-8 causa granulocitopenia inicial seguida por granulocitose. Seus dois receptores, IL-8ra e IL-8rb, são proteínas G que ativam a fosfatidil-inositol fosfolipase C e várias proteínas-quinases, como a proteína quinase C (PKC), com mobilização de estoques intracelulares de cálcio. Outras quimiocinas também se ligam ao IL-8rb ¹¹⁶⁻¹²⁰.

1.2.3.1.5 *Interleucina 12*

A interleucina 12 (IL-12) é composta por 2 unidades (p35 e p40) codificadas por genes diferentes, ligadas por pontes dissulfídicas. A p35 tem homologia com a IL-6 e a p40 tem homologia com o IL-6R. A p40 permite a ligação da citocina ao receptor, enquanto a p35 é crítica para a transdução de sinal, que envolve as quinases Jak e STAT4. Dímeros da p40 se ligam ao receptor sem correspondente transdução de sinal, agindo como um antagonista. A IL-12 é produzida por monócitos e células dendríticas. Seus receptores são heterodímeros de proteínas que têm domínios com 2 cisteínas e seqüências Trp-Ser-X-Trp-Ser e estão presentes em células T, NK e em algumas populações de células B. Ela induz a produção de IFN- γ em células NK e T e é um fator de crescimento de células T com efeitos similares aos da IL-2. A IL-12 promove a diferenciação de células T auxiliares (CD4+/CD8-) imaturas Th0 a Th1 e, em sinergismo com a IL-2, induz a proliferação de células B e monócitos. Ela age em células T e NK induzindo a liberação de IL-2, IL-3, IL-8, IL-10, TNF- α , M-CSF, GM-CSF e IFN- γ e inibindo a produção de IL-4. Sua produção é inibida por IL-4, IL-10 e IL-13. Camundongos com deleção do gene que codifica a p40 tem diminuição da produção do IFN- γ e diminuição da ativação macrofágica e da imunidade celular. O IFN- γ potencializa a síntese da IL-12 e é o mediador de muitos de seus efeitos. Infusão de IL-12 em chimpanzés leva a ativação tardia de muitos dos mecanismos inflamatórios da sepsis, sugerindo um papel desta citocina na manutenção da resposta inflamatória sistêmica. A IL-12 proporciona uma ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, favorecendo o desenvolvimento de respostas imunes específicas, agindo como um adjuvante endógeno (adjuvantes são produtos bacterianos

que recrutam e ativam macrófagos e servem para aumentar a resposta imune específica para um antígeno co-administrado)^{94,121-125}.

1.2.3.1.6 *Interleucina 18*

A IL-18 é uma citocina estruturalmente similar a IL-1 β , produzida por monócitos e macrófagos induzida pelo LPS. Ela estimula a produção de IL-2, GM-CSF e TNF- α por células T e inibe a produção de IL-10. A IL-18 induz a produção de TNF- α e quimiocinas, além de moléculas de adesão. Ela induz a produção de IFN- γ por células T e NK. Camundongos com deleção do gene da IL-18 ou da ICE, que é necessária para a liberação da citocina, produzem muito pouco IFN- γ em resposta ao LPS, mesmo com a presença da IL-12. A produção de IFN- γ por IL-18 é mediada pela ativação do promotor AP-1, enquanto a IL-12 ativa o STAT4 e depende de um segundo sinal. As duas citocinas têm ação sinérgica na produção de IFN- γ . O IL-12 aumenta a expressão do receptor da IL-18 (IL-18R), que também é estruturalmente similar ao IL-1RI. Os níveis séricos de IL-18 estão aumentados na sepsis. Camundongos com deleção do gene da IL-18 desenvolvem, em relação aos controles, artrite séptica por *Staphylococcus aureus* mais intensa, com menor chance de desenvolvimento de septicemia pelo mesmo germe¹²⁶⁻¹²⁸.

1.2.3.1.7 *Interleucinas 4 e interleucina 13*

A interleucina 4 (IL-4) tem 20 kDa e é sintetizada principalmente por células T auxiliares (CD4+/CD8-) e, assim como a IL-10 e a IL-13, ela inibe a liberação das

citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, G-CSF e GM-CSF pelos monócitos. Ela ativa a produção do ácido 15-s-hidroxi-eicosatetraenóico (15-s-HETE) e da lipotoxina A₄ (LXA₄) pela 15-lipoxigenase. Estes metabólitos do ácido aracônico têm efeitos antiinflamatórios. Ela inibe a expressão dos TNFR em monócitos e estimula a produção do IL-1ra. Sua produção é estimulada pela PGE₂ e inibida pela IL-12. Ela estimula o crescimento e diferenciação de células B e T, sendo necessária para que linfócitos produzam as IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, GM-CSF e a si própria. A IL-4 estimula a adesão dos linfócitos ao endotélio (pela VCAM-1) e induz a expressão de antígenos MHC classes II em macrófagos. Ela participa da diferenciação de células T auxiliares com fenótipo Th0 para o fenótipo Th2. O receptor de IL-4, de 130 kDa, pertence à família dos receptores de citocina tipo I e ativa as quinases Jak e STAT6. A IL-13 também se liga ao receptor de IL-4 em células não linfóides, o que confere similaridade de efeitos destas citocinas, excluindo a diferenciação de células B e T. A interleucina 13 (IL-13) tem 15 kDa, com 30% de homologia com a IL-4 e significativa homologia funcional. Produzida por células T CD4⁺, inibe a produção de citocinas inflamatórias por monócitos, induz a via da 15-lipoxigenase e aumenta a liberação do IL-1ra e a expressão de moléculas de adesão em monócitos^{22,66,73,126-136}.

1.2.3.1.8 Interleucina 10

A interleucina 10 (IL-10) de 18 kDa é produzida por células B e T auxiliares, monócitos e macrófagos estimulados por produtos bacterianos, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, e ativação do receptor Fc de IgG tipo I (Fc γ RI, CD64) tendo como alvos células B, T, NK e macrófagos. Ela é capaz de inibir muitos dos efeitos do IFN- γ em

macrófagos e de inibir a produção de IL-1, de TNF- α , de NO, a expressão de moléculas do MHC classe II, a expressão de moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 e a apresentação de antígenos por monócitos e macrófagos. Ela inibe a síntese de citocinas por células NK e T. A IL-10, em sinergia com a IL-2, é um fator de crescimento de células B e T. Assim como a IL-4, ela inibe a liberação de IL-6, IL-8 e IL-12 e aumenta a liberação de IL-1ra. A IL-10 tem efeito inibitório sobre a imunidade inata e imunidade específica mediada por células T. Seu receptor pertence à família dos receptores de citocina classe II, como o receptor de IFN- γ , e se oligomerizam na presença do ligante, ativando as quinases jak e STAT. Ela é detectável no soro de mais de 80% dos pacientes com sepsis severa^{76,94,102,137-141}.

1.2.3.1.9 Outros mediadores celulares

Os fatores estimuladores de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF, de 22 kDa), de monócitos (M-CSF de 40 kDa) e de granulócitos (G-CSF de 19 kDa) são produzido por macrófagos, células T ativadas, megacariócitos, células endoteliais e fibroblastos. Além de sua atividade na medula óssea, estimulando a produção das células mielóides, estimulam a fagocitose, a degranulação e a citotoxicidade em neutrófilos e macrófagos. O G-CSF é detectável no sangue de pacientes com infecções apresentando, além de efeitos estimuladores da fagocitose no sítio de infecção, efeitos endócrinos na medula óssea, participando da homeostase dos granulócitos^{22,111,142,143}.

O fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) é produzido por plaquetas, macrófagos e linfócitos T. É um quimioatraente de monócitos e estimula nestas células sua própria produção, a de IL-1 e de TNF- α . Ele inibe a adesão de neutrófilos e a

proliferação de células T e B, além de promover o crescimento de células de reparo. O TGF- β é uma das citocinas envolvidas na mudança do isotipo da porção Fc em células B para IgA. A interleucina 15 é uma proteína de 17 kDa produzida por fagócitos mononucleares em resposta a infecções virais e ao LPS, promovendo a proliferação de células NK. É estruturalmente homologa a IL-2 e compartilha um de seus receptores ^{22,76,142-145}.

1.2.3.2 Derivados do ácido aracdônico e o fator de agregação plaquetária (PAF)

Os eicosanóides são moléculas de ácidos graxos poli-insaturados de 20 carbonos sintetizados pelos leucócitos e outras células a partir do ácido aracdônico por enzimas como a ciclo-oxigenase e a 15-lipoxigenase. A Prostraglandina E₂ (PGE₂) sintetizada por fibroblastos, células epiteliais e macrófagos em resposta a IL-1, IL-6, TNF- α , complemento e ativação de receptores Fc de imunoglobulina, inibe a proliferação de células B e T, a secreção de IL-12 e a expressão de antígenos de classe II do MHC em monócitos, suprimindo a apresentação de antígenos para as células T. O leucotrieno B₄ (LTB₄) é o primeiro quimioatraente de neutrófilos gerado por macrófagos e neutrófilos após a estimulação por LPS, tendo efeito no aumento da adesão ao endotélio. O 15-s-HETE e o LXA₄ têm efeitos antiinflamatórios, antagonizando e diminuindo a produção de LTB₄. Os derivados do ácido aracdônico causam vasodilatação, agregação plaquetária e ativação de neutrófilos. Suas concentrações encontram-se aumentadas no sangue de pacientes com choque séptico, sugerindo envolvimento destas moléculas na fisiopatologia desta condição clínica ^{21,67,88,130,146-151}.

O fator de agregação plaquetária (PAF) é um glicopeptídeo produzido por neutrófilos, macrófagos, plaquetas, células endoteliais, epiteliais e NK, com efeito na anafilaxia e hiper-reatividade vascular, tendo sua produção induzida por $\text{TNF-}\alpha$ e sendo atuante na sepsis. Ele promove a agregação plaquetária, tem efeito inotrópico negativo e aumenta a permeabilidade vascular, além de induzir a produção de IL-1 e IL-2, $\text{TNF-}\alpha$, LTB_4 e TXA_2 ^{22,152}.

1.2.3.3 Moléculas de adesão

O processo de adesão é essencial para a localização do sítio de inflamação pelos leucócitos. As moléculas de adesão estão envolvidas com a quimiotaxia, fagocitose, citotoxicidade e regulação da resposta à infecção. Ocorre na sepsis a ativação sistêmica da adesão que parece ter participação na lesão tecidual. O bloqueio da adesão em modelos experimentais de sepsis previne a injúria tecidual, mas estudos clínicos não demonstraram aumento da sobrevida quando da utilização destes bloqueadores. O processo de migração dos neutrófilos através do endotélio envolve tipicamente os estágios de “homing”, no qual há a identificação do sítio da injúria, “rolling”, no qual há diminuição da velocidade e início do processo de adesão e do qual participam principalmente as selectinas, e a adesão firme e transmigração, que envolvem as moléculas de adesão intercelular (ICAM), que pertencem à família das imunoglobulinas, e as integrinas^{21,78,153-155}.

1.2.3.3.1 Moléculas de adesão da família das imunoglobulinas

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54), que permite a ligação do endotélio aos monócitos, neutrófilos, e células T, é uma das moléculas de adesão pertencentes à família das imunoglobulinas. Sua expressão é aumentada por LPS, TNF- α e IL-1. Seu ligante é o complexo CD11A/CD18 e CD11B/CD18. A molécula de adesão intercelular 2 (ICAM-2 ou CD102) se liga ao CD11A/CD18, possibilitando a ligação do endotélio aos fagócitos e células T. A molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) tem sua expressão aumentada por LPS, TNF- α , IL-1 e IL-4 e permite a ligação do endotélio a células que expressam o antígeno VLA-4, como os linfócitos e monócitos^{78,153,156,157}.

1.2.3.3.2 As Integrinas

As Integrinas são heterodímeros dos componentes alfa e beta. As integrinas beta 2 têm três cadeias alfa distintas, porém relacionadas (CD11 A, B e C), e uma cadeia beta comum (CD18), participando da adesão celular e da ativação e proliferação de leucócitos. A capacidade de adesão depende da ativação do heterodímero. O CD11A/CD18 ou antígeno funcionalmente associado a linfócitos -1 (LFA-1) é expresso em células NK e T, monócitos e neutrófilos e se liga às ICAM-1, 2 e 3. O CD11B/CD18 é expresso em monócitos, neutrófilos e células NK e se liga à ICAM-1, LPS, fator X, frações do complemento, fibrinogênio e L-selectina. Ela age em neutrófilos induzindo a agregação, aderência, quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas proteolíticas. Sua expressão é aumentada

por LTB₄ e C5a, que são quimioatraentes, e pelo TNF- α , sendo constitutiva em neutrófilos e aumentada com a sua ativação. O CD11C/CD18 é expresso em células NK, monócitos, neutrófilos e alguns linfócitos, tendo como ligantes o C3bi e o fibrinogênio. Esta molécula, cuja expressão é aumentada pelo TNF- α , é liberada por grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos após sua ativação por quimioatraentes como LTB₄ e C5a. As integrinas alfa 4 são expressas em linfócitos e monócitos, mas não em neutrófilos, tendo como ligantes a VCAM-1 e as fibronectinas. Estas moléculas iniciam o contato e dão suporte para a adesão e transferência dos linfócitos para o sítio de inflamação^{78,153,157-162}.

1.2.3.3.3 *As Selectinas*

As selectinas são glicoproteínas que têm uma estrutura molecular comum, com uma região transmembranar, uma curta porção intracelular e uma porção extracelular com um domínio lectina cálcio-dependente N-terminal, domínios regulatórios de complemento e um domínio de fator de crescimento epidermal (EGF). O domínio lectina é essencial para a adesão celular e o domínio EGF parece ter papel regulatório. Ao contrário da porção extracelular, não existe homologia entre as porções intracelulares das diferentes selectinas, sugerindo diferenças funcionais. A selectina E é expressa em células endoteliais ativadas por TNF- α , IL-1 β e LPS, permitindo sua ligação aos neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e células T de memória. Seus ligantes são carboidrato de glicoproteínas e glicolipídeos, sendo sujeitas à clivagem protéica e podendo existir livres no plasma. A selectina P é encontrada em plaquetas e no endotélio, permitindo a adesão aos neutrófilos e monócitos. A selectina L é

expressa por células progenitoras hematopoéticas e tímócitos imaturos, neutrófilos, monócitos, e algumas células NK e linfócitos. É constitutiva e funcional em neutrófilos não ativados, havendo redução de sua expressão após a diapedese e pela ação de quimioatraentes, como o IL-8. A clivagem proteolítica pode permitir a modulação de resposta pelo desligamento de leucócitos do endotélio e pela liberação de selectina L solúvel, que em altas concentrações pode inibir a adesão de leucócitos ao endotélio. A selectina L pode levar ao aumento do cálcio intracelular e à ativação da produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos^{78,150,156,157,160-167}.

1.3 Imunidade adaptativa

1.3.1 Maturação de células T. Imunidade humoral e imunidade celular.

A imunidade adaptativa ou adquirida, ao contrário da imunidade inata ou natural, desenvolve respostas imunes contra antígenos específicos. O desenvolvimento de resposta celular ou humoral específica depende da interação de vários tipos celulares, particularmente das células T. As células T auxiliares (CD4+/CD8-) Th0 são um fenótipo parcialmente diferenciado que pode originar dois fenótipos distintos pelo padrão de produção de citocinas e conseqüente papel na imunidade adaptativa. O fenótipo Th1 depende da exposição a IL-12, levando à produção de IFN- γ e TNF- α , possibilitando a ativação de macrófagos, efetores da imunidade celular. O fenótipo Th2

depende da exposição a IL-4 e possibilita o desenvolvimento da imunidade humoral. A diferenciação em um ou outro fenótipo depende de características do antígeno e de sua apresentação, bem como fatores do micro ambiente, como a presença de adjuvantes e de citocinas ^{131,168,169}.

Após a fase inicial na sepsis, há depressão da imunidade celular e existem evidências de predomínio do fenótipo Th2 em pacientes e modelos experimentais. Tanto as IL-4 e IL-10 quanto a IL-12 são produzidas na sepsis. A IL-6 pode induzir aumento da produção de IL-4 nas células Th0. Pacientes com choque séptico apresentam IL-10 aumentada no plasma. Pacientes cujos monócitos produzem menor quantidade de IL-12 anteriormente à realização de cirurgias abdominais têm maior risco de sepsis no pós-operatório. Camundongos com deficiência de IL-4 apresentaram maior clareamento bacteriano, com menor mortalidade por sepsis e menor gravidade de artrite induzida pela injeção de *Staphylococcus aureus*. Camundongos com deficiência do receptor de IFN- γ apresentam mortalidade aumentada após a indução de sepsis abdominal. O uso de anticorpos monoclonais anti- IL-10 anteriormente à indução de sepsis em ratos aumenta a produção de TNF- α e a mortalidade. A ativação do receptor de porção Fc de IgG tipo I (Fc γ RI) em macrófagos leva a um aumento da liberação de IL-10 e diminuição da liberação de IL-12, com reversão do padrão de citocinas pró-inflamatórias, em um modelo experimental de infecção. É razoável considerar que a resposta mais adequada às infecções extracelulares por bactérias deva envolver elementos tanto da imunidade celular quanto humoral ¹⁷⁰⁻¹⁷⁷.

1.3.2 Imunoglobulinas e Imunidade humoral

As cinco classes de imunoglobulinas (IgD, IgM, IgG, IgA e IgE) têm grande homologia estrutural e são produzidas por células B maduras, os plasmócitos. Uma molécula de imunoglobulina possui duas cadeias pesadas (H) ligadas entre si por pontes dissulfídicas, sendo que cada uma destas está ligada por pontes dissulfídicas a uma cadeia leve (L). As cadeias pesadas estão associadas às cadeias leves na porção N-terminal da molécula, que é a região variável à qual se ligam os antígenos. A porção C-terminal, denominada fração Fc, é específica para cada classe de imunoglobulina e nela se localizam os sítios de ligação ao complemento e aos receptores Fc. O Fragmento F(ab')₂ da imunoglobulina é obtido por digestão pela pepsina e inclui as porções variáveis de ligação ao anticorpo e região de dobradiça e exclui a fração Fc. Os domínios imunoglobulina são compostos por cerca de 110 aminoácidos, com duas camadas de β -lâminas e três ou quatro fitas de peptídeos antiparalelos. Várias proteínas, como os receptores Fc de imunoglobulinas (FcR), o receptor de célula T (TCR), as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II, algumas moléculas de adesão (ICAM-1 e 2, VCAM-1) e o receptor de interleucina 1 (IL-1R) apresentam domínios imunoglobulina^{94,178}.

Células B imaturas expressam IgM e IgD com uma região variável específica em sua superfície. A interação com antígenos específicos e com outras células e mediadores imunes leva à proliferação e diferenciação destas células, que passam a produzir anticorpos específicos, inicialmente da classe IgM e posteriormente, mediante modificação na transcrição da porção Fc, das classes IgA, IgE ou IgG. Os anticorpos neutralizam antígenos, impedindo sua penetração e ação no organismo, podem ativar o

complemento, possibilitando a lise bacteriana ou a fagocitose via receptor de complemento. As IgA, IgG e IgE possuem receptores específicos para as porções Fc, que permitem a fagocitose e o clareamento de imunocomplexos, bem como a produção e liberação de citocinas, de outras proteínas, de espécies reativas de oxigênio e a citotoxicidade mediada por anticorpo. As imunoglobulinas podem exercer efeitos modulatórios negativos na resposta imune, seja por interações anti-idiotípicas ou pela ligação a alguns dos receptores Fc. A IgM se liga ao complemento e exerce suas funções efetoras pela ativação da via clássica ou pela ligação aos receptores do complemento ^{94,179}.

A IgG corresponde a 80% das imunoglobulinas do sangue no homem, com uma meia vida de até 23 dias. Existem quatro subclasses de IgG, que se distinguem pela capacidade de ativação do complemento, suscetibilidade a proteólise e capacidade de ligação aos receptores Fc. A IgG e o componente C3 do complemento são as principais opsoninas do sangue, capazes de se ligar e recobrir a superfície de partículas ou microorganismos, preparando-os para a fagocitose, que ocorre pela ligação deste complexo aos receptores para a porção Fc (FcRs) das imunoglobulinas, proteínas de membrana capazes de se ligar a essa porção da molécula, ou por receptores do complemento (CRs). As Deficiências de IgG (hipogamaglobulinemias) estão freqüentemente associada à predisposição a infecções ^{178,180-183}.

A IgA é a imunoglobulina de produção mais abundante em humanos, correspondendo a 15% das imunoglobulinas do sangue, com meia vida de até 6 dias, sendo a principal Imunoglobulina nas mucosas. A IgA mucosa é produzidas pelos plasmócitos da lâmina própria da mucosa (do MALT) enquanto a IgA do sangue é

produzida pelos plasmócitos da medula óssea, sendo possível a migração de células entre os sítios. A IgA pode ser monomérica, que predomina no soro, ou dimérica. Falta à subclasse IgA2, que predomina nas mucosas, uma sequência de 13 aminoácidos na região de dobradura, o que lhe confere maior resistência contra proteases produzidas por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, em relação à outra subclasse, a IgA1. A IgA mucosa neutraliza toxinas e micróbios impedindo sua aderência e penetração. A neutralização de antígenos ingeridos ou inalados evita o desencadeamento de resposta inflamatória local ou sistêmica, nem sempre desejável, evitando desta forma danos à integridade da barreira mucosa, que é uma dos mais importantes mecanismos locais de defesa. A IgA-secretória (sIgA) presente nas mucosas é um dímero com as subunidades ligadas por pontes dissulfídicas à cadeia de junção (J) de 15 kDa. A secreção da sIgA envolve a ligação covalente desta ao receptor poli-Ig, uma glicoproteína de 100 kDa da família das imunoglobulinas associada à membrana basolateral das células epiteliais das mucosas. O complexo sIgA-poli-Ig é ativamente transportado através da célula e secretado na superfície luminal da mucosa. A sIgA é liberada por clivagem proteolítica do receptor poli-Ig formando o componente secretório (CS) de 70 kDa que permanece associado à imunoglobulina tornando-a mais resistente à digestão por enzimas proteolíticas e às alterações de pH. A IgA pode atuar na lâmina própria da mucosa, transportando antígenos que tenham penetrado a barreira de volta para o meio externo, através dos receptores poli-Ig. Acredita-se que a IgA do sangue possa participar da remoção de antígenos provenientes do trato respiratório e gastro-intestinal, dificultando a produção de IgM e IgG contra estes antígenos por linfócitos do baço e a ocorrência de resposta inflamatória. Acredita-se que o fenômeno de indução de tolerância oral dependa da

supressão ativa destas células esplênicas por células T oriundas do MALT. As manifestações das deficiências de IgA variam da ausência de sintomas até o aumento da prevalência de infecções do trato respiratório superior, alergias e doenças auto-imunes¹⁸⁴⁻¹⁹⁰.

Existem dois receptores envolvidos no catabolismo da IgA e de seus imunocomplexos: O receptor Fc de IgA (CD89 ou Fc α RI), expresso em células mielóides, e o receptor de asialoglicoproteínas, expresso em hepatócitos, que identifica glicoproteínas que perderam moléculas de ácido siálico para degradação no fígado e se liga à IgA1 na sua região de dobradura através do resíduo N-acetil-galactosamina, que não existe na IgA2^{184,191-193}.

Figura 1. Subtipos de IgA monomérica

Subtipos de IgA monomérica As cadeias leve e pesada estão representadas respectivamente em branco e cinza. Os sítios de glicosilação O- e N- estão representados respectivamente pelos círculos brancos e pretos¹⁹⁴.

Figura 2. O receptor poli-Ig e a IgA secretória ¹⁹⁴.

1.3.3 Receptores Fc de Imunoglobulinas

Os receptores Fc de imunoglobulina (FcR) são glicoproteínas da família das imunoglobulinas presentes nas membranas de células mielóides e linfóides que se ligam à porção Fc das imunoglobulinas, permitindo que os imunocomplexos desencadeiem a fagocitose, a produção de citocinas, a citotoxicidade celular e a liberação de superóxidos, levando à ativação ou inibição da resposta inflamatória. Os FcR possibilitam a ativação de células efetoras (imunidade celular) através das imunoglobulinas (imunidade humoral). Os FcR dos linfócitos exercem papel na modulação da resposta imune. A transdução de sinal frequentemente depende da associação não covalente dos FcR a cadeias protéicas com motivos ativadores ou inibidores imunotirosina (ITAM ou ITIM). Os FcR participam do catabolismo das imunoglobulinas, promovendo sua internalização para degradação ou reciclagem. São descritos receptores Fc de IgG, IgA, IgE e IgD ^{182,195-199}.

Existem três tipos de FcγR (receptores de IgG) com similaridades na região extracelular e com grandes diferenças nas porções transmembranar e intracitoplasmática. Estes receptores participam da fagocitose, toxicidade celular dependente de anticorpo e liberação de mediadores inflamatórios. Os FcγRI (CD64) são receptores de alta afinidade expressos em monócitos e macrófagos que se ligam a IgG monomérica. Eles não são constitutivos de neutrófilos mas podem ter sua expressão induzida por IFN-γ e G-CSF. O FcγRI está envolvido no aumento de produção de IL-10 e diminuição de produção de IL-12 em macrófagos. Os FcγRII (CD32) expressos em plaquetas, células B, macrófagos e granulócitos são receptores de baixa afinidade que só se ligam a IgG associada a antígenos (imunocomplexos). Nas células B a ligação do imunocomplexo ao FcγRII desencadeia um sinal regulatório negativo. Os FcγRIIIa (CD16a) expressos em células T e NK e fagócitos mononucleares interagem com imunocomplexos com baixa afinidade. Os FcγRIIIb (CD16b) expressos em granulócitos são ancorados à membrana citoplasmática por uma ligação tipo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), de modo distinto dos FcγRIIIa, não tendo região transmembranar ou intracitoplasmática. O FcγRIIIb corresponde a oitenta por cento dos FcγR da superfície dos neutrófilos e tem grande mobilidade pela ligação GPI, fato que favorece a adesão do ligante e sua apresentação para outros receptores, como o CR3 e o FcγRII, que estão aptos a desencadear a formação do fagossomo e a produção de espécies reativas de oxigênio^{174,195,197,199-202}.

O Receptor Fc de IgA (CD89 ou FcαRI) expresso em membranas de monócitos, neutrófilos e eosinófilos, é uma glicoproteína com um núcleo protéico de 32 kDa, com massa total de 55 a 100 kDa, condicionada por variações de glicosilação. Tem 206

aminoácidos com dois domínios imunoglobulina e 6 sítios de glicosilação na porção extracelular, 19 aminoácidos na porção transmembranar e 41 aminoácidos na porção intracitoplasmática. Existem isoformas deste receptor produzidas por “splicing” alternativos do RNA originando FcαRI com massas moleculares menores, com núcleos protéicos de 28 kDa e 22 kDa, expressas em macrófagos alveolares. O CD89 se liga a todas as formas de IgA mas a ligação com a IgA polimérica é mais estável. A ligação IgA-receptor é influenciada pelo estado de glicosilação de ambos, sendo aumentada da ordem de cinco vezes em receptores dessializados. A afinidade da ligação normalmente é baixa, possibilitando rápida dissociação. A expressão do FcαRI é aumentada pelo acetato de forbol miristato (PMA), a ionomicina, o TNF-α, a IL-8, o GM-CSF, o LPS, a FMLP (formil-metil-leucil-alanina) e pela incubação *in vitro* a 37°C. A IgA, principalmente na forma polimérica, o IFN-γ e o TGF-β diminuem a expressão do FcαRI em monócitos. O sítio de ligação da IgA ao FcαRI está localizado no primeiro domínio imunoglobulina do receptor. Os neutrófilos expressam em sua superfície, em condições normais, uma quantidade comparável de FcαRI e FcγRII, cerca de 10⁴ moléculas, que se ligam com uma afinidade semelhante às respectivas imunoglobulinas (5 x 10⁷ M⁻¹)^{193,203-213}.

Figura 3. Receptor de Fc de IgA (Fc α RI)

O receptor Fc α RI (CD89) Representação do receptor associado e não associado à cadeia gama e da IgA ligada ao primeiro domínio imunoglobulina do receptor¹⁹⁴.

1.3.4 A cadeia gama associada aos receptores Fc de imunoglobulinas.

A cadeia gama (FcR- γ) é uma proteína de 18 kDa presente na membrana celular de fagócitos como um dímero no qual as moléculas estão ligadas por uma ligação dissulfídica e apresentam carga negativa, sendo responsável pela transdução de sinal dos Fc α RI, Fc γ RI, Fc γ RIII e Fc ϵ R, aos quais se associa de forma não-covalente, pela carga positiva destes receptores na membrana. O Fc α RI não associado à cadeia gama

atua internalizando, reciclando e protegendo a IgA contra a degradação. A associação de imunocomplexos de IgA ao complexo multimolecular receptor - cadeia gama causa alterações na estrutura quaternária deste que expõem as duas tirosinas na porção intracitoplasmática (que caracterizam um ITAM) à fosforilação e subsequente cascata de eventos. O Fc α RI associado à cadeia gama tem sua expressão aumentada por forbol-ésteres e IFN- γ , mas não por GM-CSF, IL-1 ou ionomicina. A ativação do receptor induz fosforilação rápida de tirosina com geração de inositol 1,3,4 trifosfato (IP3) e ativação de quinases cálcio dependentes. Há recrutamento das tirosino-quinases lyn, syk e btk. O Recrutamento e fosforilação da syk e btk são moduladas pelo IFN- γ e forbol-ésteres, indicando que a ativação destas tirosino-quinases através do Fc α RI depende do estado inicial de ativação da célula. A atividade fagocítica é dependente da expressão da cadeia γ , fato demonstrado pela ausência de fagocitose em animais manipulados geneticamente que não a expressam. A fagocitose de imunocomplexos pelos granulócitos é predominantemente mediada pela IgG mas, curiosamente, os únicos FcR constitutivos de granulócitos associados à cadeia γ são os Fc α RI. A associação de complexo antígeno-IgA ao receptor permite, além da sua adesão e internalização pelos fagócitos, a produção de espécies reativas de oxigênio, a secreção de grânulos intracelulares, a citotoxicidade dependente de anticorpo e produção de proteínas, como o TNF- α e a IL-6^{198,211,214-223}.

1.3.5 Receptores Fc de imunoglobulina na resposta à infecção

1.3.5.1 *Receptores Fc de IgG (FcγR)*

O FcγRIII (CD16) não é constitutivo de monócitos, mas populações de monócitos do sangue de pacientes sépticos expressam este receptor, apresentando desta forma características de macrófagos teciduais. Granulócitos de neonatos com septicemia têm diminuição da expressão de receptores FcγRIIIb. Pacientes com quadros infecciosos, particularmente pacientes com infecções por bactérias gram-negativas, apresentam expressão do FcγRI em neutrófilos, que não é constitutivo destas células. Em um modelo experimental de sepsis a ligação ao FcγRI de macrófagos induziu o aumento da liberação de IL-10 e diminuição de IL-12, com reversão do padrão de citocinas pró-inflamatórias^{174,224-227}.

Níveis aumentados de FcγRIIIb solúvel foram associados a risco significativamente menor de infecção. Polimorfismo dos FcγR foi associado à suscetibilidade a infecção. Existem dois alótipos do FcγRII, definidos pela resposta a um mitógeno, os fenótipos de alta resposta (HR) e baixa resposta (LR), com diferença em 2 aminoácidos entre os fenótipos. Funcionalmente, Os LR interagem mais efetivamente com imunocomplexos de IgG2, ao contrário dos HR. A produção de IgG2 é induzida por infecções por germes capsulados, como o *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Um estudo que envolveu crianças com infecções bacterianas recorrentes verificou que a frequência de homozigotos LR era significativamente diminuída e que os neutrófilos dos pacientes que expressavam o

fenótipo LR eram mais eficientes na fagocitose de complexos de IgG2 com bactérias. O FcRγIIIb apresenta dois fenótipos conhecidos pelo envolvimento em reações transfusionais, os antígenos neutrofilicos NA1 e NA2, entre os quais há diferenças em vários aminoácidos e nos sítios de glicosilação. A fagocitose em NA1 é mais eficiente que em NA2. Em um estudo com pacientes com deficiência da via terminal do complemento, 40% dos que tiveram doença meningocócica tinham os fenótipos HR/HR e NA2/NA2. Há disfunção da fagocitose mediada por receptores Fc de IgG no Lupus Eritematoso Sistêmico, doença que apresenta risco aumentado de infecção ²²⁸⁻²³².

Estudos de sepsis intra-abdominal experimental demonstraram diminuição progressiva da atividade fagocítica de *Candida albicans* em granulócitos, associada à expressão anormal de FcγR. Neutrófilos requerem ânions superóxido e peróxido de hidrogênio para a fagocitose mediada por FcγR e a geração destes produtos leva a uma diminuição inicial dos FcγR nestas células, que normalmente têm a habilidade de reciclar os receptores. Na sepsis não tratada esta reciclagem estava comprometida e o tratamento precoce da sepsis levou a uma restauração parcial da fagocitose mediada pelos FcγR. Pacientes cirúrgicos que morreram por pneumonia apresentaram diminuição da expressão dos CD16, HLA-DR e CR3 em macrófagos alveolares. Monócitos que se ligam a hemácias marcadas com IgG humana (FcR+) são uma população proporcionalmente aumentada em pacientes sépticos, apresentando diminuição da expressão do HLA-DR, com depressão da apresentação de antígenos, e maior produção de citocinas inflamatórias (IL-1β e IL-6) em relação aos macrófagos FcR- ²³³⁻²³⁶.

1.3.5.2 Receptor Fc de IgA (Fc α RI).

A expressão do Fc α RI, assim como a fagocitose que depende de IgA em monócitos, são aumentadas *in vitro* pela exposição ao LPS e a citocinas, como a IL-1, TNF- α e GM-CSF. O TNF- α aumenta a fagocitose mediada por IgG em neutrófilos, mas sem modificar a expressão dos Fc γ R. Quimioatraentes, como o FMLP e o Zymozan, uma fonte de C5a, induzem o aumento rápido da expressão do CD89 em neutrófilos, possivelmente por mobilização de estoques intracelulares, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROE) em resposta a agregados de IgA, mas não de IgG. O GM-CSF induz aumento da fagocitose mediada por IgA. Neutrófilos estimulados com TNF- α têm aumento da expressão do Fc α RI, da geração de superóxido mediada por IgA e da capacidade de destruição de *Pseudomonas aeruginosas* mediada pela IgA de pacientes com fibrose cística, que têm aumento da expressão do CD89 em neutrófilos do lavado bronco-alveolar e freqüentemente apresentam infecção ou colonização por este germe. O tratamento de neutrófilos com IL-8 leva ao aumento da expressão do CD89, da fagocitose e da geração de ROE mediados por IgA, mas não por IgG. Foi demonstrado aumento da expressão do CD89 induzida por citocinas inflamatórias e da fagocitose bacteriana mediada por IgA em células de Küpffer hepáticas de camundongos transgênicos. Uma IgA do sangue antipolissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* desencadeou, via Fc α RI, funções efectoras como a fagocitose em granulócitos, de maneira tão eficiente quanto o Fc γ RIIa (CD32). Algumas doenças com aumento da IgA do sangue e diminuição da expressão e alterações de glicosilação do Fc α RI em monócitos, como a cirrose alcoólica e a AIDS, têm risco aumentado de infecções^{210,211,237-245}.

2 OBJETIVOS

- _ Avaliar a expressão do Fc α RI (CD89) nos monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com bacteremia e sinais de resposta inflamatória sistêmica.
- _ Estabelecer a existência de correlação da expressão do receptor com a natureza das bactérias isoladas em hemocultura.
- _ Estabelecer a existência de correlação da expressão do receptor com a concentração de citocinas no sangue.
- _ Estabelecer a existência de correlação da expressão do receptor com as características clínicas dos pacientes.
- _ Estabelecer as características bioquímicas do receptor.
- _ Avaliar a expressão da cadeia gama associada ao receptor.
- _ Avaliar a ocorrência de ativação do receptor *in vivo* pelo estudo da fosforilação da cadeia gama associada ao receptor.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Pacientes e grupo controle

Integram a casuística deste estudo pacientes internados nas unidades de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da FMUSP (HCFMUSP) e controles saudáveis dentre os membros da equipe do laboratório e do corpo clínico do hospital, de acordo com as normas da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq). Foram incluídos os pacientes que apresentavam quadros infecciosos com hemocultura positiva e sinais de resposta inflamatória sistêmica dentro dos sete dias anteriores à coleta das amostras e foram excluídos pacientes com cirrose alcoólica, nefropatia por IgA, púrpura de Henoch-Schönlein, infecção pelo HIV, imunodeficiências primárias ou decorrentes do uso de drogas imunossupressoras e caquexia, condições que poderiam provocar anormalidades na expressão do Fc α RI (CD89). O índice de gravidade APACHE II foi calculado com base nas variáveis fisiológicas e laboratoriais disponíveis à internação na UTI e os pacientes foram acompanhados até a alta da UTI (por melhora ou óbito). Membros do corpo clínico do HCFMUSP e dos laboratórios da FMUSP sem relato de doença aguda ou em tratamento integraram o grupo controle. Em razão de não serem descritas alterações de expressão do Fc α RI em função de sexo, idade ou etnia estas variáveis não foram levadas em consideração na composição da amostra. As amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis. Os tubos heparinizados (50 μ l heparina para cada mililitro de sangue) para realização de marcação para citometria de fluxo e para fracionamento por ficoll-hypaque e dextran foram mantidos em gelo (4°C) e processados prontamente. Os tubos secos foram centrifugados para separação do soro, que foi estocado a 70°C negativos prontamente^{193,207,246}.

3.2 Reagentes

3.2.1 IgG Humana

A IgG humana foi purificada a partir de sangue de indivíduos normais (doadores voluntários do laboratório) por precipitação em solução saturada (40%) de sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil (DEAE) equilibrada com TRIS HCl. A IgG foi dializada contra tampão fosfato salino (PBS) e concentrada a 10 mg/ml utilizando aparato de filtro microporoso sob pressão com N₂. O grau de pureza da IgG, verificado por diluição em dodecil-sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi superior a 95%. As concentrações de proteína foram obtidas utilizando espectroscopia de absorção de radiação ultravioleta (comprimento de onda de 280 nm) e confirmadas pelo método de folin-fenol modificado (Lowry)

247,248

3.2.2 Anticorpos anti- FcγR e relacionados

Foram utilizados os seguintes anticorpos: Dois anticorpos monoclonais (mAb) de camundongo de isotipo IgG1κ (clone 7.1 anti- proteína GST e PharMingen San Diego, CA, USA) ambos sem atividade específica, nos tubos controle negativos (tubos brancos), marcados diretamente com ficoeritrina (PE) ou sem marcador, utilizados para marcação indireta. Anticorpos monoclonais 32.2 (IgG1κ ATCC, Rockville, MD,

USA) específico para o receptor Fc γ RI (CD64), IV.3 (IgG2 κ ATCC) específico para o receptor Fc γ RII (CD32) e o 3G8 (IgG1 κ ATCC) específico para o receptor Fc γ RIII (CD16) (PharMingen; San Diego, CA, USA), utilizados para avaliação por marcação indireta da expressão por citometria de fluxo dos respectivos receptores. Foram utilizados anticorpos policlonais de cabra anti-IgG de camundongo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotechnology Associates; Alabama, USA) para marcação indireta dos mAbs sem fluorocromo associado. Os mesmos mAbs anti-Fc γ R ligados à partículas (“beads”) de Sepharose 4B, fornecidas pelo Prof. Renato Monteiro, foram utilizados para depleção dos receptores Fc γ R por imunoprecipitação^{193,217}.

3.2.3 Anticorpos anti- Fc α RI e relacionados

O mAb Anti-Fc α RI (anti-CD89) (clone A59 IgG1 κ) marcado diretamente com ficoeritrina (PE) (PharMingen; San Diego, CA, USA) foi utilizado para avaliação da expressão do Fc α RI □por citometria de fluxo. Três anticorpos monoclonais específicos para o Fc α RI foram utilizados para análise bioquímica (clones A59 (IgG1 κ), A62 (IgG1 κ) e A77 (IgG1 κ)), inclusive ligados a partículas (“beads”) de Sepharose 4B, fornecidos pelo Prof. Renato Monteiro. Fragmentos F(ab')₂ do mAb A77 e de IgG1 κ foram preparados por digestão por pepsina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) como já fora descrito anteriormente^{193,207,242}.

3.2.4 Outros anticorpos

Anticorpos policlonais de cabra anti-IgA humana $F(ab')_2$ (Southern Biotechnology Associates; Alabama, USA) e anticorpos policlonais de cabra anti-IgG de camundongo $F(ab')_2$ adsorvido contra IgG humana (controle negativo) (Southern Biotechnology Associates; Alabama, USA), foram utilizados para análise da “ocupação” do CD89 pela IgA. Ambos anticorpos estavam conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e não concorrem com a IgA pelo sítio de ligação desta ao receptor^{213,244}.

Anticorpos monoclonais anti- CD14 e anti- CD15 marcados com FITC utilizados para identificação dos tipos celulares nas janelas de aquisição da citometria de fluxo foram adquiridos junto a PharMingen, San Diego, CA, USA. Os anticorpos policlonais de coelho contra cadeia gama (Fc γ) e o mAb anti-fosfotirosina de camundongo 4G10 foram cedidos pelo Dr. U. Blank (Pasteur Institut, Paris, FR). Os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase da raiz forte (HRP) foram adquiridos junto a Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA^{193,217}.

3.2.5 Enzimas, detergentes e outros reagentes.

Foi utilizada solução de lise de hemácias (Becton Dickison, San Diego, CA, USA) específica para citometria de fluxo. Ficoll-hypaque e dextran T500 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), foram utilizados para fracionamento do sangue total e

separação dos fagócitos. A Lactoperoxidase e o peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) foram utilizados para iodinação das proteínas de superfície. O isótopo radioativo utilizado foi o NaI^{125} (IMS 30; 1 mCi, Amersham Corp. Arlington Heights, IL, USA). Foram utilizados para os tampões de lise e transferência os detergentes NP40 e Tween 20 (Sigma Chem., St. Louis, MO, USA) e Digitonina (Aldrich Chem., UK), além de azida de sódio (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) como conservante, aprotinina e fenilmetilsulfonilfluoridro (PMSF) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) como inibidores de proteases e o diisopropilfluorofosfato (Calbiotech Novabiochem, UK) e a iodoacetamida (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ^{193,217,244,247-250}.

A N-glycosidase F (N-glycanase, Oxford GlycoSystems, UK) foi utilizada para deglicosilação dos Fc α RI. Membranas de nitrocelulose Hybond-C (Amersham Int., UK) foram utilizadas para transferência por eletroforese para “immunoblotting”. Um sistema para detecção por quimiluminescência amplificada (ECL, Amersham Int., UK) foi utilizado para leitura do “immunoblotting”. Foram utilizados marcadores de peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para SDS-PAGE e “immunoblotting”. A dosagem de citocinas do sangue (IL-6, IFN- γ e TNF- α) por ELISA utilizou “kits” adquiridos junto a R&D systems (Abingdon, UK) ^{193,217,249,250}.

3.3 Metodologia

3.3.1 Coleta de amostra

Um mililitro de sangue de cada paciente e controle foi coletado em um tubo estéril heparinizado, mantido à temperatura de 4° C durante todo o procedimento, para imediata marcação com anticorpos monoclonais específicos para o Fc α RI, para os Fc γ Rs e para a IgA ligada ao CD89, para avaliação por citometria de fluxo. A análise bioquímica foi realizada em parte dos pacientes e controles utilizando vinte mililitros de sangue heparinizado em tubos estéreis. Uma amostra de sete mililitros de sangue em tubo seco estéril foi coletada de cada paciente e controle para centrifugação e separação do soro para dosagem de IgA e citocinas. O soro foi prontamente armazenado a 70°C negativos.

3.3.2 Marcação com anticorpos específicos e análise de fluorescência por citometria de fluxo

A expressão dos Fc α RI e Fc γ Rs nos fagócitos foi quantificada a partir da análise da imunofluorescência após a marcação com mAbs específicos por citometria de fluxo utilizando o FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) com a seguinte metodologia : Todo o procedimento foi realizado a 4°C. Colocação de 50 μ l de sangue

total heparinizado por tubo. Adição de 10µl de IgG humana (10 mg/ml), um excesso de cem vezes a concentração normal de IgG no sangue, para bloquear dos sítios de ligação de IgG dos FcγR e evitar a ligação inespecífica das porções Fc dos mAbs a estes receptores. Após 20 minutos, adição de 20µl do mAb A59 marcado com ficoeritrina (A59-PE, específico para o FcαRI) no tubo de prova e 20 µl do mAb irrelevante IgG1κ-PE no tubo controle negativo. O controle negativo serve como valor de referência zero para leitura da imunofluorescência do tubo marcado por expressar a ligação inespecífica dos mAbs às células. Após 30 minutos, efetuou-se a lise das hemácias com 1 ml de solução de lise conforme as especificações do fabricante. Os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 1200 rpm, seguida de aspiração a vácuo do sobrenadante, preservando o botão celular, que foi submetido a duas lavagens com uma solução composta por PBS, azida de sódio a 0,1% e soro bovino fetal (SBF) a 5%, seguidas de aspiração a vácuo do sobrenadante. Por fim, o botão celular foi submetido à fixação com uma solução de formaldeído a 1% em PBS com azida de sódio a 0,1%, seguida de agitação imediata para evitar a formação de agregados celulares pelo formaldeído. A leitura no FACS utilizando o filtro FL2 (vermelho, para a PE). Para a marcação indireta dos FcγR foram utilizados dois tipos de anticorpos: um mAb específico para cada receptor a ser marcado ou um controle negativo e um segundo anticorpo de cabra anti- IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após a incubação com a IgG e adição dos mAbs específicos, com incubação por 30 minutos, realizaram-se duas lavagens com a solução já descrita para retirada do excesso de mAbs, preservando o botão celular, ao qual foi adicionado o anticorpo anti- IgG de camundongo que se liga aos primeiros mAbs e está associado ao FITC. Após 30 minutos realizaram-se a lise, lavagem e

fixação como já foi descrito e a leitura no FACS com filtro FL1, verde, para o FITC^{193,207,244}.

A leitura e análise da fluorescência foram efetuadas com o programa de computador “Cellquest”, do citômetro FACScalibur. As janelas de aquisição no citômetro de fluxo foram definidas pelo tamanho (dispersão frontal) e granularidade (dispersão lateral) das células. A presença das populações celulares foi confirmada pela marcação com os marcadores de linhagem mielóide CD14 e CD15. Foram adquiridos valores de fluorescência de 5.000 células polimorfonucleares e 1.000 células mononucleares de cada tubo. O valor de referência utilizado foi o do canal de pico de fluorescência na escala logarítmica, tendo em vista que na janela de aquisição dos mononucleares há uma minoria de células, como as NK e B ativadas, que não expressam o Fc α RI, diferente dos monócitos. Em todos os experimentos foram utilizados, para cada indivíduo estudado, tubos controle negativo com células marcadas com mAb sem atividade específica como já foi descrito. Em todos os experimentos foram realizadas marcação e leitura de ao menos um indivíduo normal concomitante aos pacientes com bacteremia e com espondilite anquilosante, de outro estudo. A intensidade de fluorescência (IF) foi obtida pela subtração do valor da intensidade de fluorescência do tubo controle negativo, que foi ajustada para o valor de um, do valor do tubo marcado, que é maior que um quando o receptor é expresso na célula^{193,244,245}.

Figura 4. Janela de aquisição do citômetro de fluxo

Janela de aquisição do citômetro de fluxo Cada ponto representa um evento captado que corresponde a uma célula ou a um fragmento celular. As células são caracterizadas pela dispersão frontal (FSC-H) e lateral (SSC-H) do feixe de luz do laser de argônio, permitindo seu agrupamento por tamanho e granularidade. A delimitação de subgrupos de células com características comuns (R) permite a análise separada destes eventos, empregando filtros de luz (FL) específicos. O uso de anticorpos marcados específicos contra proteínas da superfície celular permite a confirmação dos tipos celulares da amostra²⁰⁸.

Figura 5. Janela de análise do citômetro de fluxo

Janelas de análise do programa Cellquest do citômetro de fluxo. Os eventos captados dentro de uma janela (R) com características de tamanho e granularidade definidas, que correspondem a uma população celular, são submetidos à análise com um filtro de luz (FL) da cor da substância fluorescente empregada. O FL2 corresponde à cor vermelha, da ficoeritrina (PE). Os eventos são distribuídos no histograma de acordo com a intensidade de fluorescência (IF) na escala logarítmica. A expressão do receptor é avaliada pela IF no "Peak channel", o canal que concentra o maior número de eventos (no exemplo = 38) subtraída da IF do tubo controle negativo (ajustada para um valor de 01 na calibração do aparelho) ²⁰⁸.

3.3.3 Análise da ocupação do receptor pela IgA endógena

A ocupação dos Fc α RI pela IgA foi verificada por marcação direta utilizando o anticorpo anti-IgA F(ab')₂ marcado com FITC, após 3 lavagens sucessivas de 50 μ l do sangue total com 1 ml de PBS + azida a 0,1% + SBF a 5% a 4° C para retirada do plasma e da IgA nele dissolvida. Não foi realizada incubação com a IgG porque os anticorpos eram F(ab')₂ e, por não terem porção Fc, não haveriam de se ligar inespecificamente à porção Fc dos Fc γ R. Trinta minutos após a adição do anticorpo específico as hemácias foram submetidas a lise, duas novas lavagens e fixação para leitura no FACS com o filtro FL1, como já foi descrito. Como controle negativo foi utilizado o anticorpo de cabra anti- IgG de camundongo F(ab')₂ marcado com FITC. Nenhum dos dois anticorpos compete com a IgA pelo sítio de ligação desta ao receptor 207,213,244 .

3.3.4 Análise do aumento de expressão do Fc α RI após incubação *ex vivo* a 37°C

A incubação a 37°C dos fagócitos *ex vivo* induz aumento da expressão do Fc α RI na superfície celular. A capacidade de aumento da expressão dos Fc α RI foi avaliada pela incubação do sangue (50 μ l) dos pacientes e controles a 37°C durante sessenta minutos na ausência do plasma, retirado após três lavagens sucessivas com uma solução estéril de PBS com soro bovino fetal a 5% sem azida de sódio. O objetivo da

retirada do plasma é a exclusão de fatores circulantes, como a própria IgA e citocinas, que poderiam afetar a expressão do Fc α RI. Após a incubação a 37°C as células foram transferidas para o gelo (4°C), incubadas com IgG humana, marcadas com mAb A59-PE, lisadas, lavadas e fixadas como já foi descrito. Paralelamente foi efetuada uma marcação de células dos mesmos indivíduos sem retirada do plasma e sem incubação a 37°C. O valor de referência foi o da média da intensidade de fluorescência na escala logarítmica, tendo em vista a dispersão dos valores de intensidade de fluorescência na população de células incubadas e marcadas. A modulação do Fc α RI após incubação foi calculada pela fórmula : (IF de células lavadas, incubadas e marcadas com o A59-PE – IF do tubo controle negativo correspondente) / (IF de células não tratadas – IF do tubo controle negativo correspondente), que fornece um valor que indica a razão entre a expressão do receptor nas células incubadas sem o plasma e a expressão do receptor nas células não incubadas^{193,211,244}.

3.3.5 Fracionamento celular, iodinação das proteínas de superfície e lise celular

Em três pacientes de cada grupo e controles, monócitos e granulócitos foram isolados e fracionados a partir de sangue periférico através de gradiente de densidade em ficoll-hypaque (densidade 1.075) e sedimentação em dextran T500 a 1.5%. O procedimento de separação foi feito com materiais e soluções estéreis sob fluxo laminar. O sangue heparinizado foi ressuspensionado em igual volume de PBS estéril. Cada tubo estéril Falcon de baixa adesividade celular recebeu inicialmente 5 ml de

ficoll-hypaque e 10 ml do sangue com PBS, colocado delicadamente sobre a fase do ficoll-hypaque, evitando a mistura das fases. Os tubos foram centrifugados a 1.800 rpm por 30 minutos, evidenciando três fases distintas : uma fase superior de plasma diluído em PBS, separada da fase ficoll-hypaque por um anel de células mononucleares, e um botão de hemácias e polimorfonucleares ao fundo. O anel mononuclear foi lavado duas vezes em PBS estéril e conservado a 4°C. O botão de hemácias e polimorfonucleares foi ressuscitado em um volume semelhante de dextran T500 3% em PBS e encubado a 37°C por 30 minutos. Os polimorfonucleares ficam no sobrenadante, que foi recolhido e lavado duas vezes em PBS estéril. Após confirmação da viabilidade e contagem celular utilizando azul de trypan em uma câmara de Neubauer aferida, 2×10^7 células foram submetidas a iodinação das proteínas de superfície pelo método da lactoperoxidase utilizando NaI^{125} . Posteriormente as células foram lisadas com uma solução composta por PBS e NP40 0,5% ou digitonina 1%, azida de sódio 0,02%, aprotinina 1%, diisopropilfluorofosfato 1 mM, iodoacetamido 5 mM e PMSF 1 mM em volume suficiente para completar o volume de 1,5 ml do tubo Eppendorf, durante trinta minutos a 4 °C, após o que se procedeu a centrifugação a 14000 rpm por trinta minutos a 4°C, para precipitação dos núcleos, organelas e citoesqueleto. O sobrenadante foi coletado para recuperação de micelas da membrana e do citosol. O lisado foi pré-adsorvido em sepharose 4B ligada a IgG humana e aos monoclonais 32.2, IV.3 e 3G8 para depleção dos FcγR e dividido em duas amostras para incubação por 2 horas tanto em IgG1k F(ab')₂ (irrelevante) quanto em A77 F(ab')₂ , específico para o CD89^{190,242,249}.

3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida para análise de massa e glicosilação do receptor

As amostras foram submetida à eletroforese em SDS-PAGE com acrilamida a 10% e, em um dos experimentos, a amostra também foi submetida a digestão por N-glycosidase F a fim de se comparar os pesos moleculares dos receptores glicosilados e não glicosilados (o “core” ou núcleo protéico), utilizados os marcadores de peso molecular como escala. Após a migração, o gel foi corado com azul de Coomassie, secado em papel Whatman e exposto a auto-radiografia (Kodak). Vale ressaltar que como as amostras foram submetidas a iodinação das proteínas de superfície apenas os receptores que se encontravam na membrana celular foram marcados com o iodo radioativo^{193,247,250}.

3.3.7 “Immunoblotting” para análise de expressão e fosforilação da cadeia gama

O procedimento do “immunoblotting” da cadeia gama tem semelhanças com o anterior, como a separação das células, contagem e análise de viabilidade. Não foi realizada iodinação e a solução de lise utilizada foi de digitonina 1%, que é um detergente suave que não provoca separação do CD89 da cadeia gama a ele associada. A imunoprecipitação foi realizada de modo semelhante ao já descrito, com isolamento do CD89 associado à cadeia gama, tratando-se portanto de uma co-imunoprecipitação. Após a eletroforese em SDS-PAGE 12,5% foi realizada transferência eletroforética

para membranas de nitrocelulose utilizando o tampão Tris-Glicina-Metanol (tris 2,42 g, glicina 11,26g, metanol 200 ml, água q.s.p. um litro) e corrente de transferência de 100 mA por uma hora, 30 mA durante a noite e 100 mA por mais uma hora. As membranas foram incubadas em um tampão de bloqueio composto por Tris-HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM (TBS) com albumina sérica bovina (BSA) 3%, vermelho fenol e Tween 20 0.1% por duas horas em agitação a temperatura ambiente, e então encubadas com o anticorpo de coelho anti- γ (1 μ g/ml) por mais duas horas. Um conjugado HRP- anticorpo de cabra anti- IgG de coelho, diluição 1:3.000 e uma hora de incubação, foi utilizado como anticorpo secundário. Foram realizadas três lavagens por dez minutos em agitação com TBS + 0,3% BSA + 0,1% Tween 20 entre as incubações. Para detecção da cadeia gama fosforilada foi utilizado SDS-PAGE 10% e utilizado o mAb 4G10 de camundongo anti-fosfotirosina a 0.5 μ g/ml e um anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (diluição 1:3000) como anticorpo secundário. A leitura da marcação na membrana (“blott”) utilizou o sistema de quimiluminescência amplificada (ECL) e filme Kodak para auto-radiografia^{214,217}.

3.3.8 Determinação da concentração de IgA do sangue

A concentração de IgA no sangue (mg/ml) foi determinada pelo laboratório central do HCFMUSP utilizando a nefelometria como método analítico.

3.3.9 Determinação da concentração de citocinas no sangue

As concentrações de IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro de cerca de dez pacientes de cada grupo e dos controles foram verificadas utilizando kits de ELISA de alta sensibilidade R&D systems, conforme as especificações do fabricante.

3.3.10 Análise estatística

Foram utilizados o teste de análise de variância de fator simples (ANOVA) e o procedimento de Tukey para comparações múltiplas, o teste dos estudantes t independente e análise de correlação por regressão linear. Os resultados estão apresentados em médias $\pm$ desvio padrão, tendo sido utilizado como nível de significância um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

Dezoito pacientes apresentaram hemocultura com germes gram-positivos e dezesseis com germes gram-negativos. As características dos pacientes são apresentadas na tabela I:

Tabela I: Características dos pacientes

	<i>Grupo gram-positivo</i>	<i>Grupo gram-negativo</i>
Sexo	7 mulheres, 11 homens	5 mulheres, 11 homens
Idade média (e variação)	42,4 anos (17 a 75)	58 anos (12 a 88)
APACHE II (média e DP) à admissão na UTI	12,9 (DP 6,1)	15,4 (DP 3,7)
Escore fisiológico agudo + avaliação de doenças crônicas do APACHE II (sem idade)	11,4 (DP 5,8)	11,8 (DP 4,0)
Condição de alta da UTI	7 melhorados, 11 óbitos	10 melhorados, 6 óbitos
Hemoculturas	Staphylococcus sp.* (15), Streptococcus sp. (2), Clostridium sp. (1) (*positividade para S.aureus : um frasco; outras espécies de Staphylococcus : três frascos)	Acinetobacter sp. (7), Enterobacter sp. (3), Pseudomonas sp. (2), Klebsiella sp. (2), Providencia sp.(1), Escherichia sp. (1)
Infecções diagnosticadas (alguns pacientes com mais que uma infecção)	pneumonia(11), bacteremia(6), infecção urinária(3), endocardite(2), empiema pleural(2), peritonite(1), infecção de cateter(1)	pneumonia(13), infecção urinária(5), bacteremia(2), abscesso(2), colite(2), peritonite(1), miosite(1), endocardite(1), celulite(1)

4.1.1 Grupo controle

Vinte pessoas, sendo oito homens e doze mulheres, com idades de 32 (19 a 49) anos, sem histórico de doenças agudas ou em tratamento, compõem o grupo controle.

4.2 Expressão aumentada do Fc α RI (CD89) nos fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia por germes gram-negativos

A expressão do Fc α RI (CD89) em fagócitos do sangue total foi avaliada através da análise semi-quantitativa da imunofluorescência por citometria de fluxo. Foi utilizado um mAb anti-Fc α RI (A59) que reconhece determinantes do receptor localizados em domínios extracelulares e fora do sítio de ligação da IgA. A **figura 6** mostra um significativo aumento da reatividade do A59 em neutrófilos e monócitos de pacientes com bacteremia por gram-negativos (Intensidade de fluorescência no canal de pico na escala logarítmica = IF): 64 (DP 15,2) para monócitos e 53 (DP 20,3) para neutrófilos (n=16) quando comparado aos controles (IF): 50 (DP 3,1) para monócitos e 34 (DP 1,9) para neutrófilos (n=20). Não foram observadas mudanças significativas na reatividade do A59 em pacientes com bacteremia por gram-positivos (IF): 49 (DP 17,6) para monócitos e 42 (DP 13,7) para neutrófilos (n=18) em relação aos controles. Foram utilizados o teste ANOVA e o procedimento de Tukey, que indicaram que a IF média dos monócitos foi maior no grupo gram-negativo do que no grupo controle e no grupo gram-positivo e em

neutrófilos a IF média foi maior no grupo gram-negativo do que no grupo controle. Não foi observada correlação entre a expressão do CD89 e o índice prognóstico APACHE II à admissão, com ou sem os pontos por idade, ou a condição de alta dos pacientes. Vale ressaltar que embora os valores do índice prognóstico APACHE II e a média de idade do grupo gram-negativo sejam maiores do que do grupo gram-positivo, os pacientes do segundo grupo tiveram maior mortalidade imediata^{207,246}.

Figura 6. Aumento da expressão do Fc γ RI nos fagócitos do sangue dos pacientes com bacteremia detectada por análise de imunofluorescência

Células do sangue de pacientes com bacteremia por gram-positivos (G+) ou gram-negativos (G-) e controles (Co) foram marcadas diretamente com mAb A59-PE (ficoeritrina) anti-Fc γ RI (0,05 mg/ml). As células foram analisadas por citometria de fluxo usando janelas de aquisição de tamanho e granularidade para neutrófilos e monócitos. A parte superior da figura mostra a sobreposição de histogramas de análise de intensidade de fluorescência (IF) do tubo branco (BR), controle (Co) e paciente com bacteremia por gram-negativos (G-), mostrando o canal de pico do G- maior que o do controle. O tubo branco tem o valor de um para o canal de pico). Os valores de IF para controles e pacientes foram obtidos no canal de pico de fluorescência na escala logarítmica e calculados da seguinte maneira: (IF de células marcadas com anti-Fc γ RI – IF do tubo branco com marcador irrelevante). Diferenças entre controles e pacientes foram analisadas utilizando os testes ANOVA e o procedimento de Tukey^{193,244}.

4.3 Expressão dos FcγR nos fagócitos do sangue dos pacientes com bacteremia

A expressão dos FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) foi avaliada através da análise semi-quantitativa de imunofluorescência por citometria de fluxo de neutrófilos e monócitos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos e gram-positivos. Foram utilizados os anticorpos monoclonais (mAb) 32.2, específico para o FcγRI, IV.3, específico para o FcγRII e o 3G8, específico para o FcγRIII e um anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com FITC como segundo anticorpo. Encontramos diferenças significativas na expressão do FcγRI em neutrófilos (3,4 (DP 2,4 n=12) para os pacientes com bacteremia por gram-negativo e 3,9 (DP 1,9 n=13) para os pacientes com bacteremia por gram-positivos, contra 0,3 (DP 0,6 n=16) para os controles), e na expressão do FcγRIII em monócitos (0,41 (DP 0,86 n=12) para os pacientes com bacteremia por gram-negativos e 0,85 (DP 1,05 n=14) para os pacientes com bacteremia por gram-positivos, contra 0,06 (DP 0,24 n=16) para os controles) utilizando o teste ANOVA e o procedimento de Tukey. Não encontramos alterações significativas da expressão dos demais FcγR (dados não mostrados). Estes achados estão de acordo com o já descrito na literatura^{193,224,227}.

4.4 Concentração de IgA no sangue dos pacientes com bacteremia

A concentração de IgA no sangue dos pacientes com bacteremia foi realizada no laboratório central do HCFMUSP empregando a técnica de nefelometria, com variação normal de 200 a 400 mg/ml. A dosagem sérica de IgA dos pacientes com bacteremia por gram-negativos foi de 307,21 mg/ml (DP 77,81, n=14), de 363,81 mg/ml (DP 118,61, n=16) nos pacientes gram-positivos e de 232,13 mg/ml (DP 86,44, n=18) nos controles. Não encontramos correlação entre a expressão do Fc α RI e os níveis de IgA no sangue nos pacientes com bacteremia, utilizando regressão linear.

4.5 Ocupação do Fc α RI pela IgA endógena

A ocupação dos Fc α RI pela IgA foi verificada por análise de imunofluorescência por citometria de fluxo utilizando marcação direta com um anticorpo anti-IgA F(ab')₂ marcado com FITC que não compete com a IgA pelo sítio de ligação desta ao receptor. A marcação foi realizada após 3 lavagens do sangue total com uma solução de PBS, azida de sódio a 0,1% e SBF a 5% para retirada do plasma e da IgA do sangue. A leitura foi efetuada no canal de pico na escala logarítmica. Não foi verificada diferença significativa entre a ocupação do receptor nos pacientes com bacteremia por gram-negativos (neutrófilos : 2,75 DP 1,3; monócitos : 2,87 DP 0,78; n=8) e os controles (neutrófilos : 2,25 DP 0,96; monócitos : 2,37 DP 1,11; n=8), utilizando o teste dos estudantes^{207,213,244}.

4.6 Capacidade de aumento de expressão do Fc α RI após incubação *ex vivo* a 37°C

A incubação a 37°C de células do sangue tende a aumentar a expressão do Fc α RI. Fatores plasmáticos como a IgA (que tende a diminuir a expressão) e as citocinas podem modular a expressão deste receptor. A modulação de expressão pela temperatura foi avaliada com sangue submetido a três lavagens com uma solução estéril de PBS e SBF a 5%, para retirada do plasma autólogo, e incubação por uma hora a 37°C. Posteriormente, procedeu-se a marcação com o mAb A59-PE anti-CD89 como já foi descrito, para comparação das células incubadas com células dos mesmos indivíduos submetidas à marcação sem retirada do plasma e sem incubação a 37°C. O valor de referência foi o valor médio da intensidade de fluorescência na escala logarítmica. A modulação do Fc α RI após a incubação foi calculada pela fórmula : $(\text{IF de células lavadas, incubadas e marcadas com o A59-PE} - \text{IF do tubo controle negativo correspondente}) / (\text{IF de células não tratadas} - \text{IF do tubo controle negativo correspondente})$, que fornece um valor que expressa a capacidade de aumento da expressão do Fc α RI pela incubação *ex vivo* a 37°C em número de vezes. Doenças nas quais há aumento do nível sérico de IgA e diminuição da expressão do CD89, como a espondilite anquilosante, têm um aumento na expressão do Fc α RI mais acentuado do que os controles neste tipo de experimento, o que de fato foi constatado em pacientes com espondilite anquilosante estudados na mesma ocasião em que estudamos os pacientes com bacteremia por gram-negativos que, a despeito do aumento da expressão do CD89, não apresentaram diferenças significativas na modulação

deste receptor em relação aos indivíduos saudáveis, como mostramos na **Tabela II**

193,209,211,242-244

TABELA II. Capacidade de aumento de expressão do Fc α RI após incubação *ex vivo* a 37°C em fagócitos de pacientes com bacteremia e Espondilite anquilosante na ausência de plasma autólogo

			<i>Controles</i>	<i>AS</i>	<i>gram-negativo</i>	<i>gram-positivo</i>
<i>Variação</i>	<i>média</i>	<i>dos</i>	2,6 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 1,0*	3,1 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,6
<i>monócitos</i>						
<i>Variação</i>	<i>média</i>	<i>dos</i>	2,8 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,6
<i>neutrófilos</i>						
<i>IgA (mg/ml)</i>			232 $\pm$ 86	408 $\pm$ 170	307 $\pm$ 78	363 $\pm$ 119

Células do sangue de indivíduos saudáveis (Co), com bacteremia por gram-negativos (G-), gram-positivos (G+) e espondilite anquilosante (AS) foram lavadas com PBS estéril com soro bovino fetal a 5% e incubadas por 60 minutos a 37°C, sendo então marcadas com o mAb A59-PE. As células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo e o valor médio da intensidade de fluorescência (IF) na escala logarítmica foi utilizada para a composição do índice: (IF das células marcadas com A59 e tratadas a 37°C – IF das células do tubo branco tratadas a 37°C) / (IF das células marcadas com A59 não tratadas – IF das células do tubo branco não tratadas) que expressa a capacidade de aumento da expressão do Fc α RI pela incubação *ex vivo* a 37°C em número de vezes. O índice é apresentado em média $\pm$ DP obtidos em seis diferentes experimentos. A Espondilite anquilosante, que apresenta diminuição da expressão do Fc α RI associada a aumento da IgA sérica, tem maior aumento proporcional do índice ((*) diferença significativa dos pacientes com AS em relação aos outros grupos utilizando ANOVA e procedimento de Tukey). A capacidade de aumento de expressão do Fc α RI dos pacientes com bacteremia e controles foi similar ^{193,244}.

4.7 Diminuição de massa molecular (M_r) do Fc α RI em fagócitos de pacientes com bacteremia por gram-negativos

A natureza bioquímica do Fc α RI nos monócitos e neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos foi avaliada pela mobilidade eletroforética em SDS-PAGE a 10% de um lisado celular obtido a partir de um número semelhante de células (2×10^7) de três pacientes e controles, isoladas por centrifugação em ficoll-hypaque e sedimentação em dextran, submetidas a iodinação das proteínas de superfície utilizando o método da lactoperoxidase, seguida de lise com um tampão composto por detergente (NP40) e inibidores de proteinases. Após a lise celular e centrifugação para retirada de organelas, núcleos e do citoesqueleto, foi realizada imunoprecipitação para depleção dos Fc γ R e recuperação das moléculas do Fc α RI, que foram imunoprecipitadas pelo uso de partículas de sepharose 4B associadas a fragmentos F(ab')₂ do mAb A77, específicos para o Fc α RI. A **Figura 7** mostra o aumento da intensidade das bandas do Fc α RI nos monócitos e neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos. A análise do M_r demonstra diminuição da massa do Fc α RI em ambos tipos celulares das amostras dos pacientes estudados quando comparados aos controles (50-65 kDa contra 55-75 kDa). O tratamento com a N-glycosidade F para deglicosilação demonstrou uma banda maior de 32 kDa, compatível com a massa esperada do núcleo protéico da isoforma α_1 do Fc α RI, indicando que a alteração de massa deve estar relacionada à alteração de glicosilação (dado não mostrado) ^{193,206,247}.

Figura 7. Análise bioquímica comparativa por SDS-PAGE com diminuição da massa dos Fc α RI de fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia por gram-negativos.

Um número semelhante (2×10^7) de monócitos e neutrófilos purificados de indivíduos normais (Co; linhas 1, 2, 5, 6) e paciente (G-; linhas 3, 4, 7, 8) tiveram as proteínas de superfície marcadas com Na^{125}I e as membranas solubilizadas em tampão de lise NP-40 0,5%. Os lisados foram imunoprecipitados com fragmentos F(ab')_2 de IgG1 $\square$ de camundongos (irrelevante) ligados a partículas de Sepharose 4B (linhas 1, 3, 5, 7) ou fragmentos F(ab')_2 do mAb A77 ligados a partículas de Sepharose 4B (linhas 2, 4, 6, 8) e migrados em SDS-PAGE 10%. Os marcadores de peso molecular estão indicados (kDa) ¹⁹³.

4.8 Aumento da expressão da cadeia γ associada ao Fc α RI nos pacientes com bacteremia por gram-negativos

A expressão da cadeia gama associada ao Fc α RI foi avaliada pela co-imunoprecipitação do complexo multimolecular Fc α RI- γ 2 utilizando um procedimento semelhante ao já descrito para a realização do SDS-PAGE com algumas diferenças: não foi realizada iodinação das proteínas de superfície e a solução de lise foi preparada com um detergente suave, a digitonina, para manter a associação não covalente da cadeia gama ao receptor. O lisado foi submetido a imunoprecipitação da maneira já descrita e à migração eletroforética em SDS-PAGE 12,5% em condição não redutora para realização de "immunoblotting". As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, foram marcadas com um anticorpo policlonal de coelho anti-cadeia gama e um segundo anticorpo anti- IgG de coelho associado a peroxidase da raiz forte (HRP) para leitura por quimiluminescência amplificada (ECL). A **Figura 8** mostra o aumento da expressão da cadeia γ associada ao Fc α RI em monócitos e neutrófilos de um paciente com bacteremia por gram-negativos, resultado similar ao observado em outros dois pacientes (dados não mostrados)²¹⁷.

Figura 8. Aumento da expressão da cadeia γ associada ao Fc α RI nos fagócitos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos.

Fagócitos do sangue (1×10^7) separados em ficoll-hypaque foram lisados por um tampão de digitonina a 1%. O lisado foi imunoprecipitado usando fragmentos F(ab')₂ de IgG1 μ κ (IgG1) (irrelevante) ou fragmentos F(ab')₂ do mAb A77 anti-Fc α RI (A77) ligados a partículas de Sepharose 4B. As proteínas precipitadas foram separadas em SDS-PAGE 12,5% sob condição

4.9 Fosforilação de tirosina na cadeia γ associada ao Fc α RI em neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos

A fosforilação da tirosina do ITAM da cadeia gama associada ao receptor foi avaliada por "immunoblotting" utilizando um anticorpo monoclonal anti- fosfotirosina após a co-imunoprecipitação da cadeia γ associada com o Fc α RI como descrito acima, com SDS-

PAGE 10% sob condição não redutora. A **Figura 9** mostra a expressão de cadeia γ fosforilada associada ao Fc α RI nos neutrófilos de um paciente com bacteremia por gram-negativos detectada *ex-vivo* sem ativação do receptor *in vitro*. Não foi detectada fosforilação em células dos pacientes com bacteremia por gram-positivos ou em indivíduos normais

217

Figura 9. Fosforilação da cadeia γ associada ao CD89

Neutrófilos e células mononucleares (1×10^7) foram lisados com um tampão digitonina a 1%. Os lisados foram imunoprecipitados usando fragmentos F(ab')₂ do mAb anti-CD89 A77 ligados a partículas de Sepharose 4B. As proteínas imunoprecipitadas foram separadas em SDS-PAGE 10%, sob condição não redutora, e analisadas por "immunoblotting" (IB) usando o mAb 4G10 anti-fosfotirosina e anticorpos anti- IgG de camundongo conjugado a HRP para leitura em ECL. A presença de fosforilação da cadeia gama está indicada pela seta²¹⁷.

4.10 Aumento das concentrações de TNF- α e IL-6 no sangue dos pacientes com bacteremia e correlação da expressão do Fc α RI em fagócitos com os níveis de IL-6

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ no soro dos pacientes com bacteremia por gram-positivos, gram-negativos e controles foram verificadas através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) de alta sensibilidade. Os soros de alguns pacientes com concentrações elevadas de TNF- α e IL-6 foram diluídos no tampão de amostra do kit para adequação da concentração da amostra aos limites de resolução do espectrofotômetro utilizado. Foi verificado um aumento dos níveis de TNF- α no sangue (18,64 (DP 21,59 n=10) para o grupo gram-negativo e 30,95 (DP 73,95 n=9) para o grupo gram-positivo contra 3,18 (DP 0,96 n=10) do grupo controle). Também foi verificado um aumento significativo dos níveis de IL-6 no sangue (55,14 (DP 43,24 n=10) no grupo gram-negativo e 55,30 (DP 49,96 n=9) no grupo gram-positivo contra 7,82 (DP 9,29 n=10) no grupo controle) utilizando o teste ANOVA e o procedimento de Tukey. A **figura 10** (A e B) mostra as concentrações de TNF- α e IL-6 nos pacientes e controles e a correlação positiva (C e D) entre a expressão do receptor em ambos tipos celulares e a concentração de IL-6 no sangue ($r = 0,4$ e $p < 0,03$ para os monócitos e $r = 0,39$ e $p < 0,03$ para os neutrófilos, utilizando regressão linear). Não encontramos correlação entre a expressão do receptor e os níveis de TNF- α . Não foi observado aumento dos níveis séricos de IFN- γ nestes pacientes (dados não mostrados).

figura 10. Concentrações de TNF- α e IL-6 nos pacientes com bacteremia

C. Correlação do CD89 com a IL-6 em neutrófilos ($p < 0,03$; $r = 0,39$)

D. Correlação do CD89 com a IL-6 em monócitos ($p < 0,03$; $r = 0,4$)

5 DISCUSSÃO

A IgA foi identificada há quase cinquenta anos, sendo reconhecida na década seguinte como a principal imunoglobulina das mucosas. Desde então foi estabelecida sua participação em processos imunológicos, notadamente nos mecanismos de defesa contra infecções e em algumas doenças. A atuação da IgA secretória (sIgA) nas mucosas, favorecendo a eliminação de antígenos estranhos sem desencadear resposta inflamatória, aliada a sua aparente incapacidade de ativar o complemento e de atuar como opsonina no sangue, favoreceram a visão da IgA como efetora de uma resposta imune específica de características não inflamatórias. A IgA também pode inibir a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio mediadas pela ativação da via clássica (mediada pela IgG) do complemento. A produção e o catabolismo da IgA do sangue e da IgA das mucosas em humanos são independentes, sendo que a IgA do sangue é produzida na medula óssea e a IgA das mucosas na lâmina própria, podendo haver intercâmbio de células entre os compartimentos. Alguns autores atribuem à IgA do sangue a função de “guardião discreto”, que elimina antígenos que tenham conseguido transpor as barreiras mucosas sem estabelecer resposta inflamatória^{184,203,239}.

As deficiências de IgA têm um espectro de manifestações clínicas amplo que varia da ausência de sintomas ao aumento da prevalência de infecções respiratórias, alergias e doenças auto-imunes. O estudo destas doenças poderia fornecer informações acerca do papel da IgA do sangue mas como elas também comprometem a produção da IgA das mucosas as informações que podem ser abstraídas de seu estudo não são específicas. O estudo de modelos experimentais, como os ratos, também apresenta limitações. Diferente do que ocorre no homem, a IgA das mucosas dos ratos é transportada pela linfa para a circulação e a IgA do sangue é secretada pela bile para o tubo digestivo. Além disto os ratos não têm um receptor específico conhecido para a porção Fc de IgA. Sabe-se que

algumas doenças têm alterações nos níveis séricos de IgA e na expressão do Fc α RI (CD89). A nefropatia por IgA, na qual há depósito glomerular de imunocomplexos de IgA, inclusive de complexos IgA - sFc α RI (forma solúvel do receptor), e a espondilite anquilosante apresentam aumento da IgA sérica e diminuição da expressão do CD89 com alterações de glicosilação, o que sugere um defeito do catabolismo da imunoglobulina mediado por seu receptor. A cirrose alcoólica e a síndrome de imunodeficiência adquirida também apresentam níveis elevados de IgA e diminuição da expressão do Fc α RI em monócitos. A alteração de expressão do Fc α RI na cirrose alcoólica esta associada a uma deficiência de endocitose mediada por este receptor, o que pode ser um dos fatores contribuintes para o aumento no risco de infecção bacteriana encontrado nesta condição clínica^{184,203,242-245,251}.

A identificação do Fc α RI possibilitou a compreensão de vários aspectos funcionais da IgA no organismo. A ligação dos imunocomplexos de IgA ao Fc α RI possibilita a indução de fagocitose, a produção de superóxidos e a liberação de citocinas inflamatórias, em aparente contradição com a visão inicial da IgA como efetora não inflamatória. Os estudos funcionais do Fc α RI têm sido realizados em modelos *in vitro* ou *ex vivo*, o que proporciona uma certa limitação na interpretação do significado destes achados na homeostase e na patologia. Modelos experimentais com camundongos transgênicos que expressam o receptor humano, em que pese suas já discutidas limitações, devem possibilitar um salto qualitativo na compreensão da fisiologia e fisiopatologia da IgA^{193,211,221-223,251}.

A definição do aumento da expressão do Fc α RI induzida pelo LPS e por citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-8 em modelos experimentais e a constatação do

aumento da expressão dos Fc γ R em infecções e na sepsis sugeriram a possibilidade de que houvesse alteração do Fc α RI na resposta imune às infecções bacterianas. Apesar de já bem estabelecida, a qualidade da IgA como opsonina promotora de fagocitose através da ligação ao seu receptor vem despertado crescente interesse, particularmente por estudos com animais transgênicos, sugerindo sua importância na resposta do organismo às infecções bacterianas^{210,211,223-227,240-241}.

Na sepsis há aumento da expressão do Fc γ RIII em monócitos do sangue, que guarda correlação com níveis séricos elevados de IL-6. A expressão deste receptor é característica dos macrófagos teciduais, um estágio de diferenciação desta linhagem celular. Monócitos circulantes com capacidade de fixação de IgG, ou FcR+, são uma sub-população celular cuja proporção está aumentada na sepsis e que, aliada a uma relativa inabilidade como células apresentadoras de antígeno, produzem maior quantidade de citocinas inflamatórias, o que está de acordo com o papel central destas células na rede de eventos que produz a resposta inflamatória sistêmica à infecção. Tomados em conjunto, estes fenômenos indicam a ativação destas células, o que se presta ao combate do insulto bacteriano tanto no sangue como nos tecidos.^{224,236}.

O estudo de pacientes com bacteremia e sinais de resposta inflamatória sistêmica procurou avaliar a expressão do Fc α RI nos fagócitos do sangue em uma situação na qual estas células pudessem estar expostas tanto a produtos bacterianos, como o LPS, quanto as citocinas inflamatórias, como o TNF- α , que notoriamente podem modular a expressão deste receptor. É possível que a resposta dos fagócitos teciduais, particularmente de tecidos afetados diretamente pelo processo infeccioso, seja algo diferente da resposta dos fagócitos do sangue, mas a obtenção destas células de pacientes para estudo é um tanto difícil. Verificamos, pela variação da fluorescência de células incubadas com anticorpos

monoclonais anti-CD89 marcados, utilizando a citometria de fluxo, um aumento da expressão do Fc α RI em monócitos e neutrófilos de pacientes com bacteremia por germes gram-negativos em relação aos controles, com um aumento não significativo da expressão do receptor apenas nos neutrófilos dos pacientes com bacteremia por germes gram-positivos. Este achado está de acordo com a constatação experimental do aumento da expressão do receptor pelo LPS e sugere a participação deste modificador de resposta biológica no fenômeno descrito. O TNF- α , que também pode influir no aumento da expressão do receptor, encontrava-se com níveis séricos elevados nos dois grupos de pacientes. Estes achados sugerem que a elevação da expressão do receptor dependa mais da exposição ao LPS dos germes gram-negativos do que da ativação inflamatória sistêmica. Devemos levar em consideração o fato de que a concentração de uma citocina no sangue não reflete necessariamente sua atividade biológica ou a ligação da mesma aos seus receptores específicos nas células, além da possibilidade da ação de várias citocinas concomitantemente, particularmente na sepsis. Vale ressaltar que os mAb anti-CD89 utilizados não competem com a IgA pelos sítios de ligação da porção Fc desta ao receptor, não havendo influência da ocupação pela IgA na ligação do anticorpo ao receptor^{51,207,211,213,237}.

A diminuição da massa dos receptores em relação aos controles foi verificada por migração eletroforética em SDS-PAGE de lisados de fagócitos submetidos a iodinação das proteínas de superfície e imunoprecipitação para isolamento dos Fc α RI. Experimento semelhante com uso da N-glycosidase F para isolamento do núcleo protéico demonstrou que a massa deste estava dentro do previsto para a isoforma α_1 (32 kDa), sugerindo que a alteração de massa do receptor decorra de alterações de glicosilação. O aumento da síntese do receptor poderia induzir a liberação de moléculas com padrões intermediários de

glicosilação, o que justificaria o achado. O estado de glicosilação do receptor pode influir na afinidade do ligante. A dessialização do Fc α RI aumenta a ligação da IgA ao receptor na ordem de cinco vezes. Doenças com IgA elevada com diminuição da expressão do CD89 apresentam aumento da massa do receptor com aumento de glicosilação e aumento da ocupação do receptor pela IgA. A influência desta alteração de glicosilação na afinidade da IgA pelo receptor nestes pacientes deve ser determinada por estudos adicionais. O LPS das bactérias gram-negativas é um ativador policlonal de células B e induz a secreção inespecífica de imunoglobulinas. Em nossos pacientes os níveis séricos de IgA se encontravam dentro da variação normal e a ocupação do receptor pela IgA, verificada por avaliação da fluorescência de células marcadas com anticorpos específicos contra IgA por citometria de fluxo, foi semelhante a dos controles. Os níveis normais de IgA no sangue e da ocupação do receptor pela IgA nestes pacientes indicam que o catabolismo da IgA mediado pelos Fc α RI deva ser eficiente ^{36,193,207,244}.

Outro achado importante do nosso estudo foi o aumento da expressão da cadeia gama associada ao Fc α RI (FcR- γ) nos pacientes com bacteremia por gram-negativos. A expressão da cadeia gama associada ao Fc α RI nos fagócitos foi estudada por “immunoblotting”. As células foram lisadas com um detergente suave, a digitonina, para que não houvesse rompimento da ligação receptor cadeia gama, possibilitando a co-imunoprecipitação com um anticorpo monoclonal contra Fc α RI, que permite a avaliação da expressão apenas da FcR- γ associada ao Fc α RI. Após a migração eletroforética em gel de poliacrilamida foi efetuada a transferência para membrana de nitrocelulose para incubação com um anticorpo específico anti-FcR- γ . Observou-se um aumento da expressão da cadeia gama associada ao receptor. O Fc α RI pode ou não estar associado de modo não covalente, à cadeia gama (FcR- γ) que permite a transdução de sinal e o

desencadeamento de processos metabólicos celulares necessários à fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas. O receptor não associado à FcR- γ é capaz de internalizar e restituir a IgA ao meio extracelular, promovendo a reciclagem da mesma. Recentemente foi descrita em neutrófilos do colostro humano a expressão do Fc α RI sem cadeia gama associada, possibilitando a agregação e fagocitose bacteriana sem o desencadeamento de produção de espécies reativas de oxigênio. A FcR- γ pode estar associada a outros FcRs, como o Fc γ RI e Fc γ RIII, sendo necessária para a transdução de sinal destes receptores. O aumento da expressão da cadeia gama, essencial para a transdução de sinal, confere à população de Fc α RI, cuja expressão está aumentada, uma condição necessária para a ativação das funções efetoras decorrentes da ligação dos imunocomplexos de IgA ao receptor^{197,198,214-220, 252}.

A fosforilação da cadeia gama associada ao CD89 foi avaliada por “immunoblotting”, empregando uma metodologia semelhante à descrita, utilizando ao final um anticorpo específico anti- FcR- γ fosforilada. Observou-se fosforilação da cadeia gama associada ao Fc α RI nos neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos, fato que indica a ativação deste receptor nestas células. A fosforilação da cadeia gama associada ao Fc α RI depende de alterações da estrutura quaternária do complexo multimolecular que expõe os sítios de fosforilação e não pode ser explicada como um achado inespecífico em uma célula ativada. A ausência de fosforilação nos pacientes do grupo gram-positivo, cujas células também estiveram sujeitas à ativação por mediadores inflamatórios, está de acordo com esta premissa. Considerando que a fosforilação da cadeia gama é essencial para a fagocitose, este achado está de acordo com os experimentos

que demonstraram a participação do Fc α RI na fagocitose de bactérias mediada por IgA em neutrófilos^{197,198,218-220,241}.

Os níveis elevados de IL-6 no sangue destes pacientes apresentaram uma correlação com o aumento da expressão do Fc α RI, sugerindo uma possível participação deste receptor na indução da secreção desta citocina, como já fora observado nos pacientes sépticos com elevação da expressão do Fc γ RIII em monócitos. A valorização, da importância desta via na secreção de IL-6 neste pacientes, contudo, é discutível, tendo em vista que a elevação dos níveis desta citocina no sangue de pacientes com resposta inflamatória sistêmica à infecção é um achado freqüente e que existem vários mecanismos redundantes atuando no controle da secreção desta citocina na sepsis^{221,224}.

Tomados em conjunto estes achados demonstram o aumento da expressão e a ativação do complexo multimolecular Fc α RI- γ 2, especificamente nos pacientes com bacteremia por germes gram-negativos. É interessante notar que o LPS induz a secreção inespecífica de imunoglobulinas e que há uma tendência ao predomínio do fenótipo Th2 com conseqüente incremento da imunidade humoral e depressão da imunidade celular na sepsis. É possível que estes achados representem uma preparação do hospedeiro no sentido de otimizar o reconhecimento de imunocomplexos de IgA, possibilitando a fagocitose e, possivelmente, a secreção de citocinas, estimulando desta forma a resposta imune destes pacientes. A ativação destas células circulantes pode servir ao combate do insulto bacteriano na própria circulação e em sítios de infecção localizados fora dos vasos ou nas mucosas, que também podem atrair estas células ativadas. Particularmente nas mucosas, onde há abundância de IgA, neutrófilos com uma hipertrofia do seu aparato de identificação e fagocitose de imunocomplexos de IgA poderiam ser úteis para a eliminação de bactérias^{36,171,239}.

6 CONCLUSÕES

Demonstramos o aumento da expressão do Fc α RI em monócitos e neutrófilos dos pacientes com bacteremia por gram-negativos. Pacientes com bacteremia por gram-positivos não apresentaram aumento significativo da expressão do receptor. O aumento da expressão do receptor não foi associado à alteração da capacidade de aumento da expressão do receptor pela incubação *ex vivo* a 37°C, aos níveis de IgA do sangue ou a ocupação do receptor pela IgA.

A massa molecular do receptor estava diminuída nos pacientes com bacteremia por gram-negativos, com massa do núcleo protéico compatível com a isoforma α 1 do Fc α RI, indicando que a alteração de massa se deve a alteração de glicosilação.

A expressão da cadeia gama associada ao Fc α RI também estava aumentada nestes pacientes. Neutrófilos dos pacientes com bacteremia por germes gram-negativos apresentaram fosforilação da cadeia gama, indicando ativação do receptor *in vivo*.

Os pacientes com bacteremia apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-6 no sangue, e os níveis de IL-6 apresentaram correlação com o aumento da expressão do receptor.

Tomados em conjunto, estes achados indicam a participação do Fc α RI na resposta inflamatória a infecção.

7 BIBLIOGRAFIA

1. CDC - Centers of Disease Control. Increase in national hospitalar discharge survey rates for septicemia – United States, 1979-1987. **MMWR** , v.39, p.31-34, 1990.
2. CDC - Centers of Disease Control . National Center for Health Statistics. Mortality patterns – United States, 1990. **Monthly Vital Stat Rep** , v.17, p. 225-227, 1990.
3. Niederman, M.S.; Fein, A.M. Sepsis Syndrome, the adult respiratory distress syndrome and nosocomial pneumonia : a common clinical consequences. *Clin Chest Med* , v.11, p.633-656, 1990.
4. Wenzel, R.P. The mortality of hospital-acquired blood-stream infections : need for a new vital statistics ? *Int J Epidemiol* , v.17, p.225-227, 1988.
5. Parrillo, J.E.; Parker, N.N.; Natanson, C. et al. Septic shock in humans – advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction ant therapy. *Ann Intern Med* , v.113, p. 227-242, 1990.
6. Bone, R.C. Sepsis, the sepsis syndrome, mutil-organ failure : a plea of comparable definitions. **Ann. Inter. Med.**, v.114, p.332-333, 1991.
7. Bone, R.C.; Balk, R.A.; Cerra, F.B. et al. American College of Chest physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference : definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest** , v.101, p. 1644 - 1655, 1992.
8. Cody, C.S.; Dunn, D.L. Endotoxins in septic shock. In Neugebauer E, Holaday J, eds. **Handbook of mediators in septic shock**. Boca Raton, FL. USA. CRC Press, p.1-37, 1993.
9. Warren, H.S. Strategies for the treatment of sepsis. **N Engl J Med** , v. 336, p. 952-953, 1997.
10. Beutler, B. ; Cerami, A . Cachectin : more than a tumor necrosis factor. **N Engl J Med**, v.316, p.379-385, 1987.
11. Opal, S.M. ; Cross, A.S. Clinical trials for severe sepsis – past failures and future hopes. **Infect Dis Clin North Am**, v.13, p.285-297, 1999.
12. Brun-Buisson, C.; Doyon, F.; Carlet, J. Incidence, risk factors and outcome of severe sepsis and septic shock in adults : a multicenter prospective study in intesive care units. **JAMA**, v.274, p.968-974, 1995.
13. Reynolds, H.Y. Host defense impairments that may lead to respiratory infections. **Clin Chest Med** , v.8, p.339-358, 1987.

14. Santos, J.I.; Nutrition, infection and immunocopentence. **Infect Dis Clin North Am** , v.8, p.243-263, 1994.
15. MacGregor, R.R. Alcohol and immune defense. **JAMA** , v.256, p.1474-1479, 1986.
16. McMahon, M.M.; Bistrian, B.R. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. **Infect Dis Clin North Am** , v.9, p. 1-9, 1995.
17. Whimby, E.; Kiehn, T.E.; Brannon, P. et al. . Bacteremia and fungemia in patients with neoplastic disease. **Am J Med** , v.82, p. 723-730, 1987.
18. Dummer, J.S.; Ho, M.; Simmons, R.L. Infections in solid organ transplant recipients. In : Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. eds. **Principles and practice of infectious disease**. p. 2722-2732, 4^a edição, NY, USA, Churchill Livingstone, 1995.
19. Selik, R.M.; Chu, S.Y.; Ward, J.W. Trends in infectious disease and cancer among persons dying of HIV infection in the United States from 1987 to 1992. **Ann Intern Med** , v.123, p. 933-936, 1995.
20. Glauser, M.P.; Zanetti, C.; Baumgartner, J.D.; Cohe, J. Septic shock : pathogenesis. **Lancet** , v.338, p. 732-736, 1991.
21. Fearon, D.T.; Locksley, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science** , v.272, p. 50-53, 1996.
22. Bone, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med** , v.115, p.457-469, 1991.
23. Dofferhoff, A.; De Jong, H.; Bom, V. et al. Complement activation and the production of inflammatory mediadors during the treatment of severe sepsis in humans. **Scand J Infect** , v.24, p. 955-963, 1995.
24. Deitch, E.A.; Mancini, M.C. Complement receptors in shock and transplantation. **Arch Surg** , v.128, p. 1222-1226, 1993.
25. Holmskov, U.L. Collectins and collectin receptors in innate immunity. **APMIS** v.100, p.1-59, 2000.
26. Nepomuceno, R.R.; Henschen-Edman, A .H.; Burgess, W.H.; Tenner, A .J. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. **Immunity** v.6 p.119-129, 1997.
27. Turner, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. **Immunobiology**. v.199, p.327-339, 1998.

28. Westphal, O.; Westphal, U.; Sommer, T. History of pyrogen research. In Schlessinger, D. ed. **Microbiology 1977** , p. 221, NY, USA, American Society of Microbiology, 1977.
29. Raetz, C.R. . Biochemistry of endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v.59, p.129-170, 1990.
30. Ulevitch, R.J.; Tobias, P.S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr Opin Immunol** , v.11, p.19-22, 1999.
31. Nathan, C.F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest** , v.79, p.319-326, 1987.
32. Cannon, J.G.; Tompkins, R.G.; Gelfand, J.A. et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. **J Infect Dis.** , v.161, p. 79-84, 1990.
33. Dinarello, C.A. ; Gelfand, J.A.; Wolf, S.M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **JAMA** , v.269, p. 1829-1835, 1993.
34. Waage, A.; Brandtzaeg, P.; Halstensen, A. et al. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. **J Exp Med**, v.169, p.333-338, 1989.
35. Remick, D.G. Applied Molecular Biology of Sepsis. **J Crit Care** , v.10, p.198-212, 1995.
36. Hu, H. Moller, G. Lipopolysaccharide-stimulated events in B cell activation . **Scand J Immunol** , v.40, p. 221-227, 1994.
37. Burd, R.S.; Cody, C.S.; Dunn, D.L. **Immunotherapy of Gram-negative bacterial sepsis**. P. 38-41 TX , USA, Landes, 1992.
38. Moore, K.L.; Andreoli, S.P.; Esmon, N.L. et al. Endotoxin enhances tissue factor and supresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. **J Clin Invest**, v.79, p. 124-130, 1987.
39. Carlos, T.M.; Schwartz, B.R.; Kovach, N.L. et al. Vascular cell adhesion molecule – 1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. **Blood** , v.76, p. 965-970, 1990.

40. Gough, D.B.; Jordan, A.; Mannick, J.A. et al. Impaired cell-mediated immunity in experimental abdominal sepsis and the effect of interleukin 2. **Arch Surg** , v.127, p.859-863, 1992.
41. Ulevitch, R.J. ; Tobias, P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**. v.13, p.437-457, 1995.
42. Lamping, N.; Dettmer, R.; Schroder, N.W. et. Al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. **J Clin Invest** , v.101, p. 2065-2071, 1998.
43. Weinstein, S.L.; Sanghera, J.S.; Lemke, K. et al. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. **J Biol Chem**, v.267, p.14955-14962, 1992.
44. Arditi, M.; Zhou, J.; Torres, M. et al. Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitoge-activated protein kinases p44, p42 and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD-14 dependent manner. **J Immunol** , v.155, p.3994-4003, 1995.
45. Bowie, A.; O'Neill, A.J. The interleukin-1 receptor / toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J Leukoc Biol**, v.67, p-508-514, 2000.
46. Hampton, R.; Golenbock, D.; Penman, M. et al. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. **Nature** , v.352, p. 342-344, 1991.
47. Wright, S.; Detmers, P.; Adia, Y. et al. CD 18 deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. **J Immunol** v.144, p.2566-2571, 1990.
48. Hovde, C.J.; Gray, B.H. Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun** v.54, p.142-148, 1986.
49. Opal, S.M.; Palardy, J.E.; Marra, M.N. et al. Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. **Lancet**, v.344, p.429-431, 1994.
50. Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. **J Inflamm** , v.45, p.13-26, 1995.
51. Munoz, C.; Carlet, J.; Fitting, C. et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **J Clin Invest** , v.88, p.1747-1754, 1991.
52. Rubins, J.B.; Charboneau, D.; Paton, J.C. et al. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. **J Clin Invest** , v.95, p.142-150, 1995.

53. Herman, A.; Kappler, J.W.; Marrak, P. et al. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. **Ann Rev Immunol**, v.9, p.745-772, 1991.
54. Jennings, H.; Lugowski, C.; Young, N. Structure of the complex polysaccharide C substance from *Streptococcus pneumoniae*. **Biochem J**, v.19, p.4712-4719, 1980.
55. Pugin, J.; Heumann, I.D.; Tomas, A. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v.1, p.509-516, 1994.
56. Cundell, D.R.; Gerard, N.P.; Gerard, C. et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. **Nature**, v.377, p. 435-438, 1995.
57. Polotsky, V.Y.; Fischer, W.; Ezekowitz, A.B. et al. Interactions of human mannose-binding protein with lipoteichoic acids. **Infect Immun** v.64, p.380-383, 1996.
58. Tuomanen, E.; Austrian, R.; Masure, H.R. Pathogenesis of pneumococcal infection. **N Engl J Med**, v.332, p. 1280-1284, 1995.
59. Chen, T.Y.; Lei, M.G.; Suzuki, T. et al. Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. **Curr Top Microb Immunol**, v.181, p.169-188, 1992.
60. Miyajima, A.; Kitamura, T.; Harada, N. et al. Cytokine receptors and signal transduction. **Annu Rev Immunol**. v.10, p.295-331, 1992.
61. Spellerberg, B.; Rosenow, C.; Sha, W. et al. Pneumococcal cell wall activates NF- κ B in human monocytes : aspects distinct from endotoxin. **Microb Pathogen**, v.20, p.309-317, 1996.
62. Sha, W.C.; Liou, H.C.; Tuomanen, E.I. et al. Target disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. **Cell**, v.80, p.321-330, 1995.
63. Tartaglia, L.A.; Goeddel, D.V. Two TNF receptors. **Immunol Today**, v.13, p. 151-153, 1992.
64. Epstein, F.H. Nuclear factor- κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. **N Engl J Med**, v.336, p. 1066-1071, 1997.
65. Song, S.; Karl, I.E.; Ackerman, J.J. et al. Increased intracellular Ca^{2+} : a critical link in the pathophysiology of sepsis ? **Proc Natl Acad Sci USA**, v.90, p.3933-3937, 1993.

66. Burke, P.A.; Murray-Canning, C.; Chartier, S. et al. Alterations in Ca^{2+} signal transduction in critically ill surgical patients. **Surgery** , v.116, p.378-387, 1994.
67. Choudhry, M.; Ahmad, S.; Sayeed, M. Role of Ca^{2+} in prostaglandin E_2 – induced T-lymphocyte proliferative suppression in sepsis. **Infect Immun** , v.63, p.3101-3105, 1995.
68. Zidek, Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw*, v.10, p. 319-328, 1999.
69. Jawa, R.S.; Solomkin, J. Cellular effectors of the septic process in Fein, A.M.; Abraham, E.M.; Balk, R.A. et al. Eds. **Sepsis and Multiorgan Failure** , p. 74-99, MD, USA, Williams & Wilkins, 1997.
70. Echtenacher, B.; Männel, D.N.; Hültner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature** , v.381, p.75-77, 1996.
71. Babior, B.M. Oxidants from phagocytes : agents of defense and destruction. **Blood** , v.64, p.959-964, 1984.
72. Mundi, H.; Björkstén, B.; Svanborg, C. et al. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. **Infect Immun** , v.59, p.4168-4172, 1991.
73. Asad, N.R.; Asad, L.M.B.O.; Almeida, C.E.B. et al. Lethal interaction between hydrogen peroxide and O-phenanthroline in *Escherichia coli* . **Br J Med Biol Res** , v.27, p.2551-2555, 1994.
74. Ames, B.N.; Shinnena, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases agent. **Proc Natl Acad Sci USA** , v.90, p.7915-7922, 1993.
75. Cerami, A . Inflammatory cytokines. **Clin Immunol Immunopathol** , v.62, p. S3-S10, 1992.
76. Bellomo, R. The cytokine network in the critically ill. **Anaesth Int Care** , v.20, p.288-302, 1992.
77. Lloyd, A.R.; Oppenheim, J.J. Polys's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol Today**, v.13, p.169-172, 1993.
78. Bevilacqua, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* , v.11, p. 767-804, 1993.
79. Badr, K.F. Leukotrienes and 15-lipoxygenase products in glomerulonephritis . **Adv Nephrol** , v.24, p. 19-31, 1995.

80. Mestecky, J.; McGhee, J.R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. **Adv Immunol** , v.9, p.115-145, 1984.
81. Lomax, K.; Leto, T.; Nunoi, H. et al. Recombinant 47 kD cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. **Science** , v.245, p.409-412, 1989.
82. Kanofsky, J. Singler oxygen production by biological systems. **Chem Biol Interact** , v.70, p. 1-28, 1989.
83. Campbell, E.; Senior, R.; McDonald, J. et al. Proteolysis by neutrophils : relative importance of cell-substrate contact and oxidative inactivation of proteinase inhibitors in vitro. **J Clin Invest** , v.70, p.845-852, 1982.
84. Plow, E. Leukocyte elastase release during blood coagulation: a potential mechanism of activation of the alternative fibrinolytic pathway. **J Clin Invest**, v.69, p.564-572, 1982.
85. Abraham, E.; Wunderink, R.; Silverman, H. et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor - α in patients with sepsis syndrome. **JAMA** , v. 273, p. 931-934, 1995.
86. Vannier, E.; Miller, L.C.; Dinarello, C.A. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4 : interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 4076-4080, 1992.
87. Bone, R.C. Systemic inflammatory response syndrome : A unifying concept of systemic inflammation in Fein AM, Abraham EM, Balk RA et al. Eds. **Sepsis and Multiorgan Failure** , p. 3-10, MD, USA, Williams & Wilkins, 1997.
88. Petrak, R.A.; Balk, R.A.; Bone, R.C. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthesis inhibitors in the pathogenesis of multiple organ failure. **Crit Care Clin**, v.5, p.303-314, 1989.
89. Sigurdsson, G.H.; Christenson, J.T.; Bader-el-Rakshy, M. et al. Intestinal platelet trapping after traumatic and septic shock. Na early sign of sepsis and multiorgan failure in critically ill patients ? **JAMA** , v.270, p.458-467, 1992.
90. Levi, M.; Ten Cate, H.; van der Poll, T. et al. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. **JAMA**, v.270, p.975-979, 1993.
91. Gomez-Jimenez, J.; Salgado, A.; Mourelle, M. et al. Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. **Crit Care Med**, v.23, p.253-258, 1995.

92. Pinsky, M.R.; Vincent, J.L.; Deviere, J. et al. Serum cytokine levels in human septic shock. **Chest**, v.103, p.565-575, 1993.
93. Meduri, G.U.; Headley, S.; Kohler, G. et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. **Chest** , v.107, p.1062-1073, 1995.
94. Abbas, A.K.; Lichtman, A .H.; Pober, J.L. **Cellular and molecular immunology**. Edited by Abbas, A .K. Saunders Company, 3rd ed; p.96-114 , 1997.
95. Nicola, N.A. Structural aspects of cytokine / receptor interactions. **Ann NY Acad Sci** , v.776, p.253-262, 1995.
96. Beutler, B.; Cerami, A . The biology of cachectin / TNF – a primary mediator of the host response. **Ann Rev Immunol**, v.7, p.625-655, 1989.
97. Kriegler, M.; Perez, C.; DeFay, K. et al. A novel form of TNF / cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein : ramifications for the complex physiology of TNF. **Cell** , v.53, p.45-53, 1988.
98. Waage, A . Production and clearance of TNF in rats exposed to endotoxin and dexamethasone. **Clin Immunol Immunopathol** , v.45, p.348-355, 1987.
99. Giroir, B. Mediators of septic shock : new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. **Crit. Care Med**, v.21, p-780-789, 1993.
100. Beutler, B.; Krochin, N.; Milsark, I.W. et al. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis : mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v.229, p.869-871, 1985.
101. van der Poll, T.; Lowry, S. Tumor necrosis factor in sepsis : mediator of multiple organ failure or essential part of host defense ? **Shock**, v.3, p.1-12, 1995.
102. van der Poll, T.; van Deventer, S.J.H. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infect Dis Clin North Am**, v.13, p.413-426, 1999.
103. Vassali, P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. **Annu Rev Immunol**. v.10, p.411-452, 1992.
104. Bazzoni, F.; Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**. v.334, p.1717-1725, 1996.
105. Vandenabeele, P.; Declercq, W.; Beayert, R. et al. Two tumor necrosis factor receptors : structure and function. **Trends Cell Biol**, v.5, p.392-399, 1995.
106. Dinarello, C.A . Biology fo interleukin-1. **Chem Immunol** , v.51, p.1-32, 1992.

- 107.Dinareello, C.A . Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. **Blood**, v.77, p.1627-1652, 1991.
- 108.Hannum, C.H.; Wilcox, C.J.; Arend, W.P. et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. **Nature**, v.343, p.336-340, 1990.
- 109.Rogy, M.A.; Coyle, S.M.; Oldenburg, H.S. et al. Persistently elevated soluble tumor necrosis factor receptor and interleukin-1 receptor antagonist levels in critically ill patients . **J Am Coll Surg**, v.178, p.132-138, 1994.
- 110.van Snick, J. Interleukin-6 : an overview. **Annu Rev Immunol** , v.8, p.253-278, 1990.
- 111.Wickenhauser, C.; Lorenzen, J.; Thiele, J. et al. Secretion of cytokines (interleukins-1 α , -3 and -6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor) by normal human bone marrow megakaryocytes. **Blood**, v.85, p.685-691, 1995.
- 112.Zhou, D.; Kusnecov, A .W.; Shurin, M.R. et al. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin-6 : relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology** , v.133, p.2523-2530, 1993.
- 113.Wong, G.C.; Clark, S.C. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network . **Immunol Today**, v.9, p.137-139, 1988.
- 114.Schwabe, M.; Zhao, J.; Kung, H.F. Differential expression and ligand-induced modulation of the human interleukin-6 receptor on interleukin-6 responsive cells . **J Biol Chem**, v.269, p.7201-7209, 1994.
- 115.Hirano, T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v.62, p.S60-S65, 1992.
- 116.van Zee, K.J.; DeForge, L.E.; Fischer, E. et al. IL-8 in septic shock, endotoxemia and after IL-1 administration. **J Immunol** , v.146, p.3476-3482, 1991.
- 117.Horuk, R. The interleukin-8 receptor family : from chemokines to malaria. **Immunol Today**, v.15, p.169-174, 1994.
- 118.Solomkin, J.S.; Bass, R.C.; Bjornson, H.S. et al. Alterations of neutrophil responses to tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 following endotoxemia. **Infect Immun** , v.62, p.943-947, 1994.
- 119.Muret, M.C.; Fitting, C.; Losser, M.R. et al. Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. **Blood**. v.91, p.3439-3446, 1998.

120.Marie, C.; Fitting, C.; Cheval, C. et al. Presence of high levels of leukocyte-associated interelkin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. **Infect Immun.** v.65, p.865-871, 1997.

121.Trichieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antige-specific adaptative immunity. **Ann Rev Immunol**, v.13, p.251-276, 1995.

122.Chizzonite, R.; Truitt, T.; Desai, B.B. et al. IL-12 receptor : I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts. **J Immunol**, v.148, p-3117-3124, 1992.

123.Desai, B.B.; Quinn, P.M.; Woitzky, A .G. et al. IL-12 receptor: II. Distribution and regulation of receptor expression. **J Immunol**, v.148, p-3125-3132, 1992.

124.Jelinek, D.F.; Braaten, J.K. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. **J Immunol**, v.154, p.1606-1613, 1995.

125.Mehrotra, P.T.; Wu, D.; Crim, J.A . et al. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. **J Immunol** , v.151, p.2444-2452, 1993.

126.Dinareello, C.A . Interleukin-18. **Methods**, v.19, p.121-132, 1999.

127.Grobmyer, S.R.; Lin, E.; Lowry, S.F. et al. Elevation of IL-18 in human sepsis. **J Clin Immunol**, v.20, p.212-215, 2000.

128.Wei, X.Q.; Leung, B.P.; Niedbala, W. et al. Altered immune responses and susceptibility to Leishmania major and infection in IL-18-deficient mice. **J Immunol**, v.163, p. 2821-2828, 1999.

129.Malefyt, R.D.; Figdor, C.G.; Huijbens, R. et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production and cytotoxic function of human monocytes : comparsion with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10. **J Immunol**, v.151, p.6370-6381,1993.

130.Nassar, G.M.; Morrow, J.D.; Roberts, L.J. et al. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. **J Biol Chem.** v.269, p.27631-27634, 1994.

131.Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, v. 18, p.263-266, 1997.

132.Zurawski, G. ; de Vries, J.D. Interleukin-13, an interleukin-4-like cytokine that acts in monocytes and B cells, but not on T cells. **Immunol Today**, v.15, p.19-26, 1994.

- 133.Obiri, N.I.; Debinski, W.; Leonard, W.J. et al. Receptor for interleukin 13 interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common γ chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9 and 15. **J Biol Chem.** v.270, p.8797-8804, 1995.
- 134.Consentino. G.; Soprana, E. Thienes, C.P. et al. IL-13 down-regulates CD14 expression and TNF- α secretion in normal human monocytes. **J Immunol**, v.155, p.33145-3151, 1995.
- 135.Zurawsky, S.M. ; Chomarat, P.; Djossou, O. et al. The primary binding subunit of the human interelukin-4 receptor is also component of the interleukin-13 receptor. **J Biol Chem**, v.270, p. 13869-13878, 1995.
- 136.Vita, N.; Lefort, S.; Laurent, P. et al. Characterization and comparsion of the interleukin-13 receptor with the interleukin-4 receptor on several cell types. **J Biol Chem**, v.270, p.3512-3517, 1995.
- 137.Tan, J.C.; Indelicato, S.R.; Narula, S.K. et al. Characterization of interleukin-10 receptors in human and mouse cells. **J Biol Chem.** V.268, p.21053-21059, 1993.
- 138.Liu, Y.; Wei, S.H.Y.; Ho, A. et al. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. **J Immunol.** V.152, p.1821-1829, 1994.
- 139.Marchant, A .; Deviere, J.; Byl, B. et al. Interleukin-10 production during septicemia. **Lancet**, v.343, p.707-708, 1994.
- 140.Ding, L.; Sevach, E.M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J Immunol.** v.148, p.3133-3139, 1992.
- 141.Cassatella, M.A.; Meda, L.; Gasperini, S. et al. Interelukin-10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degadation. **J Exp Med**, v.179, p.1695-1699, 1994.
- 142.Sallerfors, B. Endogenous production and peripheral blood leves of granulocyte-macrophage (GM-) and Granulocyte (G-) colony-stimulating factors. **Leukem Lymphoma**, v.13, p.235-247, 1993.
- 143.Dale, D.C.; Liles, W.C.; Summer, R.W. et al. Granulocyte colony-stimulating factor – role and relationships in infectious disease. **J Inf Dis**, v.172, p.1061-1075, 1995.
- 144.Carson, W.E.; Giri, J.L.; Lindermann, M.J. et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of th IL-2 receptor. **J Exp Med**, v.180, p.1395-1403, 1994.

- 145.Giri, J.G.; Anderson, D.M.; Kumari, S. et al. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. **J Leukocyte Biol.** V.57, p.763-766, 1995.
- 146.Lewis, R.A .; Austen, K.F.; Soberman, R.J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation on pathobiology in human disease. **N Engl J Med**, v.323, p.645-655, 1990.
- 147.Rowley, A.F.; Lloyd-Evans, P.; Barrow, S.E. et al. Lipotoxin biosynthesis by trout macrophages involves the formation of epoxide intermediates. **Biochemistry.** V.33, p. 856-863, 1994.
- 148.Roper, R.; Brown, D.; Phipps, R. Prostaglandin E₂ promotes B lymphocyte Ig isotype switching to IgE. **J Immunol**, v.154, p.162-170, 1995.
- 149.Fletcher, J. Eicosanoids : critical agents in the physiological process and cellular injury.**Arch Surg**, v.128, p.1192-1196, 1993.
- 150.Rankin, J.A .; Sylvester, L.; Smith, S. et al. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B₄ in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J Clin Invest**, v.86, p.1556-1564, 1990.
- 151.Feinmark, S.J. The role of endothelial cell in leukotriene biosynthesis. **Am Rev Respir Dis**, v.146, p.S51-S55, 1992.
- 152.Thompson, W.A .; Coyle, S.; van Zee, K. et al. The metabolic effects of platelet-activating factor antagonism in endotoxemic man. **Arch Surg**, v.129, p.72-79, 1994.
- 153.Williams, T.J.; Hellewell, P.G. Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response. **Am Rev Respir Dis**, v.146, p.545-550, 1992.
- 154.Butcher, E. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v.67, p.1033-1036, 1991.
- 155.Parent, C.; Eichacker, P.Q. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. **Infect Dis Clin North Am**, v.13, p.427-447, 1999.
- 156.Granger, D.N.; Kubes, P. The microcirculation and inflammatory modulation of leukocyte-endothelial cell adherence. **J Leukocyte Biol**, v.55, p.537-544, 1994.
- 157.Pober, J.S.; Cotran, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, v.50, p.537-544, 1990.
- 158.Li, R.; Xie, J.; Kantor, C. et al. A peptide derived from the intercellular adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11B/CD18 and CD11C/CD18. **J Cell Biol**, v.129, p.1143-1153, 1995.

- 159.Stacker, A .S.; Springer, T.A . Leukocyte integrin p150,95 (CD11C/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptoron stimulated endothelium. **J Immunol**, v.146, p.648-655, 1991.
- 160.Berlin, C.; Bargatze, R.F.; Campbell, J.J. et al. α 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. **Cell**, v.80, p.413-422, 1995.
- 161.Fan, S.T.; Edgington, T.S. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions : CD11B/CD18 enhancement of TNF- α responses in monocytes. **J Immunol**, v.150, p.2972-2980, 1993.
- 162.Crockett-Torabi, E.; Sulenbarger, B.; Smith, C.W. et al. Activation of human neutrophils though L-selectin na Mac-1 molecules. **J Immunol**, v.154, p.2291-2302, 1995.
- 163.von Andrian, U.H.; Chambers, J.D.; Berg, E.L. et al. L-selectin mediates neutrophil roling in inflamed venules through sialyl Lewis-dependent and – independent recognition pathways. **Blood**, v.82, p.182-191, 1993.
- 164.Tedder, T.F.; Steeber, D.A .; Chen, A . et al. The selectins : vascular adhesion molecules. **FASEB J**, v.9, p.866-873, 1995.
- 165.Luscinskas, F.W.; Ding, H.; Lichtman, A .H. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor α - activated vascular endothelium under flow. **J Exp Med**, v.181, p.1179-1186, 1995.
- 166.Donnelly, S.C.; Haslett, C.; Dransfield, I. et al. Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome . **Lancet**, v.344, p.215-219, 1994.
- 167.Waddell, T.K.; Fialkow, L.; Chan, C.K. et al. Signaling functions of L-selectin. **J Biol Chem**, v.270, p.15403-15411, 1995.
- 168.Constant, S.L.; Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The Alternative Approaches **Ann Rev Immunol**, v.15, p.297-322, 1997.
- 169.Daugelat, S.; Kauffman, S.H.E. Role of Th1 and Th2 cells in bacterial infections.**Chem immunol**, v.63, p.66-97, 1996.
- 170.Ayala, A .; Deol, Z.K.; Lehman, D.L. et al. Polymicrobial sepsis but not low-dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2 / IFN- γ release while increasing IL-4 / IL-10 production. **J Surg Research**, v.56, p.579-585, 1994.

171.Ferguson, N.R.; Webster, N.R. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. **Intensive Care Med**, v.25, p.106-109, 1999.

172.Rincon, M.; Anguita, J.; Nakamura, T. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. **J Exp Med**, v.185, p.461-469, 1997.

173.Gómez-Jiménez, J.; Martín, M.C.; Sauri, R. et al. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. **J Inf Dis**. v.171, p.472-475, 1995.

174.Sutterwala, F.S.; Noel, G.J.; Salgame, P. et al. Reversal of proinflammatory response by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. **J Exp Med**. v.188, p.217-222, 1998.

175.Hensler, T.; Heidecke, C.D.; Hecker, H. et al. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. **J Immunol**, v.161, p.2655-2659, 1998.

176.Zantl, N.; Uebe, A.; Neumann, B. et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendants stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. **Infect Immunity**. v.66, p.2300-2309, 1998.

177.van der Poll, T.; Marchant, A.; Buurman, W.A. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol**, v.155, p.5397-5401, 1995.

178.Papadea, C.; Check, I.J. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses : biochemical, genetic and clinical aspects. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v.27, p.27-58, 1989.

179.Dwyer, J.M. Manipulating the immune system with immune globulin. **N Engl J Med**, v.326, p.107-116, 1992.

180.Jefferis, R.; Kumaratne, D.S. Selective IgG subclass deficiency : quantification and clinical relevance. **Clin Exp Immunol**. v.81, p.357-367, 1990.

181.Griffin, F.M.; Griffin, J.A.; Leider, J.C. et al. Studies on the mechanisms of phagocytosis. **J Exp Med**. v.142, p.1263-, 1975.

182.Leijh, P.C.J.; Barsellar, M.T.; Daha, M.R. et al. Participation of immunoglobulins and complement components in the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. **Infect Immun**. v. 155, p.377-389, 1987.

183.Stossel, S.P. Phagocytosis. **N Engl J Med**. v.290, p.717-, 1974.

- 184.Conley, M.E.; Delacroix, D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A : two separate but related systems of immune defense ?. **Ann Int Med** , v.106, p.892-899, 1987.
- 185.Underdown, R.C.; Schiff, J.M. Immunoglobulin A : strategic defense initiative at the mucosal surface. **Annu Rev Immunol.** v.4, p.389-417, 1986.
- 186.Mazanec, M.B.; Nedrub, J.G.; Kaetzel, C.S. et al. A three-tieres view of the role of IgA in mucosal defense. **Immunol Today.** v.14, p.430-435, 1993.
- 187.Ogra, P.L.; Karson, D.T. The role of immunoglobulins in the mechanism of mucosal immunity to virus infections. **Pediatr Clin North Am.** v.17, p-385-400, 1970.
- 188.Honorio-França, A .C. **Atividade microbida dos fagócitos do colostro humano para *Escherichia coli* enteropatogênia (EPEC). mecanismo de ativação celular pela IgA do próprio colostro.**Tese de doutorado apresentada no ICB-USP- 1998.
- 189.Lindh, E. Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. **J Immunol.** v.114, p.284-, 1975.
- 190.Honório-França, A .C.; Carvalho, M.P.S.M.; Isaac, L. et al. Colostral Mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. **Scand J Immunol.** v.46, p.59-66, 1997.
- 191.Stockert, R.J.; Kressner, M.S.; Collins, J.C.; Sternlieb, I.; Morell, A.G. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.79, p.6229-6231, 1982.
- 192.Tomana, M.; Kulhavy, R.; Mestecky, J. Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. **Gastroenterology**, v.94, p.762-770, 1985.
- 193.Monteiro, R.C.; Kubagawa, H.; Cooper, M.D. Cellular distribution, regulation and biochemical nature of an Fc α receptor in human. **J Exp Med.** v.171, p.597-613, 1990.
- 194.Montenegro, V.; Monteiro, R.C. Elevation of serum IgA in spondyloarthropathies and IgA nephropathy and its pathogenic role. A review. **Curr Opin Rheumatol.** v.11, p.265-272, 1999.
- 195.Ravetch, J.V.; Kinet, J.P. Fc receptors. **Annu Rev Immunol**, v.9, p.457-492, 1991.
- 196.Ravetch, J.V.; Clynes, R.A. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. **Annu Rev Immunol**, v.16, p.421-432, 1998.

197. Daerön, M. Fc receptor biology. **Annu Rev Immunol.** v.15, p.203-234, 1997.
198. Launay, P.; Patry, C.; Lehen, A. et al. Alternative endocytic pathway for IgA Fc receptors (CD89) depends on the lack of FcR γ association and protects against degradation of bound ligand. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.7216-7225, 1999.
199. Willis, H.E.; Browder, B.; Feister, A. J. et al. Monoclonal antibody to human IgG Fc receptor. Cross-linking of receptors induces lysosomal enzyme release and superoxide generation by neutrophils. **J Immunol.** v.140, p.234-, 1988.
200. Kimberley, R.P.; Salmon, J.E.; Edberg, J.C. Receptors for immunoglobulin G. Molecular Diversity and implications for disease. **Arthritis Rheum.** v.38, p.306-314, 1994.
201. Anderson, C.L.; Shen, L.; Eicher, D.M. et al. Phagocytosis mediated by three distinct Fc γ receptor classes on human leukocytes. **J Exp Med.** v.171, p.1333-1345, 1990.
202. Salmon, J.E.; Brogle, N.L.; Edberg, J.C. et al. Fc γ receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc γ Receptor II. **J Immunol.** v.146, p.997-1004, 1991.
203. Morton, H.C.; van Egmond, M.; van de Winkel, J.G.J. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc α R). **Crit Rev Immunol.** v.16, p.423-440, 1996.
204. Maliszewski, C.R.; March, C.J.; Schoenborn, M.A. et al. Expression cloning of a human Fc receptor for IgA. **J Exp Med.** v.172, p.1665-1672, 1990.
205. Monteiro, R.C.; Hostoffer, R.W.; Cooper, M.D. et al. Definition of immunoglobulin-A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. **J Clin Invest.** v.92, p.1681-1685, 1993.
206. Patry, C.; Sibille, Y.; Lehen, A. et al. Identification of Fc α R isoforms generated by alternative splicing that are differentially expressed between blood monocyte and alveolar macrophage. **J Immunol.** v.156, p.4442-4448, 1996.
207. Monteiro, R.C.; Cooper, M.D.; Kubagawa, H. Molecular heterogeneity of Fc α receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. **J Immunol.**, v.148, p.1764-1770, 1992.
208. Montenegro Torres, V.M. **Expressão alterada do receptor Fc para IgA em fagócitos do sangue periférico de pacientes com Espondilite Anquilosante.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

- 209.Grossetête, B.; Launay, P.; Lehuen, A . et al.. Down-regulation of Fc α receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. **Kidney Int.**, v.53, p.1321-1335, 1998.
- 210.Weisbart, R.H.; Kacena, A .; Schuh, A . et al. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA receptor activation mechanism. **Nature**. v.332, p.647-648, 1988.
- 211.Hostoffer, R.W.; Krukovets, I.; Berger, M. Enhancement by Tumor necrosis factor- α of Fc α receptor expression and IgA-mediated superoxide generation and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by polymorphonuclear leukocytes. **J Inf Dis**. v.170, p.82-87, 1994.
- 212.Reterink, T.J.; Levarht, E.W.; Klar-Mohamad, N. et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β) down-regulates IgA Fc-receptor (CD89) expression on human monocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, v.103, p.161-6, 1996.
- 213.Wines, B.D.; Hulett, M.D.; Jamieson, G.P. et al. Identification of residues in the first domain of human Fc α receptor essential for interaction with IgA. **J Immunol**. v.162, p.2146-2153, 1999.
- 214.Ernst, L.K.; Duchemin, A .M.; Anderson, C,L. Association of high-affinity receptor for IgG (Fc γ RI) with the γ subunit of the IgE receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.90, p.6023-6027, 1993.
- 215.Wirthmueller, U.; Kurosaki, T.; Murakami, M.S. et al. Signal transduction by Fc γ RIII (CD16) is mediated through the γ chain. **J Exp Med**. v.175, p.1381-1390 1992.
- 216.Pfefferkorn, L.C.; Yeaman, G.R. Association of IgA-Fc receptor (Fc α R) with Fc ϵ I γ 2 subunits in U937 cells. **J Immunol**. v.153, p.3228-3236, 1994.
- 217.Launay, P.; Lehuen, A .; Kawakami, T. et al. IgA Fc receptors (CD89) activation enables coupling to Syk and Btk tyrosine kinase pathways : differential signaling after interferon- γ or phorbol ester stimulation. **J Leukoc Biol**. v.63, p.636-1998.
- 218.van Egmond, M.; van Vuuren, H.; Morton, H.C. et al. Human immunoglobulin A receptor (Fc α I, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3 (CD11b/CD18). **Blood**, v.93, p.4387-4394, 1999.
- 219.Morton, H.C.; van den Herik-Oudjk, I.E.; Vossebeld, P. et al. Functional association between human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. **J Biol Chem**. v.274, p.7216-, 1999.

- 220.Takai, T.; Li, M.; Sylvestre, D. et al. FcR γ chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. **Cell**, v.76, p.519-529, 1994.
- 221.Patry, C.; Herbelin, A.; Lehen, A. et al. Fc α receptors mediate release of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 by human monocytes following receptor aggregation. **Immunology**, v.86, p.1-5, 1995.
- 222.Shen, L. A monoclonal antibody specific for immunoglobulin A receptor triggers polymorphonuclear neutrophil superoxide release. **J Leukoc Biol.** v.51, p.373-378, 1992.
- 223.Yeaman, G.R.; Kerr, M.A. Opsonization of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. **Clin Exp Immunol**, v.68, p.200-208, 1987.
- 224.Fingerle, G.; Pforte, A.; Passlick, B. et al. The novel Subset of CD 14+ / CD 16+ Blood Monocytes Is Expanded in Sepsis Patients. **Blood.** v.82, p. 3170-3176, 1993.
- 225.Carr, R.; Davies, J.M. Abnormal FcRIII Expression by Neutrophils from very preterm neonates. **Blood.** v.76, p.607-611, 1990.
- 226.Leino, L.; Sorvajarvi, K.; Katajisto, J. et al. Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo. **Clin Exp Immunol.** v.107, p.37-43, 1997.
- 227.Herra, C.M.; Keane, C.T.; Whelan, A. Increased expression of Fc γ receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. **J Med Microb.** v.44, p.135-140, 1996.
- 228.van de Winkel, J.G.J.; Capel, P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity : molecular aspects and clinical implications. **Immunol Today**, v.14, p.215-221, 1993.
- 229.Sanders, L.A.M.; Feldman, R.G.; Voorhorst-Ogink, M.M. et al. Human Immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. **Infect Immun.** v.63, p.73-81, 1995.
- 230.Salmon, J.E.; Edberg, J.C.; Brogle, N.L. et al. Allelic polymorphisms of human Fc γ receptor IIA and Fc γ receptor IIIB. **J Clin Invest.** v.89, p.1274-1281, 1992.
- 231.Frank, M.M.; Hamburger, M.I.; Lawley, T.J. et al. Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in lupus erythematosus. **N Engl J Med.** v.300, p. 518-523, 1979.

232.Parris, T.M.; Kimberley, R.P.; Inmad, R.D. et al. Defective Fc receptor mediated mononuclear phagocyte function in lupus nephritis. **Ann Intern Med.** v.97, p.526-532, 1982.

233.Simms, H.H.; D'Amico, R.; Monfils, P. et al. Altered polymorphonuclear leukocyte FcγR expression contributes to decreased candidal activity during intraabdominal sepsis. **J Lab Clin Med.** v.117, p.241-249, 1991.

234.Simms, H.H.; D'Amico, R.; Buchard, K.W. Intraabdominal sepsis : effects on polymorphonuclear leukocyte Fc receptor-mediated phagocytosis. **J Surg Res.** v.49, p.49-54, 1990.

235.Naziri, W.; Cheadle, W.G.; Pietsch, J.D. et al. Pneumonia in the surgical intensive care unit : Immunologic keys to the silent epidemic. **Ann Surg.** v.219, p.632-640, 1994.

236.Schinkel, C.; Sendtner, R.; Zimmer, S. et al. Evaluation of Fc-receptor positive (Fc+) and negative (Fc-) monocyte subsets in sepsis. **Shock.** v.11, p.229-234, 1999.

237.Shen, L.; Collins, J.E.; Schoenborn, M.A . et al. Lipopolysaccharide and cytokine augmentation of human monocyte IgA receptor expression and function. **J Immunol.** v.152, p.4080-4086, 1994.

238.Hostoffer, R.W.; Krukovets, I.; Berger, M. Increased FcαR expression and IgA-mediated function on neutrophil induced by chemoattractants. **J Immunol.** v.150, p.4352-4540, 1993.

239.Nikolova, E.B.; Russel, M.W. Dual function of human IgA antibodies : inhibition of phagocytosis in circulating neutrophils and enhancement of responses in IL-8-stimulated cells. **J Leukoc Biol.** v.57, p.875-882, 1995.

240.van Egmond, M.; van Garderen, E.; van Spriel, A .B. et al. FcαRI-positive liver kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. **Nat Med,** v.6, p.680-685, 2000.

241.van der Pol, W.; Vidarsson, G.; Vile, H.A . et al. Pneumococcal Capsular Polysaccharide-Specific IgA Triggers Efficient Neutrophil Effector Functions via FcαRI (CD89). **J Infect Dis.** v.182, p.1139-1145, 2000.

242.Silvain, C.; Patry, C.; Launay, P. et al. Altered expression of monocyte IgA Fc Receptor is associated with defective endocytosis in patients with alcoholic cirrhosis. **J Immunol.** v.155, p.1606-1618, 1995.

243.Grossetête, B.; Viard, J.P.; Lehuen, A . et al. Impaired Fc alpha receptor expression is linked to increased immunoglobulin A levels and disease progression in HIV-1 infected patients. **AIDS.** v.9, p.229-234, 1995.

- 244.Montenegro, V.; Chiamolera, M.; Launay, P. et al. Impaired expression of IgA Fc receptors (CD89) by blood phagocytic cells in AS. **J. Rheumatol.**, v.27, p.411-417, 2000.
- 245.Monteiro, R.C.; Grossetête, B.; Nguyen. A .T. et al. Dysfunctions of Fc α receptors by blood phagocytic cells in IgA nephropathy. **Contrib Nephrol.**, v.111, p.116-122, 1995.
- 246.Knaus, W.A.; Draper, E.A.; Wagner, D.P. et al. APACHE II: A severity of disease classification system. **Crit Care Med** v.13, p.818-829, 1985.
- 247.Johnstone, A .; Thorpe, R. **Immunochemistry in practice**. Blackwell, U.K, 3rd ed. 1996.
- 248.Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Bio Chem.**, v.193, p.265-, 1951.
- 249.Goding, J.W. Structural studies of murine lymphocyte surface IgD. **J Immunol.**, v.124, p.2082-2088, 1980.
- 250.Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p. 680-685, 1970.
- 251.Launay, P.; Grossetete, B.; Arcos-Fajardo, M. et al. Fc alpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-Iga complexes in patients and CD89 transgenic mice. **J Exp Med** , v. 191, p.1999-2009, 2000.
- 252.Honorio-França, A . C., Launay, P., Carneiro-Sampaio, M.M.S., Monteiro, R.C. Colostral neutrophils express Fc α receptors (CD89) lacking γ chain association and mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. **J. Leukocyte Biol.** , (in press), 2000.

Dados dos pacientes : gram-positivos

idade(anos)	sexo	diagnóstico de admissão UTI	infecções diagnosticadas	doenças associadas	germe	condição de alta da UTI	CD89 em neutrófilos	CD89 em monócitos	IgA sérica
27	fem.	endocardite		Puerpério	<i>S.aureus</i>	melhorado	28	44	211
70	masc.	aneurisma aorta abdominal	bacteremia	doença coronariana	<i>S.aureus</i>	óbito	56	61	227
43	masc.	peritonite		IRC	<i>Clostridium difficile</i>	óbito	30	63	377
19	masc.	BCP		doença Wilson	<i>S.aureus</i>	óbito	48	53	388
46	masc.	polirradiculoneu rite	BCP, ITU		<i>Staphylococcus sp.</i>	melhorado	22	30	609
32	masc.	infecção de cateter	endocardite, BCP, ITU	DM, IRC	<i>S.aureus</i>	óbito	28	51	411
52	fem.	TEP	bacteremia	AVC, IRC	<i>S.aureus</i>	melhorado	37	50	421
17	masc.	sepsis			<i>S.aureus</i>	melhorado	72	98	326
40	masc.	traumatismo craniano	BCP, ITU	alcoolismo	<i>Staphylococcus sp.</i>	melhorado	27	22	357
66	fem.	BCP			<i>Staphylococcus sp.</i>	óbito	52	29	487
75	masc.	BCP		DPOC, ICC	<i>S.aureus</i>	óbito	24	55	469
55	fem.	hemorragia manígea	BCP, ITU		<i>Staphylococcus sp.</i>	melhorado	39	60	242
24	fem.	bacteremia		Síndr. Cushing	<i>S.aureus</i>	óbito	40	35	152
42	masc.	linfoma cerebral	BCP, ITU		<i>S.aureus</i>	óbito	56	25	Não disponível
57	masc.	empiema pleural	bacteremia	DM	<i>Streptococcus faecalis</i>	óbito	57	50	455
30	fem.	hemorragia manígea	BCP, ITU		<i>Staphylococcus sp.</i>	melhorado	44	57	244
45	masc.	BCP		asma	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	óbito	49	44	445
23	fem.	insuficiência renal aguda	BCP, bacteremia	Síndrome de Sneddon	<i>Staphylococcus sp.</i>	óbito	40	48	Não disponível
42,4 (média) 17,6 (DP)	f = 7 m = 11					m=7 o=11	42 (média) 13,7 (DP)	49 (média) 17,6 (DP)	363,81 (média) 118,61 (DP)

Abreviaturas : AVC – acidente vascular cerebral, BCP – broncopneumonia, DM – diabetes melito, DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica, ICC – insuficiência cardíaca congestiva, IRC – insuficiência renal crônica, ITU – infecção urinária, TEP – tromboembolismo pulmonar.

Dados dos pacientes : gram-negativos

idade (anos)	sexo	diagnóstico de admissão UTI	infecções diagnosticadas	doenças associadas	germe	condição de alta da UTI	CD89 em neutrófilos	CD89 em monócitos	IgA sérica
77	fem.	BCP	abcesso, peritonite, ITU	DPOC	<i>Acinetobacter</i> sp.	melhorado	34	40	363
12	masc.	piomiosite	endocardite, BCP, colite		<i>Pseudomonas</i> sp.	melhorado	62	83	276
46	masc.	polirradiculoneu rite	BCP, ITU		<i>Enterobacter</i> sp.	melhorado	36	67	236
37	fem.	bacteremia		LES	<i>Acinetobacter</i> sp.	melhorado	31	45	231
23	masc.	TVP	BCP, abcesso	LES	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	óbito	40	56	271
60	masc.	AVC	BCP		<i>Acinetobacter</i> sp.	óbito	40	44	412
31	masc.	Politraumatismo	BCP, ITU		<i>Acinetobacter</i> sp.	melhorado	78	78	477
58	masc.	celulite		obesidade morb	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	óbito	94	87	377
85	fem.	BCP	BCP	Pênfigo	<i>Acinetobacter</i> sp.	óbito	41	81	344
64	masc.	tumor cerebral	BCP	Etilismo	<i>Enterobacter</i> sp.	óbito	38	61	302
49	masc.	AVC	BCP	HAS	<i>Acinetobacter</i> sp.	melhorado	51	81	Não disponível
86	fem.	BCP			<i>Pseudomonas</i> sp.	óbito	41	76	245
74	fem.	AVC	BCP, ITU, GECA	fibrilação atrial	<i>Acinetobacter</i> sp.	melhorado	57	58	237
88	masc.	BCP		HAS	<i>Providencia</i> sp.	melhorado	45	49	336
67	masc.	ITU	BCP	DPOC	<i>Enterobacter</i> sp.	melhorado	74	61	194
71	masc.	IAM	bacteremia		<i>Escherichia coli</i>	melhorado	89	63	Não disponível
58 (média)	f = 5					m=10	53 (média)	64 (média)	307,21 (média)
23,1 (DP)	m = 11					o=6	20,3 (DP)	15,2 (DP)	77,81 (DP)

Abreviaturas: AVC – acidente vascular cerebral, BCP – broncopneumonia, DM – diabetes melito, DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica, GECA – gastroenterocolite, HAS – hipertensão arterial sistêmica, IAM – infarto agudo do miocárdio, ICC – insuficiência cardíaca congestiva, IRC – insuficiência renal crônica, ITU – infecção urinária, LES – Lupus Eritematoso sistêmico, TVP – trombose venosa profunda.