UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Lipoproteína da alta densidade (HDL) como transportadora da proteína
amilóide sérica A (SAA) para sítios inflamatórios: lípidos,
apolipoproteínas e citocinas inflamatórias em exsudato pleural

Cristiani Bürger

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ana Campa

São Paulo
2004

Cristiani Bürger

Lipoproteína da alta densidade (HDL) como transportadora da proteína
amilóide sérica A (SAA) para sítios inflamatórios: lípidos,
apolipoproteínas e citocinas inflamatórias em exsudato pleural

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Ana Campa
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 31 de janeiro de 2005.

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010528

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bürger, Cristiani
B954L Lipoproteína da alta densidade (HDL) como transportadora
da proteína amiloide sérica A (SAA) para sítios inflamatórios :
lípidos, apolipoproteínas e citocinas inflamatórias em exsudato
pleural / Cristiani Bürger. -- São Paulo, 2004.
1v.(Paginação irregular)

Tese (doutorado) -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

I. Bioquímica clínica 2. Lipoproteína : Metabolismo
I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana Campa, por sua confiança, paciência e disponibilidade de tempo.

A Univali que me deu condições para elaborar esse trabalho de doutorado.

Aos professores Luis Henrique Catalani e Paulo Andrade Lotufo pela sua contribuição na avaliação desse trabalho.

Aos meus pais Luiz Vicente e Hieronides, irmãos Fabrício e Daniel e tia Lourdes, que mesmo estando longe sempre me incentivaram e apoiaram.

Aos colegas de laboratório, Rita, Sueli, Elaine, Alziana, Alessandra, Sabrina, Flavia Mamy, Silvana, Valdecir, Daniela e Flávia que com o passar tempo tornaram-se mais do que colegas e sempre estavam prontos a ajudar.

Aos colegas e amigos da Univali que sempre estiveram do meu lado me apoiando e ajudando sempre que precisei, Clóvis, Roberto, Ana Elisa, Fátima, Enói, Niero, Márcia, Dalton, Angela, Christiane meu muito obrigado.

Aos amigos Ana Maria, Rô, Cris, Adriana, Manuela, Valéria, Eliana e Kátia, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos.

Aos colegas dos laboratórios de microbiologia, imunologia e química, meu agradecimento pela ajuda.

Ao pessoal da Clínica Médica e do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP que sempre esteve disposto em colaborar com a coleta das amostras usadas neste trabalho.

A todos os pacientes que participaram desse estudo, pela sua valiosa colaboração.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela inestimável ajuda e amizade.

A todos que não foram citados nominalmente, mas que de uma maneira ou outra contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO	4
1. LISTA DE ABREVIATURAS	6
2. RESUMO	9
3. ABSTRACT	10
4. INTRODUÇÃO	11
5. REVISÃO DE LITERATURA	12
5.1 Processo inflamatório – alguns aspectos bioquímicos	12
5.2 Lipoproteínas.....	13
5.2.1 HDL	15
5.3 Amilóide Sérica A.....	16
5.4 Efusão Pleural.....	19
5.5 Citocinas em exsudatos.....	21
5.6 Exsudatos como fonte de peroxidase para a oxidação de proteínas.....	22
6. OBJETIVOS.....	27
7. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
7.1 Materiais.....	29
7.1.1 Reagentes	29
7.1.2 Equipamentos	30
7.2 Casuística.....	31
7.3 Amostras de líquido e soro	31
7.4 Armazenamento das amostras	32
7.5 Dosagens laboratoriais.....	32
7.5.1 Proteína C Reativa (PCR).....	32
7.5.2 Amilóide Sérica A (SAA)	32
7.5.3 Colesterol total.....	33
7.5.3.1 Colesterol HDL.....	33
7.5.4 Triglicérides	33

7.5.5 Proteínas totais.....	34
7.5.6 Apo A-I, Apo A-II e Apo B.....	34
7.5.7 Lactato Desidrogenase (LDH).....	34
7.5.8 Análise citológica dos líquidos.....	35
7.5.9 Dosagem Citocinas:	35
7.5.9.1 TNF- α	35
7.5.9.2 IL-8.....	37
7.5.9.3 IL-1 β	38
7.6 Análise da SAA por HPLC.....	38
7.6.1 Procedimento de extração das proteínas do soro	39
7.6.2 Procedimento de filtração da fase aquosa.....	39
7.6.3 Detecção da SAA por HPLC	39
7.6.4 Análise da SAA por espectrometria de massa	39
7.7 Determinação de proteínas pelo método de Lowry nas amostras encaminhadas para a análise eletroforética ou para HPLC.....	40
7.8 Eletroforese da SAA	40
7.8.1 <i>Immunoblotting</i>	42
7.9 Isolamento de neutrófilos	45
7.9.1 Cultura de neutrófilos.....	46
7.10 Isolamento da HDL.....	46
7.10.1 Determinação da oxidação de apolipoproteínas pelo sistema HRP/H ₂ O ₂ por eletroforese	47
7.10.2 Determinação da oxidação de apolipoproteínas pelo sistema HRP/H ₂ O ₂ por fluorimetria.....	48
7.11 Preparo das amostras de soro e exsudato pleural para avaliação de fluorimetria.....	48
7.12 Análise estatística.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
8.1 Análise e presença de SAA em líquidos biológicos.....	50
8.2 Apolipoproteínas e marcadores inflamatórios: correlações entre soro e exsudato pleural.....	55
8.2.1. Proteínas de fase aguda nos exsudatos pleurais: SAA e PCR.....	57
8.2.2. HDL como transportador da SAA para o sítio inflamatório	61
8.3 Oxidação da HDL e de suas apolipoproteínas AI e SAA por peroxidases/H₂O₂	74
8.3.1 Atividade biológica de SAA oxidada <i>in vitro</i>	78
9. CONCLUSÕES	82
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
11. ANEXOS	92

1. Lista de abreviaturas

Apo: apolipoproteína

Apo A-I: apolipoproteína A-I

Apo A-II: apolipoproteína A-II

Apo A-IV: apolipoproteína A-IV

Apo C: apolipoproteína C

Apo D: apolipoproteína D

Apo E: apolipoproteína E

Apo SAA: apolipoproteína amilóide sérica A

BHT: butiril-hidróxi-tolueno

CT: colesterol total

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

EDTA: ácido etileno diaminotetraacético

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EROs: espécies reativas do oxigênio

ESPAS: sódio-2-hidróxi-3,5-diclorobenzenossulfona

fMLP: formil-metionil-leucil-phenilalanina

HDL: lipoproteína de alta densidade

HDL-FA: lipoproteína de alta densidade de fase aguda

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HRP: peroxidase de raiz forte

IDL: lipoproteína de densidade intermediária

IDO: indolamina 2,3-dioxigenase

IRF: intensidade relativa de fluorescência

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-2: interleucina 2

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

LCAT: lecitina colesterol acil transferase
LDH: lactato desidrogenase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LPS: lipopolissacarídeo
MPO: mieloperoxidase
MPO³⁺: forma nativa férrica da mieloperoxidase
NaCl: cloreto de sódio
NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
NFK: *N*-formilquinurenina
NO: óxido nítrico
O₂^{•-}: ânion superóxido
PAF: fator ativador de plaquetas
PBMC: células mononucleares periféricas sangüíneas
PBS: tampão fosfato salina
PCR: Proteína C Reativa
PMA: acetato de forbol miristato
PMN: polimorfonuclear (s)
PMSF: fluoreto de fenilmetilssulfonila
PT: proteína total
PVDF: fluoreto de polivinilideno
mRNA: ácido ribonucléico (RNA) mensageiro
rSAA: amilóide sérica A recombinante
SAA: amilóide sérica A
SAA-FA: amilóide sérica A de fase aguda
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
sL-selectinas: selectinas solúveis de leucócitos
TFA: ácido trifluoracético
TG: triglicérides
THP1: linfócitos T auxiliares tipo 1

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TNFR I: receptores solúveis de fator de necrose tumoral tipo I

TNFR II: receptores solúveis de fator de necrose tumoral tipo II

Trp: triptofano

TMB: tetrametilbenzidina

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

2. RESUMO

Resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo mostraram que a proteína de fase aguda amilóide sérica A (SAA) é um potente estímulo para a expressão de mRNA e liberação de TNF- α , IL-1- β e IL-8 em leucócitos humanos, além de atuar como *priming* para a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos. Nosso objetivo, nesse trabalho, foi mostrar a presença de SAA em exsudatos e definir sua origem, além de verificar sua atividade pró-inflamatória *in vivo*. Para tanto, utilizamos soro e exsudatos pleurais de 32 pacientes com pneumonia. Mostramos primeiramente a presença da SAA no material inflamatório através de SDS-PAGE, *immunoblotting* e HPLC. A quantificação de SAA nas amostras foi realizada por ELISA. Nestas amostras também foram determinadas as concentrações de proteína total, proteína C reativa (PCR), apo A-I, apo A-II, apo B, colesterol total, triglicérides, TNF- α , IL-1- β e IL-8. A análise integrada dos nossos resultados indica que há uma passagem preferencial da HDL para o foco inflamatório, quando comparada as demais lipoproteínas. A SAA presente em exsudatos é originada do soro e deve sofrer intensa degradação ou associação com células. O efeito da SAA no exsudato é pró-inflamatório, sendo que esta proteína poderia ser um dos alvos para as enzimas proteolíticas e EROs presentes em exsudatos. Acreditamos que este trabalho contribua significativamente para a compreensão do, ainda incerto, papel da SAA no processo inflamatório e dá nova abrangência para as funções da HDL e sua participação na resposta imune.

3. ABSTRACT

Previous results from our lab showed that the acute phase protein serum amyloid A (SAA) is a potent stimulus for the expression of mRNA and secretion of TNF- α , IL-1- β and IL-8 from human leukocytes. Furthermore SAA primes neutrophils for the generation of reactive oxygen species (ROS). Our goal here was to show the presence of SAA in exudates and define its origin, besides the verification of its proinflammatory activity in vivo. To achieve this goal we used serum and pleural exudates from 32 patients with pneumonia. At first, we showed the presence of SAA in the exudate through SDS-PAGE, *immunoblotting* and HPLC. SAA was quantified by ELISA. Besides SAA, we also determined the concentrations of total protein, C reactive protein, apo A-I, apo A-II, apo B, cholesterol, triglyceride, TNF- α , IL-1- β e IL-8. The integrate analysis of our results indicates that there is a preferential leakage of HDL to the inflammatory focus when compared to other lipoproteins. SAA present in exudates is originated from serum and may be intensively degraded or associated to cells. The effect of SAA in the exudate is proinflammatory and this protein may be a target for proteolytic enzymes and for ROS present in exudates. We believed that this work adds new insights to the, yet undefined, role of SAA in the inflammatory process and gives a broader comprehension to the functions of HDL and its participation in the on the immune response.

4. INTRODUÇÃO

Esta tese dá continuidade a trabalhos anteriores feitos pelo nosso grupo de pesquisa. Nesses estudos prévios foi mostrado que a proteína de fase aguda amilóide sérica A (SAA) age sobre células do sistema imune promovendo a expressão de mRNA e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-8. SAA também é capaz de pré-ativar neutrófilos fazendo com que eles se tornem mais responsivos para a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta a estímulo opsonizado. É importante notar que esses efeitos são desencadeados pela proteína livre, mas não pela forma encontrada no soro que é a da SAA associada à lipoproteína de alta densidade (HDL). Nosso objetivo central neste trabalho foi o de testar nossa hipótese de que a HDL serviria como um transportador seguro de SAA para o foco inflamatório e de que no foco inflamatório a SAA se dissociaria da HDL e exerceria seus efeitos pró-inflamatórios. Para tanto escolhemos efusões pleurais decorrentes de quadros de pneumonia como modelo de foco inflamatório humano. Assim, este trabalho não tem nenhum propósito de estudo clínico, restringindo a utilização da efusão pleural para testar nossa hipótese de trabalho. Observe-se ainda que o sítio inflamatório é rico em enzimas proteolíticas e em espécies reativas de oxigênio que podem causar modificações na estrutura de proteínas. Assim, num estudo paralelo, analisamos a susceptibilidade da HDL e de SAA à oxidação *in vitro* e avaliamos preliminarmente a presença de resíduos oxidados de triptofano/tirosina em proteínas de baixo peso molecular presentes no exsudato pleural.

Os tópicos a seguir, nesta introdução, oferecem uma revisão atualizada de conhecimentos básicos para a compreensão de nosso trabalho.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Processo inflamatório – alguns aspectos bioquímicos

O termo fase aguda refere-se ao processo inicial originado da inflamação infecciosa ou não infecciosa. Estímulos como, infecção, trauma, infarto do miocárdio, queimaduras e cirurgia desencadeiam uma resposta local (resposta de fase aguda), que tem por objetivo auxiliar no reparo tecidual [1]. É caracterizado por mudanças complexas que incluem febre, alteração na permeabilidade vascular [2], leucocitose, proteólise muscular, alteração no metabolismo de carboidratos e mudança na síntese de proteínas hepáticas [3]. A resposta é iniciada e coordenada por diversos mediadores inflamatórios, que incluem citocinas, anafilatoxinas e glicocorticóides. Algumas dessas substâncias são liberadas inicialmente no sítio de inflamação e têm potente ação sistêmica e local. Normalmente, a resposta de fase aguda dura poucos dias, mas, em casos de inflamação recorrente ou crônica, a continuação de alguns aspectos da resposta de fase aguda pode contribuir para o dano tecidual que acompanha a doença, podendo levar a complicações posteriores [2].

Em resposta a um estímulo, macrófagos ativados secretam uma série de mediadores, entre eles a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator de crescimento do hepatócito que induzem a síntese hepática de proteínas de fase aguda [1, 4]. IL-6 e IL-1 β são os indutores mais potentes da resposta de fase aguda nos hepatócitos [5]. A função da maioria das proteínas de fase aguda é desconhecida, mas se aceita que essas proteínas possam servir para aumentar a sobrevivência do hospedeiro pela neutralização dos agentes infecciosos. Dessa maneira, contribuem para o reparo tecidual e restauram a homeostasia [1, 2]. No homem, as principais proteínas de fase aguda incluem a amiloide sérica A (SAA) e a proteína C reativa (PCR). A concentração plasmática dessas proteínas pode aumentar até 1000 vezes após o estímulo inflamatório dentro de 24 horas [1, 2, 6]. A síntese dessas proteínas (SAA e PCR) ocorre primariamente nos hepatócitos [4, 5], mas sítios extra-hepáticos também podem sintetizar essas proteínas. É o caso de monócitos, células endoteliais,

fibroblastos e adipócitos [2, 4, 7]. A concentração de outras proteínas também aumenta no processo de fase aguda, como o sistema complemento, haptoglobulina e α_1 -glicoproteína ácida, entre outras, mas esse aumento é menos intenso (até 3 vezes) [2].

5.2 Lipoproteínas

Lipoproteínas são partículas globulares que contém uma membrana externa consistindo de uma camada de proteínas especiais chamadas de apolipoproteínas intercaladas com lipídeos polares (fosfolipídeos e colesterol não esterificado). Essa camada de lipídeos polares e proteínas envolve um núcleo central de lipídeos neutros (triglicerídeos e colesterol esterificado) [8]. A ligação entre os lipídeos que se encontram no núcleo interno com os da superfície é não covalente, ocorrendo através de ligações de hidrogênio e forças de *van der Waals* [9]. São partículas definidas convencionalmente com base em sua densidade e mobilidade eletroforética [10]. Um esquema de uma lipoproteína está demonstrado na figura abaixo (figura 1).

Figura 1: Representação esquemática de uma partícula de lipoproteína. Ilustração da camada externa (apolipoproteínas e lipídeos polares) e do centro contendo triglicérides e colesterol esterificado.

As classes de lipoproteínas são as seguintes:

- Quilomícrons: contém principalmente triglicérides e são as partículas menos densas; possuem densidade $< 0,94$ g/mL;
- Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL): contém aproximadamente 52% de triglicérides, 18% de fosfolípidos 22% de colesterol e 8% de proteínas, e sua densidade encontra-se entre 0,94 e 1,006 g/mL;
- Lipoproteínas de baixa densidade (LDL): contém 80% de lipídeos e 20% de proteínas. Aproximadamente 50% dos lipídeos da LDL é colesterol e possuem densidade entre 1,006 e 1,063 g/mL;
- Lipoproteínas de alta densidade (HDL): contém aproximadamente 50% de proteínas e 50% de lipídeos e possuem densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL.

Cada classe de lipoproteína representa uma população heterogênea de partículas que diferem não só no tamanho, mas também na composição de

apolipoproteínas na membrana além de possuírem diferentes misturas de lipídeos no núcleo. As apolipoproteínas são essenciais na manutenção da integridade estrutural da lipoproteína e embora tenham funções de transporte, algumas delas são ativadores ou inibidores de enzimas lipolíticas enquanto outras são determinantes no catabolismo de lipoproteínas mediado por receptores [10].

5.2.1 HDL

A HDL é a menor de todas as lipoproteínas plasmáticas (diâmetro de 7,4 a 12 nm). É encontrada no plasma humano e seu peso é constituído de 50 % de proteína, 25 % de fosfolipídeos, 20 % de colesterol (a maioria do colesterol se encontra na forma esterificada) e 5 % de triglicérides. As HDL compreendem várias subclasses que variam no tamanho, composição química e resposta imunológica, mas classicamente são divididas em duas subclasses: HDL₂ (densidade entre 1,063 e 1,125 g/mL) e HDL₃ (densidade entre 1,125 e 1,21) [11]. A maioria das partículas de HDL são esféricas, apresentando mobilidade α em gel de agarose [12]. A existência destas várias partículas está relacionada a múltiplos estágios de maturação e ao remodelamento que a HDL sofre durante o seu metabolismo [13]. As HDL na sua forma madura formam subpopulações distintas que contém um núcleo hidrofóbico, principalmente éster de colesterol e uma pequena quantidade de triglicérides, circundado por uma camada de fosfolípides (principalmente fosfatidilcolina), colesterol não esterificado e apolipoproteínas [13].

As apolipoproteínas A-I e A-II (apo A-I e apo A-II) são as principais proteínas constituintes da HDL, compreendendo em torno de 90% do total de massa de proteínas da partícula mas na superfície dessa lipoproteína também existem outras apolipoproteínas: apo A-IV, apo C, apo D e apo E [10, 14]. Apo A-I e apo A-II também são encontradas nos quilomícrons linfáticos e podem ser encontradas em quantidades traço na VLDL [11].

A apo A-I e a apo A-II são sintetizadas como pré-proteínas no fígado e no intestino, e são catabolisadas primariamente no fígado e nos rins. A apo A-I madura é um polipeptídeo único contendo 243 resíduos de aminoácidos e seu

peso molecular aproximado é 28.000 daltons [11]. Estudos sobre a apo A-I mostraram que regiões definidas da proteína são estruturalmente e funcionalmente distintas. Domínios específicos da proteína determinam a interação dela com membranas plasmáticas, a indução do efluxo de colesterol e a ativação da lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), enzima responsável pela esterificação do colesterol no plasma [12].

A apo A-II madura possui peso molecular aproximado de 8707 [15] daltons e existe como um dímero contendo duas cadeias peptídicas idênticas de 77 aminoácidos ligadas por uma ponte dissulfeto. No plasma a apo A-II madura é polimórfica [11, 14]. Ela é um inibidor fisiológico da lipase hepática e mantém os níveis de colesterol-HDL (pela inibição da lipase hepática) [16].

5.3 Amilóide Sérica A

SAA é um termo genérico para uma família de apolipoproteínas encontrada predominantemente associada com a lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma [17, 18]. Possui diferentes isoformas, sendo expressa constitutivamente e em resposta a um estímulo inflamatório [18]. É codificada por diferentes genes com alta variação alélica e um alto grau de homologia entre as espécies sendo altamente conservada no decorrer da evolução [17, 19].

A família do gene da SAA humana compreende 4 genes conhecidos que foram localizados no braço curto do cromossoma 11p15.1, que são responsáveis pela produção das proteínas SAA [20, 21, 22]. Os genes da SAA1 e SAA2 são quase idênticos em relação a estrutura primária de seus produtos específicos, sua organização e sequência gênica, e seu modo de expressão [2]. SAA1 e SAA2 (SAA-FA) são induzíveis, sendo as proteínas circulantes predominantes durante o processo de fase aguda, atingindo o máximo de transcrição 3 horas após a indução da fase aguda. Têm 104 aminoácidos, peso molecular de 11682,7 daltons e 93% de homologia entre si [20, 17, 21]. O gene da SAA3 é um pseudogene e não é expresso, possuindo 71% de identidade com a SAA-FA [20, 21]. O gene da SAA4 é expresso constitutivamente e seus níveis não aumentam como resultado

de um estímulo inflamatório, existindo no soro em concentrações entre 80-140 mg/L. A SAA4 difere da SAA-FA em relação ao tamanho da cadeia peptídica, pois possui 112 aminoácidos, possuindo somente 55 % de homologia com a SAA-FA [20].

As concentrações circulantes no plasma da SAA-FA, aumentam de 500 a 1000 vezes (de 1-5 µg/mL a 1 mg/mL) dentro de 18 a 24 horas e seus níveis retornam ao normal dentro de 5 a 7 dias após o estímulo inflamatório [20, 17, 19, 23, 24, 25]. É produzida predominantemente pelo fígado [4, 16], mas a expressão de SAA ocorre em menor extensão em outros tipos celulares como macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas, linfócitos, adipócitos [22], além de ser encontrada em lesões ateroscleróticas, tumores humanos e no cérebro de pacientes com Alzheimer [4, 7, 21].

Condições inflamatórias repetidas ou prolongadas, associadas com altos níveis de SAA podem causar uma forma reativa de amiloidose, condição associada com a formação da placa amilóide. Esta condição está relacionada a algumas disfunções como a doença de Alzheimer e esclerose múltipla. A amiloidose é uma doença progressiva, caracterizada pelo depósito em órgãos vitais de uma placa insolúvel (fibrilas amilóides), composta principalmente de um fragmento da SAA (proteína amilóide A) [19, 26].

A síntese de SAA-FA é regulada por citocinas associadas à inflamação (principalmente TNF- α , IL-1 β e IL-6) [4, 6, 25], hormônios produzidos por células endoteliais, linfócitos e monócitos/macrófagos ativados [19]. Durante a resposta de fase aguda, a SAA é secretada no plasma e desloca a apo A-I da HDL. A SAA se associa rapidamente com a partícula, tornando-se assim, a apolipoproteína predominante da HDL (apo-SAA) [21, 27]. Embora a SAA tenha sido encontrada associada com outras lipoproteínas (LDL, IDL e VLDL) [28], a subfração 3 da HDL (HDL₃) é oceptor preferencial da proteína, podendo, em circunstâncias extremas, constituir até 87 % do conteúdo de apolipoproteína da HDL₃ [19, 29], mas raramente excedendo 50 % [30].

Durante a fase aguda, a associação da SAA com a HDL₃ formando a HDL de fase aguda (HDL-FA), modifica a partícula, e como consequência, ocorre o

remodelamento da superfície da partícula. A HDL-FA é maior e mais densa que a HDL₃ normal. Como consequência, ocorrem mudanças funcionais na HDL [2, 19, 22]. A HDL normal (rica em apo A-I e colesterol esterificado e pobre em SAA) possui alta afinidade pela lecitina:colesterol acil transferase (LCAT), mas a afinidade da HDL-FA por esta enzima é próxima de zero [22]. Desta maneira, ocorre uma diminuição na capacidade funcional da HDL em promover o efluxo do colesterol (principalmente quando o conteúdo SAA excede 50 % do total de proteínas da HDL) [2, 30]. O remodelamento da partícula de HDL, implica também na diminuição da atividade de outras enzimas associadas à ela, tais como a paraoxonase e PAF acetilhidrolase (enzimas antioxidantes que previnem a oxidação da LDL) [19, 31].

Embora a função biológica da SAA não seja totalmente esclarecida, vários efeitos e funções foram descritos para a SAA. Entre estas funções, foi demonstrado que a SAA inibe a agregação plaquetária [24]; induz a adesão, migração e infiltração tecidual de monócitos e leucócitos polimorfonucleares [32,33]; inibe a adesão de linfócitos T humanos a proteínas da matriz extracelular [6]; diminui a interação entre células T e macrófagos [34]; e se liga a neutrófilos [35] e células THP-1 [30]. Alguns estudos iniciais descreveram uma atividade antiinflamatória para SAA que foram traduzidos como sendo decorrentes do remodelamento da partícula de HDL com facilitação da captação, processamento e/ou liberação de fosfolípidos e colesterol nos sítios de inflamação [19] e a SAA redirecionaria a HDL para os sítios de inflamação [21]. Entretanto, hoje sabe-se que esta atividade não está relacionada à SAA e sim a partícula de HDL de fase aguda [36]. Outros estudos demonstraram que o deslocamento da apo A-I pela SAA na partícula de HDL em pacientes em fase aguda pode diminuir a eficiência da HDL em promover o transporte reverso do colesterol, podendo estar associado ao desenvolvimento de doença cardiovascular [30].

O *burst* oxidativo de neutrófilos é inibido em presença de SAA em baixas concentrações (0,1 µg/mL) quando eles são estimulados com FMLP (M-formil-metionil-leucil-fenilalanina) [37], mas em concentrações altas de SAA (50 µg/mL), há um estímulo na produção de O₂^{•-} [7]. Nosso grupo demonstrou que SAA age

como um *priming* em neutrófilos, tornando as células mais “responsivas” a um estímulo opsonizado [38]. Além disso, demonstramos também que a SAA é um potente estímulo para a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-8 de neutrófilos sangüíneos humanos [36] e também aumenta a expressão dessas citocinas [39, 40]. Esses dados demonstram que a SAA pode ser um importante mediador do processo inflamatório.

5.4 Efusão Pleural

Efusões pleurais são formadas como resultado de um desequilíbrio entre a formação e a remoção de líquido pleural e são classicamente divididas em transudatos e exsudatos [41]. A distinção entre transudatos e exsudatos é importante pois os transudatos não são causados por processos inflamatórios, enquanto os exsudatos são formados em decorrência de processos inflamatórios [9].

Um fluido que acumula um ultrafiltrado é chamado de transudato. Através dos poros capilares das membranas geralmente passam proteínas de 200.000 a 300.000 daltons, mas moléculas maiores não passam. Os transudatos têm pouca proteína em relação ao plasma [8]. A formação de transudatos ocorre quando fatores mecânicos influenciam a formação ou reabsorção do líquido pleural. As alterações que produzem transudatos incluem o aumento da pressão osmótica plasmática, aumento da pressão sistêmica ou aumento da pressão hidrostática pulmonar. Desta maneira, o líquido pleural se acumula [42]. O líquido pode se originar do pulmão ou pleura, e a permeabilidade dos capilares às proteínas é normal na área onde o líquido é formado. Entre as causas de formação de transudatos se encontram a falência cardíaca congestiva, cirrose, nefrose e hipoproteïnemia [41, 42].

Exsudatos são os fluidos que acumulam quando as membranas são injuriadas por processos inflamatórios ou infecciosos [8]. São formados como resultado de inflamação pleural e dano na drenagem linfática ou como resultado de doença na superfície pleural, como o que ocorre na tuberculose, pneumonia

com efusão, pancreatite, infarto pulmonar e lúpus eritematoso sistêmico [42, 43]. O desenvolvimento de processos inflamatórios no espaço pleural pode resultar em um aumento da permeabilidade vascular levando ao acúmulo de um líquido rico em proteínas [44]. Os critérios estabelecidos por Light e colaboradores (1972) são os mais utilizados para separar efusões pleurais exsudativas e transudativas. Com o critério de Light, um líquido pleural é considerado um exsudato se um ou mais dos seguintes parâmetros são encontrados: relação proteína do líquido pleural:soro maior que 0,5; relação lactato desidrogenase (LDH) do líquido pleural:soro maior que 0,6; LDH do líquido pleural maior que 2/3 do limite superior normal para a LDH de soro [41].

Quando um paciente apresenta efusão pleural exsudativa, os seguintes testes são utilizados para determinar a causa da efusão pleural: aparência do líquido pleural, semeadura e cultura do líquido, hematócrito e contagem diferencial de células do líquido, citologia do líquido, níveis de adenosina deaminase, glicose, amilase e LDH no líquido [41]. Segundo os estudos estabelecidos por Light e colaboradores, mais de 80 % dos exsudatos possuem contagem de leucócitos maior que $1000/\text{mm}^3$ além de possuírem alta concentração de LDH [42]. A contagem diferencial de células é útil na determinação da etiologia do líquido pleural [41].

Alguns estudos têm comparado o critério de Light com outros testes, pois o critério de Light ainda é controverso para a diferenciação de exsudatos e transudatos. Critérios alternativos, como a utilização da concentração de colesterol do líquido pleural e o gradiente de albumina entre soro e líquido, têm sido propostos. Porém, esses estudos concluíram que o critério proposto por Light (1972) ainda é a melhor opção para a separação de transudatos de exsudatos [45, 46]. A determinação de sL-selectinas (selectinas solúveis de leucócitos) em efusão pleural, proposta por Horvath e colaboradores (2001), foi realizada também com o intuito de diferenciar transudatos de exsudatos. Os autores observaram que a determinação desse parâmetro gera resultados muito semelhantes aos obtidos por Light para diferenciar os líquidos pleurais [47].

Poucos dados a respeito do uso de marcadores inflamatórios para a análise do líquido pleural têm sido publicados. Como transudatos são formados devido a alterações na pressão hidrostática ou osmótica, e, algumas etiologias das efusões pleurais exsudativas são inflamatórias na origem, substâncias envolvidas na resposta inflamatória podem ajudar a diferenciar transudatos de exsudatos. A inflamação e infecção pulmonar estão associadas com a ativação local dos tecidos afetados e o recrutamento de células inflamatórias [47, 43].

O processo inflamatório é caracterizado por uma exacerbada liberação de citocinas pró-inflamatórias bem como antagonistas naturais de citocinas [43]. Interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) [47], interleucina-8 (IL-8) [44] e receptores solúveis de fator de necrose tumoral do tipo I e II (TNFRI e TNFRII) [43] têm valores mais elevados em exsudatos. A determinação do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também tem sido avaliada por ser um potente indutor de IL-8, e foi encontrado numa concentração capaz de induzir a produção de IL-8 por macrófagos e fibroblastos [48].

5.5 Citocinas em exsudatos

Durante o início do processo inflamatório a migração e a ativação de leucócitos dentro do espaço pleural pode ser efeito de mediadores solúveis liberados por células “residentes” que são ativadas por vários estímulos [44]. A IL-8 é uma citocina quimiotática que tem papel especial. Esta quimiocina é responsável pelo recrutamento de neutrófilos [48] e linfócitos [44] e tem intensa ação angiogênica. É comum haver uma correlação positiva entre níveis de IL-8 e gravidade de doenças [39]. Células mesoteliais pleurais, macrófagos alveolares, linfócitos, fibroblastos pulmonares e neutrófilos produzem IL-8 [48]. Embora os neutrófilos produzam menos IL-8 do que macrófagos (cerca de 30 vezes menos), a grande quantidade de neutrófilos presentes no exsudato apontam para estas células como a principal fonte de IL-8 em pacientes com empiema [48].

Em estudo realizado por Pace e colaboradores (1999) foi verificado que as concentrações de IL-8 são maiores em efusões pleurais exsudativas de origem

inflamatória do que em efusões pleurais transudativas causadas pelo excesso de pressão hidrostática. Também foi demonstrado que o acúmulo de IL-8 no espaço pleural é devido à produção local e não ao aumento da permeabilidade vascular [44].

Outros mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β possuem funções importantes no processo inflamatório, pois iniciam e mantêm a resposta inflamatória [49, 2]. Macrófagos alveolares liberam IL-1 e TNF- α que induzem a expressão gênica e a produção de IL-8 por células epiteliais pulmonares, resultando no recrutamento de leucócitos [44]. TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, incluindo a indução e o incremento das funções celulares em neutrófilos. Esta citocina também participa na manutenção da homeostasia imune pela indução celular da apoptose, que limita a extensão da reação inflamatória. Citocinas inflamatórias e outros estímulos, como produtos bacterianos, podem ativar a liberação de TNF- α por alguns tipos celulares [40].

Níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-8 foram encontrados no soro e no líquido do lavado broncoalveolar de pacientes com sepse e síndrome respiratória aguda [50]. É provável que a presença compartimentalizada de citocinas e alguns inibidores (como os TNFRs) na efusão pleural estejam relacionadas à ocorrência da inflamação no local [43].

5.6 Exsudatos como fonte de peroxidase para a oxidação de proteínas

Exsudatos, sendo líquidos ricos em neutrófilos e células mononucleares, oferecem condições únicas para a oxidação de diferentes substratos, ou seja, produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividade peroxidásica garantida pela enzima mieloperoxidase (MPO), que são fundamentais para a defesa do hospedeiro. Essas moléculas reagem com uma grande variedade de biomoléculas oxidáveis e, dentre os possíveis alvos de EROs e MPO estão as proteínas [51]. Acredita-se que oxidação de componentes celulares tenha um papel fundamental na causa de danos em componentes celulares específicos [52].

A modificação de proteínas mediada por radicais livres está associada com a fragmentação da cadeia polipeptídica, a formação de *cross-linking* entre as cadeias da proteína e a oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos [53, 54]. A modificação de aminoácidos altera as propriedades funcionais de peptídeos e proteínas, e, algumas vezes, resulta em produtos com a atividade original modificada, incluindo a formação de produtos tóxicos [55]. As formas oxidadas de proteínas estão presentes em quantidades significantes em uma série de condições, incluindo o envelhecimento, arteriosclerose, artrite reumatóide, diabetes, catarata, enfisema, distrofia muscular, disfunções pulmonares entre outras [53, 54, 55]. As proteínas são os principais alvos para radicais e outros oxidantes quando estes são formados no meio extra e intracelular. A oxidação de proteínas é mediada por interações com uma ou mais espécies reativas de oxigênio ($\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , O_3) que podem ser geradas por radiação ionizante, reações catalisadas por metais, processos fotoquímicos ou como produtos de reações redox catalisadas por enzimas [54].

Os resíduos de aminoácidos aromáticos de proteínas (fenilalanina, tirosina e triptofano) são particularmente sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROs) como ozônio, oxigênio singlete, e também por radiólise e reações catalisadas por metais [53, 54]. Outros aminoácidos também são alvos susceptíveis à oxidação, como a metionina, cisteína, histidina, prolina, lisina e arginina [52]. Os principais sítios de ataque nos aminoácidos aromáticos são os anéis aromáticos e resultam na oxigenação do anel. Com o triptofano (Trp) também pode ocorrer a clivagem do anel indólico [57].

Os anéis fenol e indol dos resíduos de Trp são ambos susceptíveis ao ataque por ozônio, radiólise e oxigênio singlete [54]. A oxidação do Trp pode ser muito rápida devido ao baixo potencial de oxidação deste aminoácido (E^0 , 1,015) [56], resultando na formação de uma variedade de compostos hidroxilados (na posição 2-, 4-, 5-, 6- ou 7-) ou produtos da abertura do anel como a *N*-formilquinurenina (NFK), 3-hidroxiquinurenina (3OH-KYN), quinurenina (KYN) e outros produtos de oxidação (figura 2) [52, 56]. Algumas dessas moléculas podem

Figura 3: Estrutura da mieloperoxidase humana – isoforma C
(<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1CXP>)

A principal atividade biológica de MPO é a produção de ácido hipocloroso (HOCl). Este oxidante forte é gerado quando peróxido de hidrogênio reage com a enzima nativa férrica (MPO^{3+}) para formar o intermediário redox composto I (figura 4), que então oxida cloreto (Cl^-). Peróxido de hidrogênio se origina da dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) formado pelo sistema NADPH-oxidase [59]. O ácido hipocloroso possui atividade antimicrobiana e é extremamente reativo com moléculas biológicas. É um dos responsáveis pelos danos mediados pelos neutrófilos na inflamação [60]. A oxidação de substratos comuns por MPO ocorre via um ciclo catalítico peroxidásico clássico que envolve composto I e II e a regeneração da forma nativa (MPO^{3+}) (vide figura 4).

Figura 4: Ciclo peroxidásico clássico para MPO.

Várias oxidações de proteínas, catalisada por MPO, têm sido descritas. Como exemplo, temos a oxidação de apo B-100, a apolipoproteína da LDL [61], apo A-I [62, 63], e apo E [63]. Estes estudos demonstraram que o HOCl (que é gerado via ciclo peroxidásico – figura 4) provocaria a modificação dessas apolipoproteínas, onde os principais alvos seriam a metionina, lisina, tirosina, fenilalanina, cisteína e triptofano [63].

6. OBJETIVOS

Este trabalho foi proposto com o objetivo de verificar a presença de SAA em exsudatos e definir sua origem, além de verificar sua atividade pró-inflamatória *in vivo*. Paralelamente, tivemos como objetivo analisar a oxidabilidade desta proteína.

Objetivos específicos:

- verificar a presença da SAA em exsudatos através das técnicas de SDS-PAGE, *immunoblotting* e HPLC;
- quantificar SAA, PCR, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, apo A-I, apo A-II, apo B, TNF- α , IL-8 e IL-1 β em soro e exsudato de pacientes com pneumonia e com estes dados:
 - verificar a passagem da SAA e das apolipoproteínas A-I, A-II e B do soro para exsudatos inflamatórios;
 - definir as correlações existentes entre SAA, PCR, apo A-I, apo A-II, apo B e proteínas totais no soro e no exsudato;
 - estimar a contribuição dos processos de produção local e de proteólise para a SAA no foco inflamatório;
 - verificar a correlação entre SAA com TNF- α , IL-8 e IL-1 β ;
- verificar a oxidabilidade da HDL e de suas apolipoproteínas A-I e SAA pelo sistema peroxidases/H₂O₂, sistema este que mimetiza condições de oxidabilidade do foco inflamatório

- estimar a presença de proteínas de baixo peso molecular (<100000 daltons) oxidadas em exsudato pleural
- verificar o efeito da SAA oxidada sobre a liberação de IL-8 por neutrófilos ativados;

7. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em concordância com as normas éticas constantes na resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) sob número 244/01 (anexo 1). As amostras foram utilizadas perante a assinatura do Termo de Consentimento pelo paciente ou responsável (anexo 2).

7.1 Materiais

7.1.1 Reagentes

Triptofano, dimetil sulfóxido (DMSO), acetato de forbol miristato (PMA), 2-mercaptoetanol, persulfato de amônio, *N,N,N',N'*-tetrametiletilenediamina (TEMED), albumina sérica bovina (BSA), meio de cultura RPMI 1640 (R-4130) suplementado com Hepes, soro fetal bovino, L-glutamina (2mM), estreptomicina (0,1 mg/mL), penicilina (100 U/mL), fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF), dextran, Histopaque^R (d = 1,077), lipopolissacarídeo de *E.coli* sorotipo, 026:B6, EDTA, HRP (EC 1.11.1.7, tipo IV), acrilamida, bis-acrilamida (*N,N'*-metileno-bis-acrilamida), trizma base, dodecil sulfato de sódio (SDS), azul de bromofenol e quinurenina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, metanol, acetonitrila, bicarbonato de sódio, reativo de Folin, ácido ortofosfórico, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de potássio, peróxido de hidrogênio, ácido acético glacial, tween 20, TFA (ácido trifluoracético) foram obtidos da Merck S.A. (Darmstadt, Alemanha). O anticorpo anti-SAA humano e DAB (3,3' diaminobenzidina) foram obtidos da Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA). Os padrões de peso molecular e o anticorpo anti IgG de coelho (peroxidase conjugado) foram obtidos da Amersham Biosciences UK Limited. As determinações de TNF- α e IL-8 foram realizadas

através de placas de ELISA montadas a partir de Kits DuoSet da R&D System. Soro fetal bovino foi adquirido da GIBCO BRL – Life Technologies. Recombiante humano de amiloide sérica A (SAAr) da Prepro Tech Inc. Coomassie Brilliant Blue R-250 e Coomassie Brilliant Blue G-250 foram obtidos da Bio-Rad Laboratories. Glicina foi adquirida da Ajinomoto do Brasil. Membrana Immobilon-P^{sq}, unidades filtrantes Millex e dispositivos para ultrafiltração Ultrafree 100k foram obtidos da Millipore. A água utilizada foi deionizada em equipamento MilliQ® (Millipore)

7.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - HPLC Shimadzu LC-10 AT com detectores UV-VIS SPD-10AT-VP e Fluorescência RF10A XL;
- Coluna de fase reversa C₄ VYDAC 214TP54, 5µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm;
- Homogeinizador tipo Potter-Elvehjem;
- Homogeneizador de sangue Phoenix, AP 22;
- Balança Analítica AG 204 Mettler Toledo;
- pHmetro Micronal B374;
- Centrífuga Refrigerada Himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2;
- Speed Vac Plus, modelo SC110, Savant;
- Fluxo laminar VECO;
- Estufa incubadora de CO₂ marca Harris, modelo CNW300A;
- Banho-maria 37° C com Agitador orbital – Gyrotory Water Bath Shaker;
- Modelo G76;
- Banho-maria 37° C;
- Freezer -20° C e -80° C;
- Microscópio binocular modelo 81186, Nikon;
- Cuba para eletroforese vertical, BIO-RAD;
- Fonte de alta voltagem para eletroforese modelo EPS 600, Pharmacia Biotech;
- Sistema de transferência *semi-dry* modelo Multiphor II, Pharmacia Biotech;
- Autoclave vertical, modelo 103, FABBE-PRIMA;
- Agitador de tubos, modelo AP 56, Phoenix;

- Centrífuga refrigerada, modelo 5804 R, Eppendorf com rotor de ângulo fixo F45-30-11 e rotores swing A-4-44 e A-2-MTP;
- Leitor de Elisa, modelo SLT-Spectra;
- Fluorímetro modelo Spex 1681 0,22m Spectrometer;
- Espectrofotômetro UV/VIS, modelo UV-1601PC, Shimadzu;
- Espectrofotômetro de massa Quattro II (micromass, Manchester, UK)
- Ultracentrífuga, modelo Ultra Pro 80, rotor vertical, Sorvall.

2

7.2 Casuística

Para o presente trabalho, utilizamos pacientes hospitalizados no HU-USP e HURNP – Londrina – PR, com diagnóstico clínico indicativo de processo inflamatório que tiveram formação de exsudatos pleurais. Os parâmetros de inclusão foram adultos de ambos os sexos, que apresentaram valor de proteínas totais no líquido acima de 1,5 g/dL, celularidade e dosagem de proteína C reativa sérica acima do valor de referência (3 mg/L); sendo que este último foi utilizado como marcador de fase aguda da doença. Somente dois pacientes não tinham a concentração de proteína total mínima, mas tinham a concentração de PCR, que foi utilizado como parâmetro indicativo de fase aguda.

7.3 Amostras de líquido e soro

As amostras de líquidos pleurais e de soro foram coletadas pelo médico responsável do paciente e depois encaminhadas ao Setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HU-USP e HURNP – Londrina – PR, para a realização dos exames bioquímicos e citológicos de rotina. A partir dos resultados obtidos, uma alíquota de soro/plasma e líquido pleural eram separados para as análises posteriores. Para a realização dessa pesquisa foram utilizadas amostras de 12 pacientes do HU-USP e 20 pacientes do HURNP – Londrina - PR.

7.4 Armazenamento das amostras

As amostras de soro e exsudatos foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do soro e das células, respectivamente, aliquotadas em amostras de 1 mL e armazenadas em freezer à -20°C até a utilização para as determinações.

7.5 Dosagens laboratoriais

7.5.1 Proteína C Reativa (PCR)

A PCR foi determinada por nefelometria através do Beringher Nephelometer 100 Analyzer. O reagente utilizado para essa determinação foi o High Sensitivity CRP (Dade Beringher), que é composto por partículas de poliestireno revestido com anticorpo monoclonal contra a PCR. Com a presença da PCR das amostras ocorre a formação de imunocomplexos. A intensidade da luz difusa no nefelômetro é diretamente proporcional à concentração da PCR nas amostras. As amostras foram diluídas 1:20 automaticamente pelo aparelho.

7.5.2 Amilóide Sérica A (SAA)

A SAA foi determinada por Enzima Imunoensaio (ELISA) utilizando o kit comercial da marca Tridelta PhaseTM range. O procedimento utilizado segue a descrição feita pelo fabricante. A placa de ELISA foi sensibilizada com anticorpo monoclonal específico para SAA. Para as amostras, as diluições de 1:500 (para soro) e 1:50 (para líquido) foram realizadas, enquanto que o padrão foi diluído conforme descrito no kit para a realização da curva de calibração. Colocou-se 50 μL de anticorpo monoclonal anti-SAA biotinilado em cada poço e depois foi adicionado 50 μL de cada amostra diluída e dos padrões. Foram incubados por 1 hora a 37°C e a placa foi lavada 4 vezes com tampão diluído. Após, foi acrescentado 100 μL de estraptavidina-peroxidase. Decorridos 30 minutos com a

placa protegida da luz, ela novamente foi lavada com tampão diluído. 100 μ L de substrato TMB foi adicionado à reação, e então a placa foi incubada por mais 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após, foi adicionada 50 μ L de solução *stop*. A absorbância foi lida em leitora de ELISA modelo SLT – Spectra, nos comprimentos de onda de 450 e 630 nm.

7.5.3 Colesterol total

A determinação de colesterol total foi feita através de método enzimático (Labtest Diagnóstica). A colesterol esterase catalisa a hidrólise dos ésteres de colesterol liberando colesterol e ácidos graxos. O colesterol em presença de O_2 é convertido pela ação da colesterol-oxidase em colest-4-en-ona e H_2O_2 . O acoplamento ocorre entre o H_2O_2 formado na reação, 4-aminoantipirina e fenol, que é catalisado pela peroxidase produzindo a antipirilquinoimina, cuja absorbância máxima é em 500 nm.

7.5.3.1 Colesterol HDL

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante. A determinação do colesterol foi realizada pelo método enzimático descrito acima (determinação de colesterol total).

7.5.4 Triglicérides

A determinação de triglicérides foi feita através de método enzimático (Labtest Diagnóstica). A lipase catalisa a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol e ácidos graxos. O glicerol é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e H_2O_2 na presença da glicerolfosfato oxidase. O acoplamento ocorre entre o peróxido de hidrogênio

formado na reação, 4-aminoantipirina e ESPAS (sódio 2-hidróxi-3,5-diclorobenzenossulfona), que é catalisado pela peroxidase produzindo a quinoimina, cuja absorbância máxima é em 540 nm.

7.5.5 Proteínas totais

A metodologia utilizada para a determinação de proteínas totais foi a reação de biureto modificada no aparelho automatizado Dimension® Clinical Chemistry System, utilizando reativos da marca Dade Behring. Esse método incorporou tartarato como um agente quelante para prevenir a precipitação de $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Íons cobre reagem com proteínas em solução básica. O complexo formado possui uma coloração azul que é proporcional a concentração de proteínas totais na amostra. A leitura é realizada em dois comprimentos de onda (540, 700 nm) de ponto final.

7.5.6 Apo A-I, Apo A-II e Apo B

As quantificações de apo A-I, apo A-II e apo B nas amostras foram realizados por nefelometria. As apolipoproteínas contidas no soro humano formam imunocomplexos com anticorpos específicos que podem dispersar a luz incidente. A intensidade da luz dispersa é dependente da concentração da apolipoproteína correspondente na amostra. O anti-soro contra a apo A-I foi produzido através da imunização de coelhos com apo A-I humana purificada, o anti-soro contra a apo A-II foi produzido através da imunização de coelhos com apo A-II humana purificada e o anti-soro contra a apo B foi produzido através da imunização de coelhos com LDL de soro humano. O aparelho utilizado foi Beringher Nephelometer 100 Analyzer, com os reativos N Antiserum to Human-Apolipoprotein A-I, N Antiserum to Human-Apolipoprotein A-II e N Antiserum to Human-Apolipoprotein B da marca Dade Behring para apo A-I, apo A-II e apo B, respectivamente.

7.5.7 Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH foi mensurada através de reação cinética utilizando o aparelho automatizado Dimension[®] Clinical Chemistry System, utilizando reativos da marca Dade Behring. O método baseia-se na oxidação da L-lactato a piruvato com redução simultânea do NAD. A diferença da absorbância em 340 nm devido à formação de NADH é diretamente proporcional à atividade da LDH.

7.5.8 Análise citológica dos líquidos

A contagem de células (leucócitos e hemácias) foi realizada manualmente, utilizando-se a câmara de Fuchs-Rosenthal. A câmara foi carregada com o líquido *in natura* para a realização da contagem, diferenciando leucócito de hemácias. O fator de correção utilizado foi 3, ou seja, todos os valores de leucócitos e hemácias contados foram dividido por 3, fornecendo assim a quantidade real de células. Nos líquidos que apresentaram leucócitos com valores maior ou igual a 100, foram realizadas as contagens diferenciais. O líquido foi centrifugado em baixa rotação (500 rpm) por 10 minutos. O sedimento, em lâmina, foi corado por May-Grünwald-Giemsa. Com a lâmina corada foi realizada a contagem diferencial, contando 100 leucócitos e anotando o resultado em porcentagem.

7.5.9 Dosagem Citocinas:

7.5.9.1 TNF- α

TNF- α foi mensurado em soro e líquido pleural por ensaio imunoenzimático, ELISA. O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do antígeno. Neste caso, a fase sólida, ou seja, o anticorpo de captura foi formado por anti-TNF- α humana (4 μ g/mL), diluída em PBS e o anticorpo de detecção utilizado foi anti- TNF- α humano biotilada (300 ng/mL). Na revelação da reação foi utilizada estreptavidina conjugada com

peroxidase de raiz forte (HRP) (diluição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H_2O_2 e tetrametilbenzidina (TMB). O final da reação se deu pela adição de H_2SO_4 (2N), com leitura realizada em 450 nm e uma leitura de correção em 540 nm (a leitura de correção é importante para eliminar qualquer interferente presente na placa).

Preparo da Placa:

1. O anticorpo de captura foi diluído em PBS, numa concentração final de 4 $\mu\text{g/mL}$. 100 μL do anticorpo diluído foram colocados nos poços, e a placa foi coberta e incubada por 20 horas a temperatura ambiente.
2. No dia seguinte, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05 % Tween 20 em PBS, pH 7.4) três vezes seguidas. Cada lavagem continha 400 μL do tampão e todo o tampão foi removido após a última lavagem.
3. As placas foram bloqueadas adicionando 300 μL de tampão bloqueador (1 % de BSA, 5 % de sacarose em PBS com 0,05 % de NaN_3), e após, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora.
4. As lavagens e aspirações foram repetidas e as placas foram secas à vácuo.

Procedimento de dosagem:

O procedimento abaixo é igual tanto para a dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ quanto para IL-8.

1. Quando necessário foi feita a diluição de amostras ou padrões com o reagente diluente (0,1 % de BSA, 0,05 % Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7.4), por poço finalizado 100 μL de amostra. A placa foi coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente.
2. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação das placas foram repetidas

3. 100 μ L do anticorpo de detecção (300 ng/mL) diluído no reagente diluente foi adicionado. A placa foi coberta novamente com fita adesiva e incubada por duas horas a temperatura ambiente.
4. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação das placas foram repetidas
5. Foi adicionado 100 μ L de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente), e a placa foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente evitando luz direta.
6. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação das placas foram repetidas
7. 100 μ L da solução substrato foi adicionado em cada poço e após, incubado durante 20 minutos à temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo-se o reagente colorido **A** (H_2O_2) e o reagente colorido **B** (tetrametilbenzidina) na proporção 1:1.
8. 50 μ L da solução "stop" (H_2SO_4 , 2 N) foi adicionado em cada poço homogeneizando.
9. A densidade óptica das placas foi determinada imediatamente a 450 e 550 nm.

Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas de TNF- α . Estas foram 1000 pg/mL, 750 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL e 12,5 pg/mL.

7.5.9.2 IL-8

IL-8 foi mensurado praticamente de forma igual ao TNF- α , ou seja, em soro e líquido pleural, além de sobrenadante de cultura de células (mantidas em cultura de 24 horas) por ELISA. O princípio básico do teste é o mesmo. Neste caso, o anticorpo de captura é formado por anti- IL-8 humana de rato (4 μ g/mL), diluída em PBS e o anticorpo de detecção utilizado foi anti- IL-8 humana biotilada (20 ng/mL), diluído em reagente diluente. Na revelação da

reação também utilizamos Streptavidina conjugada com HRP (diluuição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi a mesma mistura 1:1 de H_2O_2 e TMB.

Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos de concentrações conhecidas de IL-8. Estas foram 2000 pg/mL, 1500 pg/mL, 1250 pg/mL, 1000 pg/mL, 750 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL e 50 pg/mL.

7.5.9.3 IL-1 β

IL-1 β foi mensurado praticamente de forma igual ao TNF- α , ou seja, em soro e líquido pleural, por ELISA. O princípio básico do teste é o mesmo. Neste caso, o anticorpo de captura é formado por anti- IL-1 β humana de rato (4 μ g/mL), diluída em PBS e o anticorpo de detecção utilizado foi anti- IL-1 β humana biotilada (100 ng/mL), diluído em reagente diluente. Na revelação da reação também utilizamos Streptavidina conjugada com HRP (diluuição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi a mesma mistura 1:1 de H_2O_2 e TMB.

Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos de concentrações conhecidas de IL-1 β . Estas foram 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,81 pg/mL, 3,91 pg/mL e 1,95 pg/mL.

7.6 Análise da SAA por HPLC

A detecção de SAA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada em equipamento Shimadzu LC-10 AT utilizando detector UV-VIS SPD-10AT-VP. As amostras utilizadas na análise foram semi-purificadas em duas etapas: extração de proteínas e filtração.

7.6.1 Procedimento de extração das proteínas do soro

O processo de extração de proteínas do soro foi realizado pelo método de Cham e Knowles, 1976 [64]. Cinco mililitros de soro foram adicionados a 10 mL da fase orgânica (butanol - diisopropil-éter, 40:60) em tubos de vidro. Os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação lenta em um agitador de tubos tipo homogeneizador de sangue, a uma velocidade de 28-30 rpm, durante 30 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm durante 2 minutos para separar a fase orgânica. A fase aquosa (contendo as proteínas) foi cuidadosamente removida e então submetida ao processo de filtração.

7.6.2 Procedimento de filtração da fase aquosa

A fase aquosa obtida no processo descrito acima foi submetida à filtração utilizando-se dispositivos para ultrafiltração Ultrafree 100.000 (Millipore). Os dispositivos contendo as amostras foram inseridos em centrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5804 R) e então, foram centrifugadas durante 45 minutos à 10.000 g (conforme especificação técnica da Millipore). O filtrado foi separado e então submetido à concentração em concentrador do tipo Speed Vac Plus. Após serem concentradas, as proteínas foram determinadas pelo método de Lowry [65].

7.6.3 Detecção da SAA por HPLC

Após as amostras serem delipidadas, filtradas e concentradas, uma alíquota (aproximadamente 50 µg) foi injetada no HPLC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₄ VYDAC 214TP54, 5µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm e a amostra foi eluída usando um gradiente linear de 20 a 80 % de acetonitrila em 0,1 % de ácido trifluoracético, 1 mL/min, durante 30 minutos [66]. A eluição da amostra foi monitorada por absorbância (UV) em 220 nm.

7.6.4 Análise da SAA por espectrometria de massa

O pico recuperado (11,9 minutos para o padrão de SAA recombinante e 10,78 minutos para a amostra) na corrida de HPLC foi analisado e por espectrometria de massa (HPLC-MS) usando eletrospray (ESI+). A condição de HPLC utilizada neste caso foi 17-83% acetonitrila em 0,1 % de ácido trifluoracético, 1 mL/min, durante 30 minutos. A eluição da amostra foi monitorada por absorbância (UV) em 220 nm.

7.7 Determinação de proteínas pelo método de Lowry nas amostras encaminhadas para a análise eletroforética ou para HPLC

A quantificação de proteínas das amostras de soro e líquido pleural utilizadas nas análises de HPLC, espectrometria de massa e eletroforese foram realizadas pelo método desenvolvido por Lowry, 1951 [65]. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (que é denominado de reagente de Folin-Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença de cobre II (catalisador), produzindo um composto com máximo de absorção em 750 nm.

7.8 Eletroforese da SAA

As amostras de soro e exsudato pleural foram previamente preparadas de maneira igual às amostras que foram submetidas à análise por HPLC, ou seja, as proteínas foram separadas do soro, separadas por membrana de peso molecular e então concentradas. Após terem sua concentração de proteína determinada (pelo método de Lowry), foram submetidas à separação em SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida). Várias condições de separação desta proteína foram testadas (gradiente 7-15%, 15 % e 18%), mas a separação da proteína no tamanho desejado (12000 daltons) foi mais eficiente quando se utilizou um gel de acrilamida/bis-acrilamida 18%. Também testamos a necessidade ou não de submeter a amostra às condições desnaturantes (mercaptoetanol e fervura), tendo sido esta a melhor condição para separação.

Preparo do gel de separação e de empilhamento:

Para o gel de separação foram combinadas as seguintes soluções:

acrilamida 30 %/bis-acrilamida 0,8%	3 mL;
trizma base 1,5 M, pH 8,8 (com SDS 20%)	1,25 mL
água bi-destilada	0,75 mL
persulfato de amônio 10 %	25 µL
Temed	2,5 µL

Após a adição do persulfato de amônio e do Temed, a mistura foi adicionada cuidadosamente nas placas montadas no sistema de eletroforese vertical, BIO-RAD. Após a polimerização do gel (cerca de 45 minutos), foi adicionado o gel de empilhamento, que foi preparado adicionando-se as seguintes soluções:

acrilamida 30 %/bis-acrilamida 0,8%	0,335 mL;
trizma base 0,5 M, pH 6,8 (com SDS 20%)	0,5 mL
água bi-destilada	1,15 mL
persulfato de amônio 10 %	15 µL
Temed	2,5 µL

A mistura foi adicionada ao topo do gel e o pente foi cuidadosamente inserido na solução para evitar a formação de bolhas. O gel ficou em repouso durante aproximadamente 45 minutos para polimerizar.

As amostras (contendo 48-50 µg de proteína), padrão de peso molecular (14000 – 96000 daltons, Pharmacia) e rSAA (5 µg) foram adicionadas à 6 µL do tampão de amostra que continha:

Trizma 60 mM, pH 6,8

Glicerol 25 %

SDS 2 %

2-mercaptoetanol 14,4 mM

azul de bromofenol 0,1 %

O tratamento das amostras, padrão de peso molecular e rSAA com o tampão de amostra à quente (100°C) durante 5 minutos promoveu a desnaturação e a redução das proteínas.

A placa contendo o gel polimerizado foi posicionada na cuba, e no compartimento inferior foi adicionado quantidade suficiente do tampão de corrida (trizma 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %) para entrar em contato com o gel. O pente foi retirado cuidadosamente e o tampão de corrida foi adicionado no compartimento superior. Após, as proteínas foram adicionadas cuidadosamente no gel sendo submetidas posteriormente à corrida (50 Volts/45 min para o empilhamento e 150 Volts/1,5 hrs) até a separação total das proteínas.

Após este procedimento, as proteínas contidas no gel foram coradas com Coomassie Blue (Coomassie Blue R-250, 0,1 %; metanol 45 %; ácido acético glacial 10 %) e descoradas em ácido acético glacial 7% até a completa visualização das bandas protéicas.

As amostras eram aplicadas em dois géis simultaneamente, pois um dos géis foi utilizado para a visualização das bandas de proteínas e o outro era utilizado para transferir as proteínas para a membrana para fazer o *immunoblotting*.

7.8.1 Immunoblotting

Para a eletrotransferência das proteínas foi utilizada uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), Immobilon-P (Millipore). O *immunoblotting* ou *Western blotting* foi utilizado para detectar a SAA e o sistema utilizado foi a transferência *Semi-dry* com método recomendado pela Millipore [67]. Para essa transferência foram utilizados os seguintes equipamentos e soluções:

- gel de poliacrilamida com as proteínas separadas;
- membrana Immobilon-P^{SQ}, cortada nas mesmas dimensões do gel;

- 6 pedaços de papel Whatman nº 3 cortados nas mesmas dimensões do gel;
- tampão anodo I (tris 0,3 M, pH 10,4; metanol 10 %);
- tampão anodo II (tris 25 mM, pH 10,4; metanol 10%);
- tampão catodo (tris 25 mM; glicina 40 mM; metanol 10 %, pH 9,4)

Procedimento de eletrotransferência:

- O gel foi retirado cuidadosamente da placa e foi imerso no tampão catodo por 15 minutos;
- 2 pedaços de papel filtro Whatman nº 3 foram colocados no tampão anodo I por 30 segundos;
- 1 pedaço de papel filtro foi colocado no tampão anodo II por 30 segundos;
- 3 pedaços de papel filtro foram colocados no tampão catodo por 30 segundos;
- a membrana foi preparada da seguinte maneira para poder ser utilizada: ficou 15 segundos em metanol, após foi colocada em água ultrapura por 2 minutos e então foi cuidadosamente colocada em no tampão anodo II por 5 minutos.

A seguir, o sanduíche foi montado da seguinte maneira:

- 2 pedaços de papel filtro umedecidos no tampão anodo I foram colocados na placa do anodo do sistema de transferência *semy-dry*.
- 1 pedaço do papel filtro umedecido no tampão anodo II foi colocado em cima dos pedaços de papel filtro;
- a membrana preparada foi colocada em cima dos papéis;
- o gel foi colocado em cima da membrana;
- os 3 pedaços de papéis filtro umedecidos no tampão catodo foram colocados em cima do gel;
- a placa do catodo foi colocada em cima do sanduíche, e as placas foram conectadas no sistema, conforme a figura abaixo (figura 5):

Figura 5: Representação esquemática do sistema de transferência das proteínas do gel para a membrana utilizando sistema *semi-dry* (esquema apresentado no Protein Blotting Handbook, www.millipore.com/ehandbook.nsf/docs/introduction).

A transferência das proteínas foi conduzida por 1 hora com uma amperagem constante de $1,5 \text{ mA/cm}^2$ de membrana. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S (ponceau-S 0,5 %; ácido tricloroacético 5%), por aproximadamente 5 minutos, até o aparecimento das bandas de proteínas para verificar a eficiência da transferência.

As membranas foram descoradas com água destilada e bloqueadas com uma solução bloqueadora contendo albumina 1 % preparada em Tween 20 0,05 % por toda a noite em geladeira, sob agitação leve e constante para evitar a ligação não específica de proteínas na membrana. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo específico anti-SAA humano (diluído 1:800 em PBS) durante 1 hora à 37°C com agitação contínua. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS (10 minutos cada lavagem) para remover anticorpos não ligados. A identificação do anticorpo que reagiu com as proteínas na membrana foi feita pela adição de um antissoro anti IgG-Peroxidase Conjugado (diluído 1:2000 em PBS). Após 1 hora à 37°C , as membranas foram lavadas novamente, como descrito acima, e a reação foi revelada com uma mistura de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio 30 % e a reação foi

bloqueada com água destilada. A figura 6 representa esquematicamente a reação de imunodeteção da amostra na membrana.

Figura 6: Representação esquemática das imunodeteção de proteínas transferidas para uma membrana (esquema apresentado no Protein Blotting Handbook, www.millipore.com/ehandbook.nsf/docs/introduction).

7.9 Isolamento de neutrófilos

Neutrófilos foram obtidos a partir de sangue de indivíduos saudáveis após 12 horas de jejum e coletado em heparina (10 UI/mL de sangue) e foram isolados por método descrito [68]. Cinco mL de sangue foi diluído v/v com PBS Dulbecco 10 mM (pH 7.4) contendo 100 mM CaCl_2 , 50 mM MgCl_2 e glicose 1 mg/mL e cuidadosamente adicionado sobre 5 mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque^R; $d=1.077$). O tubo foi centrifugado (2500 rpm/ temperatura ambiente) durante 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi descartado, e 10 mL de dextran 5 % foi adicionado ao *pellet*. O tubo foi homogeneizado e mantido durante 30 minutos à temperatura ambiente para permitir a sedimentação de eritrócitos. O sobrenadante resultante, rico em granulócitos, foi recuperado, lavado com PBS Dulbecco e o *pellet* submetido a tratamento hipotônico com 10 mL de água destilada para promover a lise de eritrócitos contaminantes. Após 1 minuto, a isotonicidade foi restabelecida pela adição de 2,5 mL de NaCl 2.7 % e 7,5 mL de PBS.

7.9.1 Cultura de neutrófilos

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 suplementado com Hepes 2,32g/L, L-glutamina 0.3 g/L, bicarbonato de sódio 2.0 g/L, estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10 % soro fetal bovino [36]. O meio foi filtrado em 0.22 µm (Millipore-Sigma) e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Neutrófilos (7.5×10^5 células/mL) foram mantidos em placas Nunc® de fundo chato e foram submetidos a 24 horas de cultura em estufa com 5 % de CO₂ à 37°C. As células foram incubadas na presença de SAA (17 µg/mL), LPS (1 µg/mL), HRP/H₂O₂ (1 µM/1 mM), HRP (1 µM), H₂O₂ (1 mM), SAA (17 µg/mL) e HRP/H₂O₂ (1 µM/1 mM), SAA (17 µg/mL) e HRP (1 µM), SAA (17 µg/mL) e H₂O₂ (1 mM). O material submetido à cultura foi recolhido e centrifugado em frasco de plástico estéril de 0,5 mL à 500 g por 10 minutos à 4°C, e o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento em tubos criogênicos à -80°C até o momento do ensaio de quantificação de IL-8.

7.10 Isolamento da HDL

Preparações de HDL foram obtidas a partir de doadores voluntários recrutados entre professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As frações de HDL foram obtidas por ultracentrifugação seqüencial segundo o método de HAVEL e colaboradores (1955) modificado [69]. Utilizou-se uma ultracentrífuga Sorvall (rotor vertical). Este método permite processar simultaneamente grandes volumes de amostras. Devido ao tempo prolongado das centrifugações, a ocorrência de peroxidações lipídicas foi minimizada pela inclusão de antioxidantes e quelantes apropriados. As lipoproteínas foram obtidas a partir de sangue periférico após jejum de 12 horas. O sangue foi coletado em tubos de coleta contendo EDTA (1 mg/mL). Benzamidina

(1 mM), aprotinina (1 mM), PMSF (1 mM) e BHT (1 mM) foram adicionados ao plasma.

O plasma com densidade ajustada para 1,063 g/mL com solução de KBr (previamente dessecado) foi submetido à 65.000 rpm durante 24 horas à 4°C. Após este período, LDL e VLDL foram retiradas e o plasma teve sua densidade ajustada para 1,21 g/mL (com solução de KBr). Depois de 24 horas, sob as mesmas condições, o infranadante contendo a HDL, foi retirado. Após, as HDLs foram submetidas a exaustivas diálises contra solução de cloreto de sódio 0,9 % (pH 7,4) à 4°C (6 trocas da solução de diálise durante 24 horas). As HDLs foram filtradas em membrana Millipore R (0,22 µm) e estocadas em freezer (-20°C) até o momento das análises.

7.10.1 Determinação da oxidação de apolipoproteínas pelo sistema HRP/H₂O₂ por eletroforese

A HDL obtida por ultracentrifugação seqüencial foi submetida à oxidação pelo sistema HRP/ H₂O₂ (1 µM/1mM) durante 30 minutos à 37°C e agitação contínua. Uma amostra de HDL foi submetida à delipidação [70] para comparar a oxidação da partícula íntegra com uma partícula contendo somente a porção protéica.

O procedimento de extração dos lipídeos envolveu a adição gota a gota da solução de HDL à 3 mL de metanol com agitação contínua. Posteriormente, 7 mL de dietil éter foram adicionados à mistura anterior (com agitação contínua) e esta nova mistura ficou em repouso por 10 minutos em banho de gelo. Após, os tubos contendo a mistura HDL-solventes orgânicos foram centrifugados a 1000 rpm por 4 minutos, e o sobrenadante foi removido por aspiração (fração lipídica). À fração protéica foram adicionados 10 mL de dietil éter com agitação contínua, e novamente foi deixada em repouso por 10 minutos. A mistura foi recentrifugada (1000 rpm/4 minutos) e o sobrenadante foi removido por aspiração. O dietil éter restante foi evaporado com nitrogênio. As apolipoproteínas extraídas foram ressuspensas em tampão contendo glicina (50 mM), hidróxido de sódio (4 mM), cloreto de sódio (0,5 mM) e uréia (6 M) e posteriormente utilizadas.

As amostras de HDL normal, HDL oxidada com HRP/H₂O₂ (1 μ M/1mM), HDL delipidada (contendo 48 μ g de proteína), padrão de peso molecular (14000-96000 daltons, Pharmacia) e padrão de apo A-I (48 μ g) foram submetidas à separação em SDS-PAGE pelo mesmo procedimento utilizado para a separação da SAA. Neste caso, a condição utilizada para a separação das apolipoproteínas da HDL foi um gradiente de acrilamida/bis-acrilamida 7-15 %.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com Coomassie Blue (Coomassie Blue R-250, 0,1 %; metanol 45 %; ácido acético glacial 10 %) e descoradas em ácido acético glacial 7% até a completa visualização das bandas protéicas.

7.10.2 Determinação da oxidação de apolipoproteínas pelo sistema HRP/H₂O₂ por fluorimetria

As lipoproteínas da HDL foram submetidas à oxidação pelo sistema HRP/H₂O₂ (1mM/1 μ M) durante 30 minutos/37°C e agitação contínua. A degradação do triptofano (Trp) e a formação de *N*-formilquinurenina (NFK) nas soluções de HDL, HDL delipidada e SAA foram avaliadas através da fluorimetria (Trp = λ_{ex} 290 nm; λ_{em} 323 nm; NFK = λ_{ex} 325 nm; λ_{em} 420 nm). A concentração de Trp nas soluções de HDL, HDL delipidada e SAA era de aproximadamente 1 mM.

7.11 Preparo das amostras de soro e exsudato pleural para avaliação de fluorimetria

As amostras selecionadas para a análise (pacientes 1 a 11) foram delipidadas (mesmo procedimento de preparação das amostras utilizadas para separação eletroforética e por HPLC). Após serem preparadas e concentradas, 30 μ g de amostra foram submetidas à análise. A fluorescência das amostras foi determinada em λ_{ex} 325 nm; λ_{em} 420 nm.

7.12 Análise estatística

Para a comparação entre os parâmetros bioquímicos, foi aplicado o teste de correlação de Pearson para verificar a existência ou não de correlação entre as variáveis.

A análise estatística utilizada para a comparação da oxidação dos exsudatos pleurais com os soros dos pacientes foi o teste T *student* não pareado através do programa Excel. O nível de significância adotado foi de 95 %.

Para analisar o efeito da SAA oxidada com o sistema HRP/H₂O₂ sobre a liberação de IL-8 por neutrófilos foi utilizado ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Student Newman Keuls, com nível de significância de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Análise e presença de SAA em líquidos biológicos

A proteína SAA é usualmente determinada por imunoensaio. Nesta seção, apresentamos a caracterização desta proteína de fase aguda pelas técnicas de HPLC, MS, SDS-PAGE, e *immunoblotting*. Consideramos este aspecto importante, pois apesar da utilização destas técnicas já terem sido descritas, podemos acrescentar informações úteis na análise de SAA em soro e exsudatos inflamatórios, que a nosso ver, são limitados na literatura. Em conjunto podemos validar o ensaio de ELISA para SAA usado no nosso projeto.

rSAA é visualizada em cromatograma RP-HPLC, nas condições detalhadas em materiais e métodos, com um tempo de retenção de 16,7 minutos (figura 7).

Figura 7: RP-HPLC da rSAA. 5 μ g de rSAA foram injetados em uma coluna Vydac 214TP54. A amostra foi eluída usando um gradiente linear de 20-80 % de acetonitrila em 0,1 % de TFA, durante 30 minutos, sendo monitorada em 220 nm (UV).

Soro de um indivíduo sadio e soro e exsudato pleural de dois pacientes foram delipidados, filtrados e concentrados conforme descrito em materiais e métodos. As corridas em HPLC se deram nas mesmas condições de separação utilizada para rSAA. Para o material originado do soro do indivíduo sadio, não houve o aparecimento de nenhum sinal similar a rSAA (Figura 8A). Entretanto, nas

amostras de pacientes em fase aguda, houve o aparecimento de um sinal próximo àquele de rSAA e com o seu mesmo o perfil cromatográfico. As figuras 8B e 8C mostram os cromatogramas de soro e exsudato dos dois pacientes, com sinal com tempo de retenção em 15,8 minutos.

Figura 8: **A**: Perfil cromatográfico de uma amostra proveniente de soro controle (indivíduo normal) e **B** e **C**: de amostras provenientes de soro e exsudato pleural de pacientes (respectivamente, paciente 15 e 14, ver informações nos anexos 3, 4 e 5) em fase aguda. As amostras injetadas no HPLC continham 50 μ g de proteínas e foram eluídas nas mesmas condições daquelas descritas para rSAA (Figura 7).

Para um dos pacientes (paciente 3) vemos claramente que ambos os líquidos, soro e exsudato, continham uma proteína similar à SAA, entretanto para o paciente 2, este sinal só pode ser observado em soro e não em exsudato. Apesar do número limitado de amostras, o que não permite uma análise conclusiva, pode-se inferir que mecanismos não identificados nestes dois casos poderiam controlar a permeabilidade e passagem de SAA para o espaço pleural. Entretanto, é curioso que a concentração de SAA, medida por ELISA no exsudato pleural destes dois pacientes tenham sido muito semelhantes (2,71 e 2,52 $\mu\text{g/mL}$ para os pacientes 15 e 14, respectivamente). Não se pode excluir que o processo de filtração, necessário no preparo da amostra para HPLC, possa interferir com a recuperação de SAA no filtrado. Sabe-se, por exemplo, que moléculas de alto peso molecular tendem a se agregar formando colóides que poderiam interferir com o processo de filtração.

A análise espectral da massa por HPLC-MS no modo ESI+ da rSAA mostra, como esperado, o íon molecular em $m/z = 11810$ daltons (figura 9). Estranhamente na amostra biológica obtida de soro de um paciente em fase aguda apareceram dois íons moleculares principais: $m/z = 11070$ daltons e outro $m/z = 13280$ daltons (figura 10). É provável que o sinal de 11070 corresponda à uma das isoformas da SAA. Neste sentido, recentemente foi mostrado que múltiplas formas da SAA estão presentes em plasma humano [26]. Estas múltiplas formas se originariam da perda de diferentes fragmentos das extremidades amino e carboxi terminal da proteína, originando formas “truncadas” das proteínas, algumas delas, com peso molecular muito semelhante ao encontrado para o nosso paciente (11070 daltons). Em relação ao sinal de 13280 daltons, não podemos associá-lo com qualquer proteína conhecida. Não conhecemos nenhum estudo que descreva uma proteína com peso aproximado a este em soro de pacientes em fase aguda. Talvez seja algum fragmento de proteína de fase aguda que tenha o mesmo tempo de retenção que a SAA.

Figura 9: Análise espectral da massa do padrão recombinante de SAA obtido pela seleção no modo ESI+. $m/z = 11810$ (massa), corresponde ao íon molecular da SAA.

Figura 10: Análise espectral da massa da amostra de soro obtido pela seleção no modo ESI+. $m/z = 11070$ pode corresponder ao íon molecular de uma isoforma da SAA.

Quando amostras de soro e exsudato de pacientes são submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, há o aparecimento de uma banda larga e fraca na região de 11000 – 14000 daltons, banda esta que não está presente em amostras

controle (figura 11 A). Nestes casos, o *Western blotting* revelado com um anticorpo policlonal anti-SAA humano comercial auxilia a identificação de SAA (figura 11 B).

Figura 11: **A:** SDS-PAGE de amostras de soro e exsudato pleural de 2 pacientes em fase aguda. O perfil das amostras foi comparado com um padrão de peso molecular (1º coluna) e a rSAA (2º coluna). **B:** *Western blotting* da SAA de soros e líquidos pleurais usando anticorpo anti-SAA humano.

Vistos em conjunto, as análises de HPLC, eletroforese e *imunoblotting* evidenciam claramente a presença de proteína de peso molecular próxima ao descrito para SAA humana, tanto em soro quanto em exsudatos de pacientes em fase aguda.

8.2 Apolipoproteínas e marcadores inflamatórios: correlações entre soro e exsudato pleural

SAA, PCR, Apo A-I, Apo A-II, Apo B, proteínas totais (PT), colesterol total (CT), triglicérides (TG), IL-1 β , IL-8 e TNF- α foram determinados em 32 amostras de exsudatos pleurais, e correspondentes amostras de soro, de pacientes com diferentes hipóteses diagnósticas. Os valores individuais estão listados nos anexos e mostram amplos intervalos em alguns dos parâmetros dosados. A análise descritiva das dosagens realizadas, tanto para amostras de soro como para as amostras de exsudato, estão apresentados na tabela I. Nesta, incluímos também os valores de LDH e celularidade do exsudato. A análise descritiva das relações exsudato/soro (E/S) encontradas para os parâmetros analisados estão analisados na tabela II e os valores das relações individuais estão listados em anexo (anexo 7). Das 32 amostras, 9 não tiveram PT (E/S) $\geq 0,5$. Desses 9 pacientes, 6 deles apresentaram valores de LDH superiores a 200 U/L. Desta forma, essas 6 amostras atenderam ao critério de Light para a definição de exsudato [42]. Incluímos as outras 3 amostras pois os pacientes encontravam-se em processo inflamatório, o que foi confirmado pela avaliação de PCR e SAA em soro e líquido.

Para uma melhor compreensão dos nossos resultados, dividimos este capítulo em duas partes:

- a correlação das proteínas de fase aguda SAA e PCR;
- o transporte da SAA para o sítio inflamatório.

Tabela I: Valores descritivos dos parâmetros laboratoriais determinados nas amostras de soro e exsudato

Parâmetros	Soro		Exsudato	
	Intervalo	Média $\pm$ DP	Intervalo	Média $\pm$ DP
Proteínas Totais (g/dL)	4.8 – 9.5	6.31 $\pm$ 1.3 (n=32)	0.8 – 6.3	3.7 $\pm$ 1.4 (n=32)
PCR (mg/L)	4.6 – 426.1	137.8 $\pm$ 97.69 (n=32)	3.0 – 168.6	42.1 $\pm$ 7.49 (n=32)
SAA (μ g/mL)	21.90 – 1567.1	303.4 $\pm$ 327.6 (n=32)	0.8 – 360.5	31.2 $\pm$ 67.2 (n=32)
Apo AI (mg/dL)	16.9 – 135.0	59.0 $\pm$ 29.9 (n=32)	8.0 – 41.6	25.5 $\pm$ 9.4 (n=32)
Apo AII (mg/dL)	4.5 – 23.9	11.3 $\pm$ 5.5 (n=32)	4.5 – 16.1	6.6 $\pm$ 3.1 (n=32)
Apo B (mg/dL)	35.9 – 189.6	77.7 $\pm$ 35.5 (n=32)	12.7 – 67.4	33.9 $\pm$ 13.1 (n=32)
Colesterol (mg/dL)	44.0 – 417.28	149.83 $\pm$ 78.68 (n=32)	2.0 – 137.5	48.75 $\pm$ 34.29 (n=32)
Triglicérides (mg/dL)	37.0 – 383.0	111.24 $\pm$ 79.9 (n=32)	8.0 – 66.4	30.5 $\pm$ 19.8 (n=32)
Lactato desidrogenase (U/L)	-	-	23 – 40900	2334 $\pm$ 7340 (n=32)
IL-1 β (μ g/mL)	22.8 – 57.2	27.8 $\pm$ 7.5 (n=20)	25.1 – 1402.3	122.4 $\pm$ 306.7 (n=20)
IL-8 (μ g/mL)	3.2 – 2047.5	164.45 $\pm$ 378.12 (n=31)	7.56 – 5237.5	709.16 $\pm$ 1337.88 (n=31)
TNF- α (μ g/mL)	0 – 1163.67	228.97 $\pm$ 243.61 (n=26)	0 – 1214.79	380.13 $\pm$ 363.50 (n=30)
Leucócitos/mL	-	-	128 – 525600	24076 $\pm$ 96417 (n=30)

Tabela II: Valores descritivos das relações exsudato/soro para os parâmetros medidos

Parâmetros	E/S	
	Intervalo	Média $\pm$ DP
Proteínas Totais (n = 32)	0.12 – 0.96	0.58 $\pm$ 0.19
PCR (n = 32)	0.03 – 2.21	0.372 $\pm$ 0.397
SAA (n = 32)	0.002 – 0.370	0.07 $\pm$ 0.072
Apo A-I (n = 31)	0.17 – 1.0	0.49 $\pm$ 0.21
Apo A-II (n = 31)	0.26 - 1.22	0.67 $\pm$ 0.28
Apo B (n = 31)	0.17 - 1.0	0.48 $\pm$ 0.21
Colesterol (n = 32)	0.009 - 0.850	0.337 $\pm$ 0.178
Triglicérides (n = 32)	0.08-0.11	0.32 $\pm$ 0.22
IL-1 β (n = 20)	0.78-56.80	4.80 $\pm$ 12.45
IL-8 (n = 31)	0.01-463.30	68.76 $\pm$ 135.18
TNF- α (n = 26)	0.05-10.58	2.66 $\pm$ 3.04

8.2.1. Proteínas de fase aguda nos exsudatos pleurais: SAA e PCR

Nas amostras de soro encontramos correlação entre SAA e PCR (figura 12). As concentrações de soro e exsudato de SAA e PCR para os pacientes estudados tiveram uma ampla variação. Esta variação era esperada e

provavelmente refletia as diferentes fases da doença, pois a concentração da SAA na fase aguda pode aumentar em 1000 vezes [19].

A relação exsudato/soro para PCR e SAA também variou em um amplo intervalo (ver tabela II). Em média, os exsudatos apresentaram aproximadamente 10 e 37 % da SAA e da PCR presente no soro, respectivamente.

A quantidade de SAA e PCR nos exsudatos é suficiente para desencadear os efeitos biológicos descritos para essas proteínas. No caso da SAA, 1 $\mu\text{g/mL}$ é suficiente para modular a expressão de mRNA e a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-8 de cultura de neutrófilos humanos [36, 39, 40].

Figura 12: Correlação entre SAA e PCR nas amostras de soro dos pacientes ($r = 0,7602$; $DP = 210,68307$; $p < 0,0001$)

A análise de correlação do soro e exsudato para SAA, PCR e proteínas totais (PT), mostrou uma correlação mais forte para SAA do que para PCR e PT (tabela III, figura 13). Na figura 13, onde verificamos a existência de uma forte correlação entre as amostras de soro e de exsudato para a SAA (linha a), há 2

pacientes cujos valores encontrados nas determinações de soro estão distanciados dos demais (verificar pacientes 20 e 24 nos anexos 4 e 5). Como a variação dos níveis de SAA é normalmente bastante ampla aceitamos estes valores como pontos que refletem uma situação real e os mantivemos em todas as análises subsequentes. De qualquer modo a correlação entre SAA sérica e a presente no exsudato é mantida mesmo que esses pontos sejam excluídos (linha **b**).

A correlação positiva para SAA entre soro e exsudato foi interpretada como indicativo de uma forte contribuição do soro para o *pool* da SAA presente no exsudato. No entanto, a possibilidade de uma síntese local de SAA para a contribuição do *pool* de SAA no exsudato não foi descartada, e, provavelmente deve ser mais significativa em baixas concentrações de SAA.

Tabela III: Coeficiente de correlação para as dosagens realizadas nas amostras de soro e exsudato

Correlação entre soro e líquido	Coeficiente de correlação	
	(<i>r</i>)	<i>p</i>
SAA	0,7862	< 0,0001
PCR	0,5621	0,00081
Proteínas Totais	0,5497	0,00112

Figura 13: **A:** Correlação entre SAA de soro e exsudato. A linha **a** indica a correlação entre os 32 pacientes ($r = 0,78624$; $DP = 46,227$; $n = 32$; $p < 0,0001$) e a linha **b** indica a correlação que há entre os 30 pacientes ($r = 0,6754$; $DP = 13,3933$; $n = 30$; $p < 0,0001$). **B:** Correlação entre PCR de soro e exsudato ($r = 0,56214$; $DP = 35,653$; $p < 0,000812$).

A SAA e a PCR estão correlacionadas no soro ($r = 0,7602$) (figura 12) e nos exsudatos ($r = 0,4817$), entretanto, nos exsudatos essa correlação é menor. Embora vários estudos tenham relatado as concentrações séricas das proteínas de fase aguda PCR e SAA em doenças [5, 71, 72, 73, 74], poucos deles referem-se a exsudatos [75, 76], e neste caso os dados se limitam a PCR. Há uma completa ausência de dados para SAA. Este trabalho pode servir como embasamento para trabalhos futuros onde se avaliaria a possibilidade de usar as proteínas de fase aguda de exsudatos para diagnósticos específicos ou como marcadores da progressão da doença, além de adicionar novas informações sobre o papel biológico destas proteínas.

A principal função conhecida para a PCR é a propriedade de se ligar a fosfatidilcolina e assim reconhecer os patógenos [77]. Ela pode ativar o sistema complemento e também pode se ligar em células fagocíticas [78]. As funções biológicas da SAA incluem o *priming* de neutrófilos [38], indução da síntese de citocinas [36, 39, 40] e migração celular [21]. A informação de que PCR e SAA estão presentes em exsudatos, vista nesse estudo, dá suporte à idéia de que

essas proteínas têm um papel essencial na ativação da resposta imune e/ou no reparo tecidual. É importante notar que a concentração de SAA em exsudatos é apenas 10 % da presente no soro. No entanto essa concentração é suficientemente alta para engatilhar os efeitos biológicos descritos para essa proteína [36, 38 39, 40, 79].

8.2.2. HDL como transportador da SAA para o sítio inflamatório

Dentre os analitos determinados em soro e exsudato os que apresentaram maior variação foram a PCR e SAA. Entretanto variações menores também puderam ser observadas para os demais (tabela I). Como mencionado anteriormente, esta variação era esperada e provavelmente reflete as diferentes fases da doença inflamatória. Estas variações também estão refletidas no amplo intervalo das relações exsudato/soro para apo A-I, apo A-II, apo B, colesterol, triglicérides, IL-1 β , IL-8 and TNF- α (tabela II).

A análise soro *versus* exsudato para os lipídeos e apolipoproteínas, mostrou, além da já mencionada correlação para SAA e PCR, correlação para apo A-I e colesterol (tabela IV e figura 14). Para os demais analitos não houve correlação.

Tabela IV: Coeficiente de correlação entre as dosagens realizadas nas amostras de soro e exsudato

Correlação entre soro e líquido	Coeficiente de correlação	
	(<i>r</i>)	<i>p</i>
Apo A-I	0,54511	0,0015
Apo A-II	0,49737	0,0044
Apo B	0,3800	0,0319
IL-1 β	-0,1062	0,6556
IL-8	-0,1832	0,3237
TNF- α	0,4107	0,0414
Colesterol	0,5072	0,0030
Triglicérides	0,4642	0,0074

Figura 14: **A:** Correlação entre colesterol de soro e exsudato ($r = 0,50719$; DP = 30,44; $p = 0,007$). **B:** Correlação entre triglicérides de soro e exsudato ($r = 0,4642$; DP = 20,39; $p < 0,0001$). **C:** Correlação entre Apo A-I de soro e exsudato ($r = 0,54511$; DP = 10,23; $p < 0,0001$). **D:** Correlação entre Apo B de soro e exsudato ($r = 0,3869$; DP = 15,43; $p < 0,0001$). **E:** Correlação entre Apo A-II de soro e exsudato pleural ($r = 0,49737$; DP = 3,03; $p = 0,75$).

A correlação entre exsudato e soro observada para colesterol mas não para triglicérides confirma os dados de Vaz et al. [80]. É notável que para as apolipoproteínas, a correlação somente possa ser observada para SAA (figura 13 A) e Apo A-I, mas não para Apo B e Apo A-II. A razão para isto não é clara.

Em seqüência, quando avaliamos a correlação entre dois analitos no mesmo compartimento (soro ou exsudato), encontramos correlação somente entre Apo A-I e Apo A-II (tabela V e figura 15)

Tabela V: Coeficiente de correlação para as dosagens realizadas nas amostras de soro e exsudatos

Correlação	Coeficiente de correlação	
	soro (<i>r</i>)	exsudatos (<i>r</i>)
SAA x Apo A-I	-0,1436	0,1684
SAA x Apo B	0,2764	0,4028
SAA x Apo A-II	-0,0261	0,2949
SAA x IL-1 β	-0,0714	-0,1081
SAA x IL-8	-0,2973	0,6767
	<i>p</i> = 0,1042	<i>p</i> < 0,0001
SAA x TNF- α	0,1166	0,1166
Apo A-I x Apo A-II	0,8936	0,5795
	<i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> = 0,00185
Apo A-I x Apo B	0,2643	0,2731
Apo A-II x Apo B	0,3125	0,6152

Figura 15: Correlação entre Apo A-I e Apo A-II nas amostras de soro (A) e exsudato (B) dos pacientes (Soro: $r = 0,8936$; DP = 2,4981; $p < 0,0001$; exsudato: $r = 0,5795$; DP = 2,9545; $p = 0,1073$)

A correlação no soro foi maior que no exsudato, mas em ambos, soro e exsudato, há uma correlação positiva entre Apo A-I e apo A-II (figura 15). Embora Apo A-I e Apo A-II possam estar presentes em outras lipoproteínas que não a HDL, quando comparadas com a HDL, elas estão presentes em concentrações muito baixas. Por esta razão, podemos considerar a Apo A-I e Apo A-II apolipoproteínas quase que exclusivas da HDL. Apo A-II está presente na HDL3 e apo A-I está presente na HDL2 e na HDL3 [11]. Assim, a co-localização destas apolipoproteínas poderia explicar a correlação observada na figura 15. É importante notar que embora a correlação seja observada em ambos, soro e exsudato, a inclinação da reta calculada é diferente para soro ($a = 1,69368$; $b = 0,16371$) e exsudato ($a = 1,36432$; $b = 0,16818$) indicando que a passagem de Apo A-I para a cavidade é menor que a passagem de Apo- A-II, ou então, que a proteólise da Apo A-I ou sua associação com células é maior quando comparada com Apo A-II.

Analizamos a correlação existente entre exsudato e soro das relações das apolipoproteínas: SAA/Apo A-I, SAA/Apo B, SAA/Apo A-II, Apo A-I/ Apo A-II, Apo

A-I/Apo B e Apo A-II/Apo B (figura 16). Esta análise teve a proposta de estimar a contribuição da passagem dessas apolipoproteínas do soro para a cavidade pleural e o processo de *clearance* das proteínas na cavidade pleural. O *clearance* é o resultado de processos tais como proteólise ou associação com células. A correlação foi observada para todas as relações exceto para a relação Apo A-I/Apo A-II. A ausência de correlação entre soro e exsudato para a relação Apo A-I/Apo A-II era esperada, uma vez que houve correlação entre Apo A-I e Apo-AII tanto no soro quanto no exsudato (ver figura 15).

Figura 16: **A:** Relação entre SAA/Apo A-I de soro e exsudato ($r = 0,66955$; DP = 2,015; $p < 0,0001$) **B:** Relação entre SAA/Apo B de soro e exsudato ($r = 0,70057$; DP = 1,15; $p < 0,0001$) **C:** Relação entre SAA/apo A-II de soro e exsudato ($r = 0,72382$; DP = 3,004; $p < 0,0001$) **D:** Relação entre Apo A-I/Apo A-II de soro e exsudato ($r = 0,28391$; DP = 1,159; $p < 0,0001$) **E:** Relação entre Apo A-I/apo B de soro e exsudato ($r = 0,76917$; DP = 0,255; $p < 0,0001$). **F:** Relação entre Apo A-II/apo B de soro e exsudato ($r = 0,55739$; DP = 0,0085; $p < 0,0001$).

Da análise das correlações na figura 16 e, considerando que apo A-II está localizada na mesma partícula da SAA, que é a HDL3, nós concluímos que: (i) a passagem de Apo A-II do soro para o exsudato é maior que a passagem de Apo B e ApoA-I, e (ii) considerando que a passagem para a cavidade pleural da SAA é igual a Apo A-II (elas estão na mesma fração da HDL), o *clearance* da SAA da cavidade é maior que o das outras apolipoproteínas. A partir dos nossos dados estimamos que a quantidade de SAA na cavidade é de apenas aproximadamente 10 % daquela encontrada no soro. Sabe-se que leucócitos se associam com a SAA. Ela se associa com alta afinidade ao receptor FPRL1, presente em neutrófilos e monócitos [81]. Também é esperado que a SAA sofra proteólise, pois fragmentos de SAA foram encontrados em líquidos inflamatórios, tais como o líquido sinovial de pacientes com artrite [82].

Por último, tentamos correlacionar a presença da SAA com marcadores inflamatórios. Escolhemos IL-1 β , IL-8 e TNF- α como marcadores. Como pode ser visto nas tabelas I e II, a média da concentração dessas citocinas tanto em soro quanto em exsudatos é muito alta (muito maiores do que os valores de referência). Além disso, não há correlação entre soro e exsudato para essas citocinas (tabela IV). Quando analisamos essas citocinas com SAA, encontramos correlação apenas para IL-8 em exsudato (figura 17). O fato de que a correlação foi observada em exsudato mas não em soro encontra suporte de resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa que mostraram que a SAA quando associada com a HDL (condição presente no soro) não estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias de neutrófilos humanos, enquanto a SAA livre atua como um estímulo potente para a expressão e a liberação de citocinas pró-inflamatórias [36, 83]. Entre as citocinas testadas *in vitro*, observamos que IL-8 é a mais induzida quando comparada com TNF- α e IL-1 β . A potente estimulação de IL-8 por SAA pode ser a razão para o fato de que encontramos correlação somente de SAA com IL-8.

Figura 17: **A:** Correlação entre SAA e IL-8 de soro ($r = -0,29736$; $DP = 367,19718$; $p = 0,10426$). **B:** Correlação entre SAA e IL-8 de exsudatos ($r = 0,67675$; $DP = 592,50292$; $p < 0,0001$).

Exceto pelo nosso estudo que mostrou que SAA, assim como ocorre com a PCR, passa para a cavidade inflamatória, há uma completa ausência de dados para SAA em exsudatos humanos. Além da possibilidade de usar a SAA em diagnósticos específicos e como marcador da progressão da doença, há, pelo menos, dois pontos particularmente importantes que são tratados nesse estudo. O primeiro ponto está relacionado à passagem da SAA para a cavidade inflamatória comparado com as outras apolipoproteínas. E, o segundo ponto, é o papel biológico da SAA na cavidade. Certamente, esses dois pontos informam sobre a biologia da SAA e contribuem para a elucidação do mecanismo de ação da SAA.

Um ponto chave da análise de nossos dados é o fato de que a SAA associada a HDL tem uma característica anti-inflamatória. Assim, SAA-HDL diminui a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos ativados quando comparado a HDL [83]. O mesmo padrão foi observado para a liberação de citocinas, que é, a SAA associada a HDL não estimula a liberação de citocinas, e ainda reduz a liberação de citocinas induzidas por LPS. Este dado levou alguns autores a considerar que a SAA era uma proteína envolvida no reparo tecidual e que contribuíria para a diminuição da inflamação. Esta primeira idéia deve ser

abandonada quando se considera que a proteína, por ela mesma, é um potente ativador de células imune.

Em uma visão geral, os dados desse estudo amparam nossa hipótese inicial de que a partícula de HDL é um reservatório e um transportador da SAA para os sítios inflamatórios: (i) a partícula de HDL tem mais acesso ao sítio inflamatório que as outras lipoproteínas; (ii) a perda da integridade da HDL na cavidade [80] garantiria que a SAA não associada a HDL poderia exercer seus efeitos biológicos; (iii) o elevado *clearance* de SAA comparado as outras lipoproteínas indica que a SAA ou seus fragmentos se associam à células.

In vitro, as funções biológicas da SAA incluem o *priming* de neutrófilos [38], a indução da síntese de citocinas [36, 39, 40] e migração celular [21]. A presença da SAA nos exsudatos revelada por esse estudo suporta a idéia de que essas proteínas desempenham um papel fundamental na ativação da resposta imune. É importante notar que, embora a concentração de SAA nos exsudatos é aproximadamente 10 % da SAA presente no soro, esta concentração é suficientemente alta para engatilhar os efeitos biológicos descritos para essa proteína [36, 38, 39, 40, 79]. Concentrações tão baixas como 0,4 µg/mL são suficientes para ativar a liberação de IL-8 por células inflamatórias. A concentração de SAA observada nos exsudatos é muito maior do que isso. Da correlação entre IL-8 e SAA nos exsudatos, nós concluímos que a atividade biológica da SAA *in vivo* é pró-inflamatória.

Concluindo, adicionamos uma nova perspectiva no conhecimento das funções biológicas da HDL que vai além do metabolismo das lipoproteínas e compreende a regulação imune. O mesmo pode ser dito para a biologia da SAA. No momento, estamos focando nosso estudo em doenças crônicas onde há um leve mas permanente aumento da concentração plasmática de SAA, como no caso do diabetes, em que a SAA pode sustentar uma condição pró-inflamatória importante para a progressão da doença.

É razoável supor que a permeabilidade das diferentes lipoproteínas ao foco inflamatório mantenha alguma relação com seu tamanho médio. Assim, espera-se que haja uma passagem crescente para as lipoproteínas VLDL (25-70 nm), LDL (19-23-nm), HDL (4-12 nm) [8], ou seja, a permeabilidade da membrana deve ser maior para as partículas menores de lipoproteínas.

A apo B está presente nas LDL e VLDL, mas ausente na HDL, assim foi utilizada como proteína marcadora da passagem de lipoproteínas que não a HDL. As apo A-I e apo A-II estão presentes majoritariamente na HDL e definem as duas subclasses da HDL, ou seja, a HDL₂ é composta quase que exclusivamente por apo A-I, enquanto que a HDL₃ é composta por ambas, apo A-I e apo A-II [11]. Ao analisarmos as concentrações e razões entre diferentes analitos nos compartimentos soro e cavidade pleural, objetivamos avaliar a passagem destes pelas membranas vizinhas ao foco inflamatório.

Em experimentos *in vitro* foi descrito que proteases de neutrófilos são responsáveis por aproximadamente 25% da fragmentação da apo A-I, enquanto que o sistema MPO/H₂O₂ seria responsável por 50% da fragmentação dessa proteína [63]. Como apo A-I é passível de oxidação e fragmentação, o mesmo poderia ocorrer com apo A-II. Assim, de uma forma geral poderíamos visualizar esse processo da seguinte maneira (figura 18):

Pe = permeabilidade

SL = síntese local

PL = proteólise

A = associação com células

Figura 18: Fatores que contribuem para a concentração de proteínas no exsudato pleural.

Onde:

$$[\text{proteína}]_{\text{exsudato}} \propto ([\text{proteína}]_{\text{soro}} \times \text{Pe}) + \text{SL} - \text{PL} + \text{A}$$

Podemos dizer que as proteínas totais apresentam uma grande passagem pela membrana que recobre a cavidade pleural. A apo B e a apo A-I apresentaram

passagens semelhantes, apesar da diferença de tamanho das partículas das lipoproteínas onde estas apolipoproteínas estão presentes. O quadro abaixo (figura 19) esquematiza de forma sumária os achados deste trabalho e os coloca no contexto da formação do exsudato.

Figura 19: Figura representativa da passagem das apolipoproteínas ao foco inflamatório.

8.3 Oxidação da HDL e de suas apolipoproteínas AI e SAA por peroxidases/H₂O₂

Os neutrófilos são fundamentais como primeira linha de defesa frente a uma infecção. No foco inflamatório estas células degranulam e liberam o seu conteúdo de MPO. Essa enzima catalisa a formação de HOCl a partir de H₂O₂ e Cl⁻. HOCl é um potente agente microbicida, entretanto, a sua formação está relacionada com alguns efeitos deletérios ocorridos durante o processo inflamatório. Nesse sentido, a MPO poderia catalisar a cloração de proteínas e a oxidação de lipídeos e proteínas [59, 60].

Neste sentido, alguns estudos mostraram que as apolipoproteínas podem ser alvo da ação do HOCl. Dentre os aminoácidos presentes nestas proteínas o triptofano e a tirosina podem ser alvo desse oxidante [63]. Produtos resultantes da oxidação da cadeia lateral de aminoácidos são, assim, utilizados como marcadores do dano oxidativo de proteínas *in vivo* [54]. Fluorescência tem sido uma técnica útil na determinação do produto de oxidação do triptofano e da tirosina [84]. Um dos produtos da oxidação do triptofano é a *N*-formilquinurenina (NFK) e da tirosina é a ditirosina ($\lambda_{exc}=325\text{nm}$ e $\lambda_{em}=420\text{nm}$) [84, 85].

Imaginado a HDL como um dos alvos potenciais da ação de EROs e MPO no foco inflamatório, avaliamos a oxidabilidade das apolipoproteínas A-I e SAA. Utilizamos o sistema HRP/H₂O₂ (1 μM /1mM) para mimetizar a ação de MPO num sistema *in vivo*. Aqui, avaliamos modificações eletroforéticas da apo AI (Figura 20) e o aparecimento de fluorescência (Figura 21) quando HDL é incubada com HRP/H₂O₂.

Figura 20: SDS-PAGE de amostras de HDL, HDL oxidada com HRP/H₂O₂ (1mM/1μM)/30 minutos/37°C e HDL delipidada. O perfil das amostras foi comparado com um padrão de peso molecular (1º coluna) e o padrão de Apo AI (2º coluna).

Figura 21: Cinética de oxidação da HDL pelo sistema HRP/H₂O₂ (1μM/1mM)/37°/20 minutos. **A:** (λ_{exc}=325nm e λ_{em}=420nm). **B:** (λ_{exc}=290nm e λ_{em}=323nm).

Como pode ser observado na figura 20, o tratamento da HDL com HRP/H₂O₂ (1mM/1μM) durante 30 minutos/37°C, diminuiu o conteúdo de apo A-I além de causar um pequeno deslocamento de banda quando comparada com o padrão de apo A-I. Também pode ser observado a formação, ainda que pequena,

de um produto fluorescente na região da NFK e o decaimento da fluorescência devido ao desaparecimento de triptofano ou tirosina na HDL (respectivamente, figuras 21 A e 21 B).

Para verificar o efeito do sistema de HRP/H₂O₂ sobre as apolipoproteínas da HDL, delipidamos a partícula e submetemos ao mesmo tratamento (figuras 22 A e 22 B). Verificamos que quando a partícula não possui lipídeos, a oxidação parece ser mais eficiente, pois os aminoácidos das proteínas da HDL podem estar mais acessíveis à enzima.

Figura 22: Cinética de oxidação da HDL delipidada pelo sistema HRP/H₂O₂ (1μM/1mM)/37°/30 minutos. **A:** (λ_{exc} =325nm e λ_{em} =420nm). **B:** (λ_{exc} =290nm e λ_{em} =323nm).

Avaliamos o efeito deste sistema oxidativo (HRP/H₂O₂) sobre a SAA (figura 23). Neste caso, acompanhamos o processo oxidativo por um mais de 3 horas. Observamos um pequeno aumento de fluorescência na região de 420 nm no período total de análise (região correspondente a NFK e ditirosina). Esse aumento de fluorescência pode indicar a oxidação da proteína pelo sistema HRP/H₂O₂, e dessa maneira, indicar que a SAA pode ser um dos possíveis alvos de agentes oxidantes no foco inflamatório.

Figura 23: *Scan* da emissão de fluorescência oxidação da SAA (1 mM de Trp) pelo sistema HRP/H₂O₂ (1 μM/1 mM)/37°/3h40 minutos (λ_{exc} =325nm e λ_{em} =420nm).

Numa análise preliminar visando avaliar a oxidação de proteínas no foco inflamatório, determinamos, através de fluorimetria, a presença de material fluorescente em exsudatos pleurais filtrados. A fluorescência do exsudato foi pareada com a fluorescência do soro do mesmo paciente. A figura 24 correlaciona estas fluorescências e nela observamos um acréscimo significativo da fluorescência do exsudato dos pacientes (teste T, $p = 0,028$).

Figura 24: Fluorescência de soros e exsudatos pleurais ($\lambda_{exc}=325\text{nm}$ e $\lambda_{em}=420\text{nm}$) de 11 pacientes (pacientes 1 a 11, para ver o perfil de cada paciente, consultar os anexos 4 e 5). Esses dados representam a fluorescência de cada amostra em 420 nm.

8.3.1 Atividade biológica de SAA oxidada *in vitro*

Como mencionado previamente a SAA é um potente estímulo para a liberação de citocinas pró-inflamatórias de neutrófilos. Como esta proteína pode ser umas das proteínas oxidadas no foco inflamatório, quisemos avaliar qual seria o impacto da oxidação da SAA sobre sua atividade biológica. Para tanto oxidamos SAA com HRP/ H_2O_2 e avaliamos a liberação de IL-8 por neutrófilos mantidos em cultura. Na figura 25 podemos observar que a liberação de IL-8 promovida por SAA é parcialmente inibida pela incubação com HRP/ H_2O_2 (inibição de 25,6 % da atividade da SAA). Este efeito não se deve a nenhum dos outros componentes do sistema oxidativo como mostram os controles da reação.

Figura 25: Efeito da SAA, SAA + HRP/H₂O₂ e seus controles sobre a liberação de IL-8 por neutrófilos humanos em cultura de 18 horas. Esses dados representam a média de 4 experimentos $\pm$ EP (em duplicata), analisados pelo teste de Student Newman Keuls, $p < 0,05$.

HRP, H₂O₂ e HRP/H₂O₂, na concentração analisada (1 μ M e 1 mM para HRP e H₂O₂ respectivamente), não afetam significativamente a produção basal de IL-8 por neutrófilos (Figura 25). Entretanto, em neutrófilos ativados com SAA, a liberação de IL-8 é estimulada, como previamente descrito [36]. A liberação de IL-8 é parcialmente inibida pela incubação com HRP/H₂O₂, e este efeito não se deve a nenhum dos outros componentes do sistema oxidativo como mostram os controles da reação. Ainda que preliminar este estudo indica que pode haver um controle da atividade de proteínas presentes nos exsudatos pleurais através de sua oxidação.

A oxidação de apolipoproteínas via MPO tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores, pois esse processo pode estar envolvido em algumas doenças, como é o caso da arteriosclerose. Nesse contexto, estudamos a

oxidação das apolipoproteínas da HDL em um sistema peroxidásico semelhante a MPO, mas onde não há a formação de HOCl, que é o sistema HRP/H₂O₂.

Dentre os aminoácidos oxidados nestas proteínas, centramos nossa atenção no triptofano e na tirosina. Verificamos que o sistema HRP/H₂O₂ é um sistema capaz de oxidar esses aminoácidos em proteínas da HDL, assim como já havia sido descrito para a MPO.

Através da eletroforese (figura 20) verificamos uma modificação na banda correspondente a HDL oxidada e, através da fluorescência, observamos um decréscimo da intensidade relativa de fluorescência para resíduos de triptofano na HDL e na HDL delipidada (figuras 21 B e 22 B). Essa diminuição de fluorescência foi confirmada pelo aumento de um produto da oxidação desse aminoácido o (NFK) ou do aminoácido tirosina (ditirosina).

Esses dados em conjunto podem indicar que o processo de oxidação de proteínas via MPO no foco inflamatório pode ocorrer independentemente da presença de HOCl. Dessa maneira, esta seria uma via secundária da oxidação de biomoléculas. SAA é um alvo possível de oxidação. Esta proteína possui três resíduos de triptofano e cinco resíduos de tirosina. A oxidação desses resíduos é que leva ao aumento da fluorescência na região de 420 nm quando a proteína é posta em contato com HRP/H₂O₂ (Figura 23). A oxidação de proteínas pode ser um processo de modificação pós-translacional importante na modulação de atividade. Assim, pode-se pensar que proteínas podem ter sua atividade modificada pelo meio inflamatório. Apesar da amostragem limitada, observamos preliminarmente que proteínas de baixo peso molecular presente em exsudatos possuem maior fluorescência a 420 nm do que proteínas de baixo peso molecular presente em amostras correspondentes de soro (Figura 24). Este dado nos parece bastante importante e deverá ser ampliado em estudos futuros.

Em relação ao efeito da oxidação sobre a atividade da SAA observamos que há uma diminuição da liberação de IL-8 em relação ao controle. A principal função da IL-8 é a capacidade de atrair leucócitos (quimiotática). Assim, podemos imaginar que a oxidação de SAA, de ocorrência passível no foco inflamatório, pode representar parte de um mecanismo de regulação da inflamação. A oxidação

da SAA poderia interferir na sua atividade, ou seja, diminuir a liberação de IL-8 e a resposta quimiotática e, finalmente, delimitar o processo inflamatório.

9. Conclusões

Apesar da proteína SAA estar aumentada em todas as situações inflamatórias, a sua atividade biológica permanece incerta. Recentemente podemos contribuir para a compreensão do papel biológico desta proteína mostrando que ela ativa a liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de neutrófilos e monócitos. Restava mostrar que esta atividade poderia também ser observada *in vivo*. Para isso, demosmos primeiramente que SAA está presente em exsudatos pleurais, como avaliado por eletroforese, HPLC e *immunoblotting*. A utilização destas técnicas foi importante tanto para validar a utilização do ELISA de SAA em exsudatos quanto para caracterizar padrões de comportamento eletroforético e cromatográfico desta proteína.

O padrão bioquímico dos exudatos mostra claramente que: i) as correlações entre exudato e soro para as apolipoproteínas indicam que há uma passagem preferencial da HDL para o foco inflamatório, ii) a SAA é liberada da HDL no foco inflamatório, iii) a concentração de SAA nos exudatos pleurais é suficiente para induzir a liberação de citocinas inflamatórias de leucócitos ali presentes, iv) há uma correlação positiva entre concentração de SAA no exudato e IL-8, uma das citocinas pró-inflamatórias que definem a progressão e severidade da doença.

Proteínas presentes no foco inflamatório estão sujeitas à oxidação em decorrência da presença de EROs e MPO nesse meio. Apesar de oxidabilidade de resíduos de triptofano e tirosina da SAA ser relativamente baixo demonstrada pela técnica de fluorescência, há o comprometimento da atividade de SAA quando esta é oxidada pelo sistema HRP/H₂O₂.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 McCormack, C.C.; Hobson, A.H.; Doyle, S.; Jackson, J.; Kilty, C.; Whitehead, A.S. Generation of soluble recombinant human acute phase serum amyloid A2 (A-SAA2) protein and its use in development of a A-SAA specific ELISA. **Journal of Immunological Methods**. 1996, v. 198, p. 101-110.
- 2 Steel, D.M.; Whitehead, A. The major acute phase reactantes: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today**. 1994, v. 15, n. 2, p. 81-88.
- 3 Ramadori, G.; Sipe, J.D.; Dinarello, C.A.; Mizel, S.B.; Colten, H.R. Pretranslational modulation of acute phase hepatic proteins synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. **J. Exp. Med.** 1985, v. 162, p. 930-942.
- 4 Preciado-Patt, L.; HersHKoviz, R.; Fridkin, M.; Lider, O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4⁺ T cells. **The Journal of Immunology**. 1996, v. 156, p. 1189-1195.
- 5 Lannergård, A.; Larsson, A.; Kraghsbjerg, P.; Friman, G. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 2003, v. 63, p. 267-272.
- 6 Preciado-Patt, L.; Levartowsky, D.; Prass, M.; HersHKoviz, R.; Lider, O.; Fridkin, M. Inhibition of cell adhesion to glycoproteins of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. Toward understanding the physiological role of an enigmatic protein. **Eur. J. Biochem.** 1994, v. 223, p. 35-42.
- 7 Gatt, M.E.; Urieli-Shoval, S.; Preciado-Patt, L.; Fridkin, M.; Calco, S.; Azar, Y.; Matzner, Y. Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. **J. Lab. Clin. Med.** 1998, v. 132, p. 14-20.
- 8 Kaplan, A.; Jack, R.; Opheim, K.E.; Toivola, B.; Lyon, A.W. **Clinical Chemistry - Interpretation and Techniques**. 1995, 4^o edição, Williams and Wilkins, Malvern, PA, EUA, p. 219-250.
- 9 Kaplan, L.A. e Pesce, A.J. **Clinical Chemistry – Theory, Analysis, Correlation**. 1996, 3^o edição, Mosby, St. Louis, Missouri, EUA, p. 650-654.

- 10 Cheung, M.C. Characterization of apolipoprotein A-containing lipoproteins. **Methods in Enzymology**. 1986, v. 129, p. 130-145.
- 11 Schaefer S.J. e Ordovas, J.M. Metabolism of apolipoprotein A-I, A-II e A-IV. **Methods in Enzymology**. 1986, v. 129, p. 420-443.
- 12 Lee, M.; Uboldi, P.; Giudice, D.; Catapano, A.L.; Kovanen, P.T. Identification of domains in apoA-I susceptible to proteolysis by mast cell chymase: implications for HDL function. **Journal of Lipid Research**. 2000, v.41, p. 975-984.
- 13 Durbin, D.M. e Jonas, A. Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. **Journal of Lipid Research**. 1999, v. 40, p. 2293-2302.
- 14 Brewer, H.B.; Ronan, R.; Meng, M. e Bishop, C. Isolation and characterization os apolipoprotein A-I, A-II, and A-IV. **Methods in Enzymology**. 1986, v.128, p. 223-246.
- 15 <http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam?P02652,24,100>. Consulta em 15 de novembro de 2004.
- 16 Weng, W.; Brandenburg, N.A.; Zhong, S.; Halkias, J.; Wu, Lin; Jiang, X.; Tall, A.; Breslow, J.L. Apo A-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase: studies in apo A-II and hepatic lipase double knockout mice. **Journal of Lipid Research**. 1999, v.40, p. 1064-1070.
- 17 Ancsin, J.B.; Kisilevsky, R. The heparin/heparan sulfate-binding site on apo-serum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p. 7172-7181, 1999.
- 18 Wang, L.; Lashuel, H.A.; Walz, T.; Colón, W. Murine apolipoprotein serum amyloid A in solution forms a hexamer containing a central channel. **PNAS**. 2002, v. 99, n. 25, p. 15947-15952.
- 19 Artl, A.; Marsche, G.; Lestavel, S.; Sattler, W.; Malle, E. Role of serum amyloid a during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. 2000, v. 20, p. 763-772.
- 20 Smith, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**. 1994, v. 56, p. 672 – 686.

- 21 Urieli-Shoval, S.; Linke, R.P.; Matzner, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current Opinion in Hematology**. 2000, v.7, p. 64-69.
- 22 Pizzini, C.; Mussap, M.; Plebani, M.; Fanos, V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. **Scand. J. Infect. Dis.** 2000, v. 32, p. 229-235.
- 23 Godenir, N.L.; Jeenah, M.S.; Coetzee, G.A.; Van der Westhuyzen, D.R.; Strachan, A.F.; De Beer, F.C. Standardisation of the quantitation of serum amyloid A protein (SAA) in human serum. **Journal of Immunological Methods**. 1985, v.83, p.217-225.
- 24 Syversen, P.V.; Saeter, U.; Cunha-Ribeiro, L.; Ørvim, U.; Sletten, K.; Husby, G.; Sakariassen, K.S. The effect of serum amyloid protein A fragment-SAA 25-76 on blood platelet aggregation. **Thrombosis Research**. 1994, v. 76, n. 3, p. 299-305.
- 25 Cabana, V.G.; Reardon, C.A.; Wei, B.; Luckens, J.R.; Getz, G.S. SAA-only HDL formed during the acute phase response in apoA-I^{+/+} and apoA-I^{-/-} mice. **Journal of Lipid Research**. 1999, v. 40, p. 1090-1103.
- 26 Kiernan, U.A.; Tubbs, K.A.; Nedelkov, D.; Niederkofler, E.E.; Nelson, R.W. Detection of novel truncated forms of serum amyloid A protein in human plasma. **FEBS Letters**. 2003, v.537, p. 166-170.
- 27 Miida, T.; Yamada, T.; Yamadera, T.; Ozaki, K.; Inano, K.; Okada, M. Serum amyloid A protein generates pre β 1 high-density lipoprotein from α -migrating high-density lipoprotein. **Biochemistry**. 1999, v. 38, p. 16958-16962.
- 28 Pepys, M.B.; Baltz, M.L. Acute Phase Proteins. **Adv. Immunology**. 1983, v. 34, p. 190-212.
- 29 Steel, M.; Rogers, J.T.; DeBeer, M.C.; DeBeer, F.C.; Whitehead, A.S. Biosynthesis of human acute-phase serum amyloid A protein (A-SAA) *in vitro*: the roles of mRNA accumulation, poly(A) tail shortening and translational efficiency. **Biochem. J.** 1993, v. 291, p. 701-707.

- 30 Banka, C.L.; Yuan, T.; de Beer, M.C.; Kindy, M.; Curtiss, L.K.; de Beer, F.C. Serum amyloid A (SAA) : influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. **Journal of Lipid Research**. 1995, v.36, p. 1058-1065.
- 31 Pruzanski, W.; Stefanski, E.; DeBeer, F.C.; DeBeer, M.C.; Ravandi, A.; Kuksis, A. Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**. 2000, v. 41, p. 1035-1047.
- 32 Badolato, R.; Wang, J.M.; Murphy, W.J.; Lloyd, A.R.; Michiel, D.F.; Bausseman, L.L.; Kelvin, D.J.; Oppenheim, J.J. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. 1994, vol. 180, p.203-209.
- 33 Xu, L.; Badolato, R.; Murphy, W.J.; Longo, D.L.; Anver, M.; Hale, S.; Oppenheim, J.J.; Wang, J.M. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. **Journal of Immunology**. 1995, vol. 155, p. 1184-1190.
- 34 Aldo-Benson, M.A.; Benson, M.D. SAA suppression of immune response *in vitro*: evidence for an effect on T cell-macrophage interaction. **The Journal of Immunology**. 1982, vol. 128, n. 6, p. 2390-2392.
- 35 Shephard, E.G.; de Beer, F.; de Beer, M.C.; Jeenah, M.S. Coetzee, G.A.; Van der Westhuyzen, D.R. Neutrophil association and degradation of normal and acute-phase high-density lipoprotein 3. **Biochem J**. 1987, v. 248, p. 919-926.
- 36 Furlaneto, C.J.; Campa, A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2000, v. 268, p. 405-408.
- 37 Linke, R.P.; Bock, V.; Valet, G.; Rothe, G. Inhibition of the burst response of N-formil peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1991, v. 176, n.3, p. 1100-1105.

- 38 Hatanaka, E.; Ribeiro, F.P.; Campa, A. The acute phase protein serum amyloid a primes neutrophils. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 2003, v. 38, p. 81-84.
- 39 Ribeiro, F.P.; Furlaneto, C.J.; Hatanaka, E.; Ribeiro, W.B.; Souza, G.M.; Cassatella, M.A.; Campa, A. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid a in neutrophils and monocytes. **Mediators of Inflammation**. 2003, v.12, p. 173-178.
- 40 Hatanaka, E.; Furlaneto, C.J.; Ribeiro, F.P.; souza, G.M.; Campa, A. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human neutrophils. **Immunology Letters**. 2004, v.91, p.33-37.
- 41 Light, R.W. Diagnostic principles in pleural disease. **Eur. Respir. J.** 1997, v. 10, p. 476-481.
- 42 Light, R.W.; MacGregor, M.I.; Luchsinger, P.C.; Ball, W.C. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. **Annals of Internal Medicine**. 1972, v. 77, p. 507-513.
- 43 Marie, C.; Losser, M.; Fitting, C.; Kermarrec, N.; Payen, D.; Cavaillon, J. Cytokines and soluble cytokines receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1997, v. 156, p. 1515 - 1522.
- 44 Pace, E.; Gjomarkaj, M.; Melis, M.; Profita, M.; Spatafora, M.; vignola, A.M.; bonsignore, G.; Mody, C. Interleukin-8 induces lymphocyte chemotaxis into the pleural space. Role of pleural macrophages. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999, v. 159, p. 1592-1599.
- 45 Romero, S.; Martinez, A.; Hernandez, L.; Fernandez, C.; Espasa, A.; Candela, A.; Martin, C. Light's criteria revisited: consistency and comparison with new proposed alternative criteria for separating pleural transudates from exudates. **Respiration**. 2000, v. 67, p. 18-23.
- 46 Romero-Candeira, S.; Hernández, L.; Romero-Brufao, S.; Orts, D.; Frenández, C.; Martín, C. Is it meaningful to use biochemical parameters to discriminate between transudative and exudative pleural effusions? **Chest**. 2002, v. 122, n. 5, p. 1524 -1529.

- 47 Horvath, L.L.; Gallup, R.; Worley, B.; Merrill, G.A.; Morris, M.J. Soluble leukocyte selectin in the analysis of pleural effusions. **Chest**. 2001, v. 120, n. 2, p. 362 - 368.
- 48 Broaddus, V.C.; Hébert, C.A.; Vitangcol, R.V.; Hoeffe, J.M.; Bernstein, M.S.; Boylan, A.M. Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. **Am. Ver. Respir. Dis.** 1992, v. 146, p. 825 - 830.
- 49 Baumann, H.; Gauldie, J. The acute phase response. **Immunology today**. 1994, v. 15, n. 2, p. 74 – 80.
- 50 Kolsuz, M.; Erginel, S.; Alatas, O.; Alatas, F.; Metintas, M.; Uçgun, E.; Çolak, O. Acute phase reactants and cytokine levels in unilateral community-acquired pneumonia. **Respiration**. 2003, v. 70, p. 615-622.
- 51 Capeillère-Blandin, C.; Gausson, V.; Descamps-Latscha, B.; Witko-Sarsat, V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2004, v.1689, p. 91-102.
- 52 Finley, E.L.; Dillon, J.; Crouch, R.K.; Schey, K.L. Identification of tryptophan oxidation products in bovine α -crystallin. **Protein Science**. 1998, v.7, p. 2391-2397.
- 53 Domingues, M.R.M.; Domingues, P.; Reis, A.; Fonseca, C.; Amado, F.M.L.; Ferrer-Correia, A.J.V. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 2003, v. 14, p. 406-416.
- 54 Stadman, E.R. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. **Methods in enzymology**. 1995, v. 258, p. 379-393.
- 55 van de Weert, M.; Lagerwerf, F.M.; Haverkamp, J.; Heerma, W. Mass spectrometric analysis of oxidized tryptophan. **Journal of Mass Spectrometry**. 1998, v. 33, p.884-891.
- 56 Jantschko, W.; Furtmüller, P.G.; Allegra, M.; Livrea, M.A.; Jakopitsch, C.; Regelsberger, G.; Obinger, C. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward

- indole derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 2002, v. 398, n. 1, p. 12-22.
- 57 Davies, M.J.; Fu, S.; Wang, H.; Dean, R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. **Free Radical Biology and Medicine**. 1999, v. 27, p. 1151-1163.
 - 58 Heyes, M.P.; Chen, C.Y.; Major, E.O.; Saito, K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. **Biochem. J.** 1997, v. 326, p. 351-356.
 - 59 Kettle, A.J.; Winterbourn, C. A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. **Biochemistry**. 2001, v. 40, p. 10204-10212.
 - 60 Kettle, A.J.; Winterbourn, C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**. 1994, v. 233, p. 502-512.
 - 61 Yang, C.; Wang, J.; Krutchinsky, A.N.; Chait, B.T.; Morrisett, J.D.; Smith, C.V. Selective oxidation in vitro by myeloperoxidase of the N-terminal amine in apolipoprotein B-100. **Journal of Lipid Research**. 2001, v. 42, p. 1891-1896.
 - 62 Panzenboeck, U.; Raitmayer, S.; Reicher, H.; Lindner, H.; Glatter, O.; Malle, E.; Sattler, W. Effects of reagent and enzymatically generated hypochlorite on physicochemical and metabolic properties of high density lipoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**. 1997, v. 272, nº 47, p. 29711-29720.
 - 63 Bergt, C.; Marsche, G.; Panzenboeck, U.; Heinecke, J.W.; Malle, E.; Sattler, W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system to oxidatively damage apolipoprotein A-I. **Eur. J. Biochem.** 2001, v. 268, p. 3523-3531.
 - 64 Cham, B.E. e Knowles, B.R. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. **Journal of Lipid Research**. 1976, v.17, 176-181.
 - 65 Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biol. Chem.** 1951, v. 193, p. 265-272.
 - 66 Kaplan, B.; Yakar, S.; Balta, Y.; Pras, M.; Martín, B. Isolation and purification of two major serum amyloid A isotypes SAA1 and SAA2 from the acute phase plasma of mice. **Journal of Chromatography Bn.** 1997, v. 704, p. 69-76.
 - 67 Millipore. Protein blotting applications guide. 1997.

- 68 Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 1968, v.21, p.77-89.
- 69 Have, R.J.; Eder, H.A.; Bragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J. Clin. Invest.** 1955, v. 34, p. 1345-1353.
- 70 Osborne Jr., J.C. Delipidation of plasma lipoproteins. **Methods in Enzymology.** 1986, v. 128, p. 213-233.
- 71 Huttunen, T.; Teppo, A-M.; Lupisan, S.; Ruutu, P.; Nohynek, H. Correlation between the severity of infectious diseases in children and the ratio of serum amyloid A protein and C-reactive protein. **Scand. J. Infect. Dis.** 2003, v. 35, p. 488-490.
- 72 Nakayama T.; Sonoda S.; Urano T. et al. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. **Clin. Chem.** 1993; v. 39, p. 293-297.
- 73 Mayer J.M.; Raraty M.; Slavin J. et al. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. **Br. J. Surg.** 2002; v. 89, p. 163-171.
- 74 Maury C.P.J. Comparative study of serum amyloid A protein and C-reactive protein in disease. **Clin. Science** 1985; v. 68, p. 233-238.
- 75 Castano Vidriales J.L.; Amores Antequera C. Use of pleural fluid C-reactive protein in laboratory diagnosis of pleural effusions. **Eur. J. Med.** 1992; v. 1, p. 201-207.
- 76 Yilmaz Turay U.; Yildirim Z.; Turkoz Y. et al. Use of pleural fluid C-reactive protein in diagnosis of pleural effusions. **Respir. Med.** 2000; v. 94, p. 432-435.
- 77 Thompson D.; Pepys M.B.; Wood S.P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocoline. **Structure** 1999; v. 7, p. 169-177.
- 78 Volanakis J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Molecular Immunol.** 2001; v. 38, p. 189-197.
- 79 Furlaneto C.A.; Ribeiro F.P.; Hatanaka E. et al. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. **Lipids** 2002; v. 37, p. 925-928.

- 80 Vaz, M.A.C.; Teixeira, L.R.; Vargas, F.S.; Carmo, A.L.; Antonangelo, L.; Onishi, R.; Light, R.W. Relationship between pleural fluid and serum cholesterol levels. **Chest**. 2001, v. 119, p. 204-210.
- 81 Su, S.B.; Gong, W.; Gao, J.L. Shen, W.; Murphy, P.M. Oppenheim, J.J.; Wang, J.M. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. **J. Exp. Med.** 1999, v. 189(2), p. 395-402.
- 82 Yavin E.J.; Preciado-Patt L.; Rosen O.; Yaron M.; Suessmuth R.D.; Levartowsky D.; Jung G.; Lider O.; Fridkin M. Serum amyloid A-derived peptides, present in human rheumatic synovial fluids, induce the secretion of interferon-gamma by human CD(4)(+) T-lymphocytes. **FEBS Lett.** 2000, v. 472(2-3), p. 259-262.
- 83 Furlaneto, C.; Campa, A. The effect *in vitro* of high-density lipoprotein from healthy and infected humans on the oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**. 1997, v.15, p. 39-45.
- 84 Jerlich, A.; Hammel, M.; Nigon, F.; Chapman, M.J.; Schaur, R.J. Kinetics of tryptophan oxidation in plasma lipoproteins by myeloperoxidase-generated HOCl. **Eur. J. Biochem.** 2000, v. 267, p. 4137-4143.
- 85 Heinecke, J.W. Li, W.; Daehnke III, H.L.; Goldstein, J.A. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**. 1993, v. 268, nº 6, p. 4069-4077.

11. ANEXOS

ANEXO 1

hospital universitário
universidade de são paulo

São Paulo, 17 de maio de 2002.

Ilmo(s). Sr(a).

Ana Campa

Rua Edéia, 191

Vila Diva – Granja Viana

06350-080 São Paulo - SP

Referente: Projeto de Pesquisa “Marcadores inflamatórios em soro e em efusão pleural: lipoproteínas e apolipoproteínas” – Cadastro: 244/01

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 17 de maio de 2002, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como APROVADO, assim como o Termo de Consentimento Pós-Informado.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais (a cada 90 dias) e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10-10-1996, inciso IX, letra “c”).

O primeiro relatório do referido projeto está previsto para 17 de agosto de 2002.

Atenciosamente,

Dr. Sérgio Gomes de Souza
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

c/cópia para a Divisão de Clínica Médica

ANEXO 2

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____
RG nº _____, declaro que após convenientemente esclarecido e tendo entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo de pesquisa **“Marcadores inflamatórios em soro e em efusão pleural: Lipoproteínas e apolipoproteínas”**, que utilizará amostras de exudato pleural (obtido de toracocentese) e de plasma. Essas amostras serão coletadas se houver indicação médica e uma alíquota será utilizada se o diagnóstico for confirmado para pneumonia aguda de origem infecciosa. Os objetivos desse estudo é avaliar a presença da apo SAA nesses líquidos e como as variações do meio interferem na associação entre a apo SAA e a HDL. Também serão avaliados nos exudatos pleurais o número de leucócitos e a distribuição diferencial; a concentração de colesterol, triglicerídeos, apo AI, apo B e apo SAA; e a correlação entre os valores de apo SAA e número de neutrófilos e da concentração de apo SAA e evolução clínica. Tendo sido devidamente esclarecido que tal participação não apresenta dano à saúde e podendo retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade de assistência.

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal

Cristiani Bürger
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Telefone: 3818-3637

ANEXO 3

Informações sobre os pacientes que participaram do estudo:

(amostras 1 – 12: pacientes do HU-USP; amostras 13 – 32: amostras HRNP – Londrina – PR)

Paciente	Sexo	Idade	Hipótese diagnóstica
1	Masculino	87	Broncopneumonia
2	Feminino	79	Pneumonia
3	Masculino	65	Pneumonia
4	Masculino	42	Tuberculose
5	Masculino	85	Pneumonia
6	Masculino	37	Broncopneumonia
7	Masculino	58	Pneumonia
8	Masculino	20	Pneumonia
9	Masculino	18	Pneumonia
10	Masculino	79	Pneumonia
11	Masculino	77	Pneumonia
12	Masculino	17	Pneumonia
13	Masculino	27	Tuberculose pulmonar
14	Masculino	42	Pneumonia; derrame pleural
15	Masculino	43	Tuberculose pulmonar; derrame pleural
16	Masculino	34	Tuberculose pulmonar; derrame pleural
17	Masculino	78	Derrame pleural
18	Masculino	77	Pneumonia
19	Masculino	25	Derrame pleural
20	Masculino	34	Pneumonia; derrame pleural
21	Masculino	39	Derrame pleural
22	Feminino	89	Pneumonia; derrame pleural
23	Masculino	59	Pneumonia; derrame pleural
24	Masculino	82	Pneumonia
25	Masculino	78	Pneumonia; derrame pleural
26	Masculino	48	Derrame pleural
27	Feminino	59	Tuberculose neopleural
28	Masculino	61	Tuberculose pulmonar
29	Masculino	48	Tuberculose pulmonar
30	Masculino	69	Ca esofágico com metástase pulmonar
31	Masculino	45	Derrame pleural
32	Feminino	61	Derrame pleural; carcinoma hepático difuso

ANEXO 4

Análise bioquímica das amostras de soro colhidas dos pacientes (pacientes 1-12: amostras HU; pacientes 13-32: amostras HRNP)

Paciente	PT (g/dL)	PCR (mg/L)	SAA (µg/mL)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	IL-1β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	Apo AI (mg/dL)	Apo B (mg/dL)	Apo AII (mg/dL)
1	5,20	135,9	209,45	136	72	-	5,71	23,73	67,2	62,6	11,3
2	8,50	114,2	295,95	170	86	-	5,04	-	81,7	78,7	11,8
3	6,20	136,8	589,60	417	310	-	7,56	41,64	102,2	189,6	19,9
4	6,20	20,3	130,40	213	147	-	155,67	-	74,9	78,9	9,1
5	5,15	15,8	26,70	185	95	-	2047,5	-	92,7	60,6	15,2
6	4,80	298,3	652,70	179	111	-	4,03	-	41,8	39,4	9,7
7	6,70	22,9	25,85	130	60	-	580,47	283,43	52,6	71,6	12,6
8	9,53	60,1	134,80	111	92	-	131,93	-	73,9	58,6	16,2
9	4,85	130,9	286,70	113	223	-	9,07	32,69	27,0	96,8	4,5
10	6,52	4,6	21,90	199	156	-	166,22	0	118,9	103,8	17,3
11	5,50	167,7	423,85	44	52	-	26,15	122,24	24,3	35,9	4,5
12	5,97	329,2	625,15	138	184	-	184,10	-	19,9	43,2	4,5
13	6,63	187,7	363,48	128	61	25,58	15,40	265,53	50	76,7	10,9
14	9,38	37,1	55,95	213	88	24,18	208,40	86,42	136	104,9	28,9
15	7,26	106,2	364,11	128	74	26,51	10,90	525,75	70,3	81,7	18,0
16	6,25	176,9	466,97	80	159	26,51	14,10	399,57	22,4	70,7	4,5
17	5,13	180,0	286,07	137	61	29,30	32,30	441,63	58,7	59,8	12,1
18	6,22	255,5	337,82	362	136	30,69	188,20	448,64	58,1	157,5	14,1
19	8,12	74,7	342,86	158	40	57,20	31,80	1163,67	75	63,8	19,8
20	7,06	426,1	1567,10	226	383	23,25	3,20	175,25	57,4	146,8	13,1
21	4,99	123,0	29,02	106	67	24,18	6,70	189,27	29,6	65,1	4,5
22	5,81	60,6	156,08	170	83	28,83	5,20	182,26	79,4	68	17,3
23	5,09	87,5	57,84	117	89	25,58	474,90	32,69	21,3	71,8	4,5
24	5,44	168,3	965,50	90	91	24,18	11,90	184,93	61,9	54	10,3
25	6,45	135,4	286,07	87	43	26,51	25,10	229,70	47,6	54,9	12,3
26	5,92	130,3	71,93	67	118	24,65	10,10	86,42	32,2	66,8	4,5
27	6,05	41,7	26,92	187	93	24,18	308,70	50,60	135	102,8	23,9
28	7,28	93,8	247,16	115	41	22,79	33,80	95,37	97,3	49,3	15,1
29	5,97	108,4	152,08	91	54	22,79	22,80	113,28	50,6	61,8	10,2
30	5,02	288,1	225,07	148	34	26,51	83,50	167,02	36,1	75	6,3
31	7,03	102,3	26,08	82	37	33,02	287,60	149,11	51,9	37,1	9,4
32	5,75	191,0	257,86	65	216	29,76	-	462,54	16,9	125,9	4,5

ANEXO 5

Análise bioquímica das amostras de líquidos pleurais colhidas dos pacientes
(pacientes 1-12: amostras HU; pacientes 13-32: amostras HRNP)

Paciente	PT (g/dL)	PCR (mg/L)	SAA (µg/mL)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	DHL (U/L)	IL-1β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	Apo AI (mg/dL)	Apo B (mg/dL)	Apo AII (mg/dL)
1	1,10	18,1	3,02	44	21,	169	-	7,56	0	19,9	24,6	4,5
2	4	12,2	0,80	76	47	40900	-	756,90	256,57	19,9	27,4	4,5
3	2,90	44,9	55,02	137	61	606	-	3502,6	113,28	24,8	36,4	5,9
4	3,70	44,9	5,76	129	52	480	-	74,80	14,77	26,0	41,9	5,5
5	2,90	4,6	2,94	102	53	233	-	14,11	-	39,6	25,9	7,0
6	3,30	168,6	55,90	70	46	4836	-	849,20	928,22	19,9	24,6	4,5
7	2,90	3,9	2,31	40	66	229	-	37,90	283,44	22,6	24,6	6,1
8	5,30	42,1	3,34	36	17	949	-	271,20	775,98	27,0	24,6	8,5
9	2,00	43,7	24,48	15	31	267	-	402,37	346,12	19,9	24,6	4,5
10	0,80	3,0	2,06	15	14	23	-	46,66	59,55	19,9	24,6	4,5
11	2,20	33,1	5,36	16	20	2466	-	432,30	-	19,9	24,6	4,5
12	4,30	148,5	61,21	46	54	10801	-	805,12	372,99	19,9	43,2	4,5
13	5,94	123,5	14,28	109	45	886	27,90	8,73	319,26	27,5	47,2	6,9
14	6,25	3,0	2,52	2	10	1074	37,20	221,50	32,69	7,7	9,3	4,5
15	6,32	28,3	2,71	66	32	288	26,97	65,60	100,58	39,2	43,4	8,9
16	4,49	65,4	13,54	25	31	481	62,79	178,90	771,10	16,9	39,4	4,5
17	2,18	22,9	5,49	19	10	80	31,62	22,01	308,44	19,3	21,2	4,5
18	3,11	8,8	4,16	34	11	276	27,90	55,33	266,38	18,8	37,7	6,4
19	5,38	6,8	4,88	69	19	200	44,65	113,80	1107,59	39,7	54,3	14,7
20	5,08	66,3	233,28	66	44	451	53,02	200,00	301,43	18,7	67,3	16,1
21	2,74	20,9	1,61	35	10	301	26,97	176,90	126,18	8	23,4	4,5
22	2,98	27,3	15,33	51	10	550	52,55	357,90	876,25	23,8	28,1	4,8
23	3,72	63,3	12,30	52	58	365	123,25	401,50	202,84	16,6	45,1	4,5
24	3,45	115,6	360,54	48	43	264	31,62	5237,5	265,53	41,1	43,3	7,4
25	3,32	39,4	7,84	15	11	165	279,06	237,40	1214,79	41,6	53,6	12,0
26	5,71	23,7	2,71	20	18	4339	1402,3	4443,5	444,63	14,5	23,1	4,5
27	4,82	15,1	1,85	67	19	379	25,11	26,70	122,24	38,6	44,8	9,5
28	4,43	23,9	4,31	59	13	293	29,76	40,00	175,97	38,2	21,2	6,9
29	5,00	56,8	31,42	43	22	511	62,32	2618,7	1178,97	29,9	26,1	5,5
30	3,05	15,2	11,84	20	8	319	30,69	89,70	95,37	16,1	12,7	4,5
31	1,81	5,4	1,72	9	8	1001	49,30	287,60	77,46	20,5	18,9	9,0
32	3,52	49,6	45,26	21	70	501	26,04	-	265,53	12,5	54,1	4,5

ANEXO 6

Celularidade e cultura das amostras de exsudatos

	Hemácias/ mm ³	Leucócitos/ mm ³	Diferencial (%)				Cultura e/ou Gram
			Neu	Linfo	Mono	Eosi	
1	-	-	-	-	-	-	Negativo
2	107	98560	100	-	-	-	Negativo
3	7168	1344	6	74	20	-	Negativo
4	837	352	15	23	62	-	Negativo
5	30000	800	35	59	9	-	Negativo
6	10000	11600	100	-	-	-	Negativo
7	11264	347	54	16	30	-	Negativo
8	720	1184	2	92	6	-	Negativo
9	-	-	-	-	-	-	Neativo
10	234	203	31	31	38	-	Negativo
11	6720	5200	90	7	3	-	Neativo
12	36260	7360	84	10	6	-	Negativo
13	26500	350	90	10	-	-	Negativo
14	683	3371	86	13	1	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>
15	1800	450	3	96	1	-	Negativo
16	597	853	64	36	-	-	Negativo
17	9813	170	57	43	-	-	Negativo
18	282	128	3	96	1	-	Negativo
19	512	5291	87	13	-	-	Negativo
20	2560	2390	73	23	4	-	Negativo
21	362	213	57	40	3	-	Negativo
22	2043	18773	97	3	-	-	Negativo
23	1380	1300	83	14	3	-	Negativo
24	210000	16000	70	25	5	-	Negativo
25	512	2389	86	13	1	-	Negativo
26	30000	525600	98	2	-	-	Gram: cocos gram positivo (++) Cultura neg
27	5720	368	6	92	2	-	Negativo
28	2645	853	3	97	-	-	Negativo
29	1109	1451	4	96	-	-	Negativo
30	10000	200	71	24	2	3	Negativo
31	60000	9900	80	19	01	-	Negativo
32	512	5291	87	13	-	-	Negativo

ANEXO 7

Relações exsudato/soro das amostras analisadas

RELAÇÕES E/S											
Pacientes	PT	PCR	SAA	CT	TG	Apo AI	Apo AII	Apo B	IL-1 β	IL-8	TNF- α
1	0,21	0,13	0,01	0,33	0,28	0,29	0,40	0,39	-	1,32	0
2	0,47	0,11	0,002	0,45	0,55	0,24	0,38	0,35	-	150,18	-
3	0,45	0,33	0,09	0,33	0,20	0,24	0,30	0,20	-	463,3	2,72
4	0,59	2,21	0,04	0,61	0,35	0,35	0,60	0,53	-	0,48	-
5	0,56	0,29	0,11	0,55	0,57	0,43	0,46	0,43	-	5,11	-
6	0,69	0,56	0,08	0,39	0,42	0,48	0,46	0,62	-	210,72	-
7	0,43	0,17	0,09	0,31	1,107	0,43	0,48	0,34	-	0,06	1,00
8	0,56	0,70	0,02	0,32	0,18	0,36	0,52	0,42	-	2,05	-
9	0,41	0,33	0,08	0,13	0,14	0,74	1,0	0,25	-	44,36	10,58
10	0,12	0,65	0,09	0,07	0,09	0,17	0,26	0,24	-	0,28	0
11	0,4	0,20	0,01	0,36	0,38	0,82	1,0	0,68	-	16,53	-
12	0,72	0,45	0,10	0,33	0,29	1,0	1,0	1,0	-	4,37	-
13	0,89	0,66	0,04	0,85	0,74	0,55	0,63	0,61	1,09	0,57	1,20
14	0,66	0,08	0,04	0,009	0,11	0,06	0,16	0,09	1,53	1,06	0,38
15	0,87	0,27	0,007	0,51	0,43	0,55	0,49	0,53	1,01	6,02	0,19
16	0,72	0,37	0,03	0,31	0,19	0,75	1,0	0,55	2,36	12,69	1,93
17	0,42	0,13	0,02	0,14	0,16	0,33	0,37	0,35	1,07	0,68	0,70
18	0,5	0,03	0,01	0,09	0,08	0,33	0,45	0,24	0,91	0,29	0,59
19	0,66	0,09	0,01	0,44	0,47	0,54	0,74	0,85	0,78	3,58	0,95
20	0,72	0,15	0,15	0,29	0,11	0,33	1,23	0,46	2,28	62,5	1,72
21	0,55	0,17	0,05	0,33	0,15	0,27	1,0	0,36	1,11	26,40	0,67
22	0,51	0,45	0,10	0,30	0,12	0,29	0,28	0,41	1,82	68,83	4,81
23	0,73	0,72	0,21	0,44	0,65	0,78	1,0	0,63	4,81	0,84	6,20
24	0,63	0,69	0,37	0,53	0,47	0,66	0,72	0,80	1,30	440,13	1,43
25	0,51	0,29	0,03	0,17	0,25	0,87	0,98	0,98	10,52	9,46	5,29
26	0,96	0,18	0,04	0,30	0,15	0,45	1,0	0,34	58,88	439,95	5,14
27	0,79	0,36	0,07	0,36	0,20	0,28	0,40	0,43	1,03	0,09	2,42
28	0,61	0,25	0,02	0,51	0,32	0,39	0,46	0,43	1,30	1,18	1,84
29	0,84	0,52	0,21	0,47	0,41	0,59	0,54	0,42	2,73	114,85	10,41
30	0,61	0,05	0,05	0,13	0,23	0,45	0,71	0,17	1,15	1,07	0,57
31	0,26	0,05	0,06	0,11	0,22	0,39	0,96	0,51	1,49	1,0	0,05
32	0,61	0,26	0,17	0,32	0,32	0,74	1,0	0,43	0,87	-	0,57

ANEXO 8

Relações entre as apolipoproteínas presentes no soro e no exsudato

Amostra	SAA/AII		AI/AII		AI/B		AII/B	
	S	E	S	E	S	E	S	E
1	18,53	0,67	5,94	4,42	1,07	0,80	0,18	0,18
2	25,08	0,17	6,92	4,42	1,03	0,72	0,14	0,16
3	29,62	9,32	5,13	4,20	0,53	0,68	0,10	0,16
4	14,32	1,04	8,23	4,72	0,94	0,62	0,11	0,13
5	1,756	0,42	6,09	5,65	1,52	1,52	0,25	0,27
6	67,28	12,42	4,30	4,42	1,06	0,80	0,24	0,18
7	2,051	0,37	4,17	3,70	0,73	0,91	0,17	0,24
8	8,320	0,39	4,56	3,17	1,26	1,09	0,27	0,34
9	63,71	5,44	6,0	4,42	0,27	0,80	0,04	0,18
10	1,26	0,45	6,87	4,42	1,14	0,80	0,16	0,18
11	94,14	1,19	5,4	4,42	0,67	0,80	0,12	0,18
12	138,92	13,6	4,42	4,42	0,46	0,46	0,10	0,10
13	33,34	2,06	4,58	3,98	0,65	0,57	0,14	0,14
14	1,935	0,56	4,70	1,71	1,29	0,82	0,27	0,48
15	20,22	0,30	3,90	4,40	0,86	0,90	0,22	0,20
16	103,77	3,00	4,97	3,75	0,31	0,42	0,06	0,11
17	23,64	1,22	4,85	4,28	0,98	0,91	0,20	0,21
18	23,95	0,65	4,12	2,93	0,36	0,49	0,08	0,17
19	17,31	0,33	3,70	2,70	1,17	0,73	0,31	0,27
20	119,62	14,48	4,38	1,16	0,39	0,27	0,08	0,23
21	6,44	0,35	6,57	1,17	0,45	0,34	0,06	0,19
22	9,02	3,19	4,58	4,95	1,16	0,84	0,25	0,17
23	12,85	2,73	4,73	3,68	0,29	0,36	0,06	0,09
24	93,73	48,72	6,00	5,55	1,14	0,94	0,19	0,17
25	23,25	0,65	3,86	3,46	0,86	0,77	0,22	0,22
26	15,98	0,60	7,15	3,22	0,48	0,62	0,06	0,19
27	1,12	0,19	5,64	4,06	1,31	0,86	0,23	0,21
28	16,36	0,62	6,44	5,53	1,97	1,80	0,30	0,32
29	14,90	5,71	4,96	5,43	0,81	1,14	0,16	0,21
30	35,72	2,63	5,73	3,57	0,48	1,26	0,08	0,35
31	2,77	0,19	5,52	2,27	1,39	1,08	0,25	0,47
32	57,3	10,05	3,75	2,77	0,13	0,23	0,03	0,08

ANEXO 9

Valores de referência (em soro)

TESTE	VALOR DE REFERÊNCIA
PT	6,4 - 8,2 g/dL
PCR	≤ 3,0 mg/L
SAA	1-10 µg/mL
CT	< 200 mg/dL → desejável 200 - 240 mg/dL → limite de risco > 240 mg/dL → alto risco
TG	30-200 mg/dL
LDH	100 - 190 U/L
IL-1β	< 0,5 pg/mL
IL-8	< 31,2 pg/mL
TNF-α	< 15,6 pg/mL
Apo AI	M: 125 – 215 mg/dL H: 110 – 205 mg/dL
Apo AII	26 – 51 mg/dL
Apo B	M: 55 – 125 mg/dL H: 55 – 140 mg/dL

ANEXO 10

The acute phase proteins serum amyloid A and C reactive protein in pleural and ascitic exudates

Alessandra Miyuki Okino, Cristiani Bürger, Jefferson R. Cardoso, Edson L. Lavado,
Ana Campa.

Journal of Clinical Pathology (submetido)

The acute phase proteins serum amyloid A and C reactive protein in pleural and
ascitic exudates

Alessandra Miyuki Okino^{1,2}, Cristiani Bürger^{2,3}, Jefferson R. Cardoso⁴, Edson L. Lavado⁴, Ana Campa².

¹Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina; ²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; ³Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, ⁴Departamento de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

Running title: SAA and CRP in human exudates

Keywords: acute phase protein, exudates, infection, inflammation, C reactive protein, serum amyloid A.

Dr. Ana Campa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo
São Paulo - CEP 05508-900
SP - Brazil
Phone (xx55-11) 3091-3637
FAX (xx55-11) 3813-2197
e-mail: anacampa@usp.br

Abstract

Aims: To evaluate whether the acute-phase protein serum amyloid A (SAA) is present in exudates and its correlation to C reactive protein (CRP).

Patients/Methods: CRP, SAA and total protein (TP) were determined in 40 exudate samples (30 pleural and 10 ascitic fluids) and respective serum samples. CRP, SAA and TP were measured, respectively, by a nephelometric assay, ELISA and a modified biuret method.

Results: Despite the great variability, the amount of SAA present in the exudate corresponded, on average, to 10% of the amount found in serum, i.e., the exudate/serum ratio (E/S) was 0.10 ± 0.12 . For comparison, the exudate/serum ratio for CRP and TP was 0.37 ± 0.36 and 0.65 ± 0.19 , respectively. There was a strong positive correlation between serum and exudate SAA concentration ($r=0.752$). This correlation was absent or weak for CRP and TP. Although SAA and CRP were strongly correlated in serum, they were only slightly correlated in exudate.

CONCLUSIONS: SAA in pleural and ascitic exudates results mainly from leakage of the serum protein via the inflamed membrane. A comparison of the E/S ratio of SAA and CRP led us to conclude that the transport of SAA to the pleural and peritoneal cavities occurs less readily than that of CRP, or that SAA proteolysis or its association with cells is more intense. Whatever the reason for the lower concentration of SAA in exudates, there was a sufficiently high concentration of

SAA to trigger the biological effects described for these proteins, i.e., the activation of immune responses and the repair of host tissues.

Introduction

C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) are acute phase proteins predominantly produced and secreted by hepatocytes.[1] Other cells including lymphocytes, monocytes and macrophages can also produce these proteins.[2] The induction of CRP and SAA synthesis is triggered by a number of cytokines, chiefly IL-6, which is released from a variety of cell types, but mainly from macrophages and monocytes at inflammatory sites.[3]

Serum CRP is widely used as a marker of inflammation and tissue injury.[4] [5] Although CRP is also found in exudates and it has been proposed for differentiating diseases, the diagnostic application of this finding has not been fully explored. For SAA, information regarding its presence and possible diagnostic use in pleural fluid is not available at all. The purpose of this study was to evaluate the presence of SAA in pleural and ascitic fluids and compare it with CRP.

Methods

SAA, PCR and TP were determined in pleural and ascitic fluids and corresponding serum samples taken from patients hospitalized in the Hospital Universitário/Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brazil). The inclusion criteria were adults with serum CRP higher than the references values ($> 3.0 \mu\text{g/mL}$) and a TP fluid:serum ratio greater than 0.5. The latter parameter was one of Light's criteria to characterize an exudate.[6] All of the patients gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (CEP 111/01) and the Ethics Committee of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Ofício CEP nº 64).

Serum and exudate samples were taken from 40 patients, 30 with pleural effusions and 10 with ascitic effusions. The pleural effusions were caused by pneumonia (21 cases), tuberculosis (7 cases) and neoplasia (2 cases), while the ascitic effusions resulted from peritoneal tuberculosis (3 cases), peritonitis (2 cases), neoplasia (2 cases), cirrhosis (2 cases), and chronic hepatitis (1 case).

The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and stored at -70°C for up to 10 months. CRP was measured by immunonephelometry, using a Beringher Nephelometer 100 Analyzer and a Dade Behring kit (Marburg, Germany). SAA was measured by ELISA, using a Tridelta PhaseTM kit (Maynooth, Co. Kildare). Total protein was measured by a modified biuret method in an automated Dimension[®] Clinical Chemistry System analyzer, using the Dade Behring (Marburg, Germany) kit.

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 9.0) program was used to carry out a distribution analysis by the Kolmogorov-Smirnov test, while the correlation coefficients were determined according to Spearman's rank-correlation test and by multiple-level regression analysis. A p value of < 0.05 was considered significant.

Results

Because the comparative analysis showed no differences in the serum and exudate concentrations of SAA, CRP and TP with respect to the origin and location of the exudate, a collective descriptive analysis of pleural and ascitic fluids was made (Table I). The concentrations of serum and exudate SAA and CRP varied over a broad interval. This variation was expected and probably reflected different phases of the inflammatory disease.

The exudate/serum ratio for CRP and SAA also varied over a broad interval (Table II). The exudates displayed, on average, 10 and 36% of SAA and CRP present in the serum, respectively. The amount of SAA and CRP in exudates sufficed to trigger the biological effects described for these proteins. In the case of SAA, for instance, 1 $\mu\text{g/mL}$ is sufficient to trigger the mRNA expression and the release of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-8 from human neutrophil cultures.[7] [8] [9]

The correlation analysis of serum and exudate for SAA, CRP and TP (Figure 1A-C), using Spearman's test, showed a stronger correlation for SAA than for CRP and TP. This positive correlation was interpreted as indicating a strong contribution of serum to the pool of SAA present in the exudate. However, the possibility of a contribution from the local synthesis of SAA to the pool of SAA in the exudate was not discarded, and probably was more significant at the lower concentrations of serum SAA.

Although SAA and CRP were highly correlated in serum, they were only slightly correlated in exudate (compare Figure 2A and 2B). The higher correlation

in serum was also evidenced by the higher CRP/SAA ratio found in exudate than in serum (Table III).

Discussion

Although several studies have investigated the serum levels of the acute phase proteins CRP and SAA in diseases [10] [11] [12] [13] [14], few have focused on the levels of these proteins in exudates.[4] [5] Indeed, there is a complete absence of data for SAA. The rationale for this study is the possibility of using exudate acute phase proteins for specific diagnoses, as markers of disease progression, and to elucidate the biological role of these proteins.

A major known function of CRP is its ability to bind phosphocholine and thus recognize foreign pathogens.[15] It can activate the complement pathway through binding to one of its ligands and can also bind to phagocytic cells.[16] The biological functions of SAA include the priming of neutrophils [17], induction of cytokine synthesis [7] [8] [9] and cell migration.[19] The presence of CRP and SAA in exudates revealed in this study support the idea that these proteins play a pivotal role in the activation of immune responses and/or in the repair of host tissues. It is important to note that the concentration of SAA in exudates is only 10% of that present in serum. However, this concentration is sufficiently high to trigger the biological effects described for this protein. [7] [8] [9] [17] [18].

SAA and CRP in the exudate may result from leakage of plasma proteins through the inflamed pleural and peritoneal membranes. Additionally, the concentration of these proteins in the exudate will also depend on the local synthesis. Alternatively, proteolysis and association or internalization by inflammatory cells will contribute to a decrease in protein concentration (Figure 3).

The synthesis of SAA in the inflammatory focus is expected. Indeed, activated monocytes express and release SAA.[20] Moreover, the proteolysis of SAA in the exudate and the association of SAA with cells is expected because: (i) fragments of SAA are present in synovial fluid of arthritic patients [21], (ii) SAA undergoes proteolysis by lysosomal enzymes of neutrophils [22], and (iii) there is a specific receptor for SAA in macrophages [23] and neutrophils.[24] These same processes occur with CRP.[25] [26] Based on the correlations found for CRP and SAA in serum (strong correlation) and in exudate (moderate correlation), we assume that these proteins cross the membrane and/or are fragmented to varying degrees, that is, the passage of CRP through membranes occurs more readily than the passage of SAA, or the proteolysis or uptake of SAA by cells is greater than that of CRP.

One implication of this study is the potential use of SAA in the characterization of exudates, as already proposed for CRP.[4] [27] Although several molecular markers have been proposed for the discrimination of exudates and transudates [28] [29], a definitive marker has not yet been found. CRP and SAA determinations are relatively simple, rapid, and inexpensive and may be useful to define the intensity and progression of the inflammatory process.[10]

Acknowledgments:

The authors thank the Brazilian research funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support of this work.

REFERENCES

1. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-54.
2. Urieli-Shoval S, Meek RL, Hanson RH, et al. Human serum amyloid A genes are expressed in monocyte/macrophage cell lines. *Am J Pathol* 1994; 145:650-60.
3. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M et al. Acute phase response of human hepatocytes: regulation of acute phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990; 12: 1179-86.
4. Yilmaz Turay U, Yildirim Z, Turkoz Y et al. Use of pleural fluid C-reactive protein in diagnosis of pleural effusions. *Respir Med* 2000; 94:432-5.
5. Castano Vidriales JL, Amores Antequera C. Use of pleural fluid C-reactive protein in laboratory diagnosis of pleural effusions. *Eur J Med* 1992; 1:201-7.
6. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC et al. Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudate and Exudate. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-13.
7. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β e interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 268: 405-8.
8. Ribeiro FP, Furlaneto CJ, Hatanaka E et al. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators Inflamm* 2003; 12:173-8.

9. Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP et al. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human neutrophils. *Immunol Lett* 2004 30; 91:33-7.
10. Nakayama T, Sonoda S, Urano T et al. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem* 1993; 39:293-7.
11. Lannergard A, Larsson A, Kraghsbjerg P et al. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63:267-72.
12. Huttunen T, Teppo AM, Lupisan S et al. Correlation between the severity of infectious diseases in children and the ratio of serum amyloid A protein and C-reactive protein. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:488-90.
13. Mayer JM, Raraty M, Slavin J et al. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89:163-71.
14. Maury CPJ. Comparative study of serum amyloid A protein and C-reactive protein in disease. *Clin Science* 1985; 68:233-38.
15. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocoline. *Structure* 1999; 7:169-77.
16. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunol* 2001; 38: 189-97.
17. Hatanaka E, Ribeiro FP, Campa A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. *FEMS Immunol Medic Microbiol* 2003; 38:81-4.

18. Furlaneto CA, Ribeiro FP, Hatanaka E et al. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. *Lipids* 2002; 37:925-8.
19. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:64-9.
20. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4:2860-67.
21. Yavin EJ, Preciado-Patt L, Rosen O et al. Serum Amyloid A-derived peptides, present in human rheumatic synovial fluids, induce the secretion of interferon- γ by human CD $_4^+$ T-lymphocytes. *FEBS Letters* 2000; 472:259-62.
22. Silverman SL, Cathcart ES, Skinner M, Cohen AS. The degradation of serum amyloid A protein by activated polymorphonuclear leucocytes: participation of granulocytic elastase. *Immunology* 1982; 46:737-44.
23. Hayat S, Raynes JG. Acute phase serum amyloid A protein increases high density lipoprotein binding to human peripheral blood mononuclear cells and an endothelial cell line. *Sand J Immunol* 2000; 51:141-6.
24. Preciado-Patt L, Herskoviz, Fridkin M et al. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD $_4^+$ T cells. *J Immunol* 1996; 156:1189-95.
25. Robey FA, Ohura K, Futaki S et al. Proteolysis of human C-reactive protein produces peptides with potent immunomodulating activity. *J Biol Chem* 1987; 262:7053-7.

26. Kuta AE, Baum LL. C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1986; 164:321-6.
27. Garcia-Pachon E, Lorca I. Diagnostic value of C-reactive protein in exudative pleural effusions. *Eur J Int Med* 2002; 13:246-49.
28. Roth BJ, O'Meara TF, Cragun WH. The serum effusion albumin gradient in the evolution of pleural effusions. *Chest* 1990; 98:546-49.
29. Valdes L, Pose A, Suarez J et al. Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 1991; 99:1097-1102.

Table I: Descriptive analysis of parameters determined in serum samples and exudate samples (n = 40).

Parameters	Serum		Exudate	
	Range	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD
SAA (μ g/mL)	20.0 – 1567.1	301.9 $\pm$ 327.6	0.8 – 360.5	31.4 $\pm$ 67.2
CRP (mg/L)	7.3 – 426.1	132.1 $\pm$ 103.8	3.0 – 168.6	39.2 $\pm$ 39.7
TP (g/dL)	3.4 – 9.5	6.2 $\pm$ 1.3	1.8 – 8.1	4.0 $\pm$ 1.4

Table II. Descriptive values for the exudate/serum ratio (E/S) for the proteins analyzed (n = 40).

Parameters	E/S	
	Interval	Mean $\pm$ SD
SAA	0.003 – 0.71	0.10 $\pm$ 0.12
CRP	0.015 – 2.21	0.36 $\pm$ 0.35
TP	0.420 – 0.98	0.65 $\pm$ 0.16

Table III. Descriptive values for the CRP/SAA ratio in serum and exudate (n = 40).

	CRP/SAA	
	Interval	Mean $\pm$ SD
serum	0.2 – 4.2	1.0 $\pm$ 1.1
exudate	0.3 – 13.0	4.4 $\pm$ 3.6

p< 0.0001 for comparisons between serum and exudate

Legend of the Figures

Figure 1: Correlation between exudate and serum for SAA(A) , CRP(B) and TP (C) in 40 patients. In A the line indicates a linear regression

Figure 2: Correlation between CRP and SAA for serum (A) and exudate (B) in 40 patients. In A the line indicates a linear regression

Figure 3. Factors affecting the concentration of a given protein in an exudate.