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

**Estudo imuno-histoquímico de β_2 -glicoproteína I em
fígado e intestino de ratos submetidos à sepse pela via
endovenosa ou associada à translocação bacteriana**

Sheila Vieira da Cruz Augustinis

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011095

Ficha Catalográfica

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

A923e Augustinis, Sheila Vieira da Cruz
Estudo imuno-histoquímico de β_2 -glicoproteína I em fígado
e intestino de ratos submetidos à sepse pela via endovenosa ou
associada à translocação bacteriana / Sheila Vieira da Cruz
Augustinis. -- São Paulo, 2005.
79p.

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

Orientador: Gomes, Lígia Ferreira

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Glicoproteína :
Imunologia I. T. II. Gomes, Lígia Ferreira, orientador.

616.0756 -9 CDD

Sheila Vieira da Cruz Augustinis

**Estudo imuno-histoquímico de β_2 -glicoproteína I em
fígado e intestino de ratos submetidos à sepse pela via
endovenosa ou associada à translocação bacteriana**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

Orientador/presidente

Sandro Rogério de Almeida

1º. examinador

Regina Maria Catarino

2º. examinador

São Paulo, 23 de setembro de 2005.

À Orientadora Lígia Ferreira Gomes

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.

A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”

Agradeço pela humildade com que me dedicou estes anos de estudo.

Aos meus Pais

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigada.

A vocês, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança, não bastaria um muito obrigada.

A vocês, que se doaram inteiros e reuniram os seus sonhos, para que muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigada.

A vocês pais, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é o que me acontece agora, quando procuro uma forma verbal de expressar a emoção que sinto.

Uma emoção que palavras dificilmente traduziriam.

Ao meu marido André

“Sempre antes de realizar um sonho, Deus resolve testar tudo aquilo que foi aprendido durante a caminhada. Ele faz isto não porque seja mau, mas para que possamos, junto com o nosso sonho, conquistar também as lições que aprendemos seguindo em direção a ele.”

DEDICATÓRIAS

A meus pais, Jacira e Valdomiro, que me apoiaram em todas as decisões e confiaram na minha capacidade, sem interrogar se este era o caminho certo;

Ao meu irmão Valdemir, minha cunhada Cristina e minha sobrinha Camille, que estiveram sempre ao meu lado e me deram a felicidade de compartilhar momentos agradáveis;

Aos meus falecidos avós, Maria e Benedito, que certamente torceram por mim em vida, para que alcançasse os meus objetivos;

Aos meus padrinhos, Maria Aparecida e Antonio, que nunca esqueceram de mim, mesmo quando eu estava distante;

Ao meu sogro João, minha sogra Vera e meu cunhado Allan, que me ajudaram a trilhar este caminho.

Em especial,

Ao meu marido André, que me estendeu a mão nos momentos difíceis e enxugou minhas lágrimas para que eu pudesse continuar...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lígia Ferreira Gomes, pelo apoio e dedicação na pesquisa, e pela amizade, que é o mais importante neste caminho que escolhemos;

As docentes, funcionários e amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, principalmente do Laboratório de Patologia e Citologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;

Ao Dr. Ivan Koh e equipe do Laboratório Experimental em Gastroenterologia Pediátrica da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP;

À Dra. Virgínia Junqueira e equipe do Laboratório de Geriatria da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP;

Ao Dr. Reinaldo Salomão e amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP;

Ao Dr. Esper Kallas e amigos do Laboratório de Imunologia do CINTERGEN da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP;

Aos Pesquisadores e amigos da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo;

Aos colegas e amigos de trabalho do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia, ANPACIT;

Às amigas Sandra, Elisângela e Clarissa, que sempre me ajudaram, tanto na vida profissional, quanto pessoal;

A todos os parentes e amigos de Tatuí que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

Finalmente,

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, que sempre foram minhas fontes inspiradoras, desde o início de tudo, pois a fé nos dá força para enfrentar os obstáculos e viver!

“O farmacêutico faz misturas agradáveis,
compõe ungüentos úteis à saúde,
e seu trabalho não terminará,
até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.”

Eclo., 38: 7-8

RESUMO

AUGUSTINIS, S.V.C. **Estudo imuno-histoquímico de β_2 -glicoproteína I em fígado e intestino de ratos submetidos à sepse pela via endovenosa ou associada à translocação bacteriana.** 2005. 79 f. Tese (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI), uma proteína circulante produzida em fígado e intestino, foi estudada no fígado e íleo de ratos durante sepse controlada (S) ou translocação bacteriana (TB) com *E. coli* R-6. A sepse foi induzida por inoculação endovenosa de 10^9 UFC/mL/100g. A TB, pelo confinamento de 10 mL 10^{10} UFC/mL, no intestino. Grupos controle receberam veículo. Após 2h, os animais foram sacrificados. β_2 GPI foi espessa nos tecidos de todos animais, em cortes fixados em metacarn e impregnados com parafina, após reação com anti- β_2 GPI amplificada com Envision-AP. O fígado mostrou dois padrões citoplasmáticos distintos. Um padrão difuso, atribuído à síntese protéica, aumentado somente no grupo S e um padrão focal, invariável. No íleo, a mucosa foi negativa; a submucosa, o endotélio sanguíneo e linfático, positivos. Esta marcação aumentou somente no grupo TB. Os resultados sugerem a participação da β_2 GPI na regulação local da resposta hepática e intestinal de fase aguda.

Palavras-chave: β_2 -glicoproteína I, imuno-histoquímica, sepse

ABSTRACT

AUGUSTINIS, S.V.C. β_2 -glycoprotein I expression in sepsis: an immunohistochemical study of rat liver and intestine following endovenous inoculation or bacterial translocation. 2005. 79 s. Thesis (Master degree), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

β_2 -glycoprotein I is a circulating protein (β_2 GPI) produced in liver and intestines. β_2 GPI was studied in liver and ileum in rats under controlled sepsis (S) or bacterial translocation (BT) with *E. coli* R-6. Sepsis was induced by endovenous inoculation with 10^9 CFU/mL/100g. BT was induced by confining 10 mL 10^{10} CFU/mL, to the intestine. Control groups received vehicle. After 2h, animals were sacrificed. Metacarn fixed, paraffin embedded tissue slices were reacted with monoclonal anti- β_2 GPI, revealed with Envision-AP and hematoxylin counterstained. All animals stained for β_2 GPI in the liver and ileum. Liver presented two distinct cytoplasm staining patterns. The diffuse pattern, ascribed to protein synthesis, increased in group S animals only. The spotted pattern was invariant. Ileum mucosa was negative, while submucosa, blood and lymphatic endothelium were positive. The ileum staining increased after TB, only. Results underline the hypothesis for locally regulated liver and intestine contribution to acute phase response modulation.

Keywords: β_2 -glycoprotein I, immunohistochemical, sepsis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da β_2 GPI apresentando cinco domínios (I-V), quatro deles típicos da família *Short Consensus Repeats* e um domínio rico em aminoácidos com carga positiva (V)..... 8
- Figura 2.** Esquema da ligação da β_2 GPI a superfícies carregadas negativamente através do quinto domínio..... 9
- Figura 3.** Padrão típico de migração da β_2 GPI em gel SDS-PAGE a 12,5% corado pela prata **(A)** e imagem da densitometria **(B)**. **PM:** padrão de peso molecular; **linha 1:** β_2 GPI purificada de soro de rato; **linha 2:** forma dimérica e **linha 3:** forma monomérica da β_2 GPI purificada de soro humano..... 31
- Figura 4.** Imunoblot para β_2 GPI revelado com anticorpo anti- β_2 GPI **(A)** monoclonal, clone 5F7 e **(B)** soro imune de coelho. **PM:** padrão de peso molecular. **Linha 1:** β_2 GPI purificada de soro de rato. **linha 2:** amostra de β_2 GPI humana contendo a forma dimérica. **linha 3:** β_2 GPI humana purificada (forma monomérica). Sistema Trans-Blot (BioRad)..... 32
- Figura 5.** Aspecto histológico típico do fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana e seus respectivos controles. **A:** sepse (S). **B:** controle da sepse (CS). **C:** translocação bacteriana (TB). **D:** controle da translocação bacteriana (CTB). Fotomicrografia de cortes de 3 μ m, HE, (400X)..... 34

Figura 6. Aspecto histológico típico do intestino (íleo) de ratos submetidos ao modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana e seus respectivos controles. **A:** sepse (S). **B:** controle da sepse (CS). **C:** translocação bacteriana (TB). **D:** controle da translocação bacteriana (CTB). Fotomicrografia de cortes de 3 µm, HE, (400X)..... 35

Figura 7. Aspecto típico da marcação imuno-histoquímica para β_2 GPI com anticorpo monoclonal, clone 5F7, em tecidos de rato. Fotomicrografia de fígado (**A e B**) e íleo (**C e D**) de rato, mostrando (**A e C**) marcação e (**B e D**) respectivos controles da reação. Cortes de 3 µm Revelação: Envision-AP®. Contracoloração: hematoxilina, (400X)..... 38

Figura 8. Aspecto típico da marcação imuno-histoquímica para β_2 GPI com soro imune de coelho, em tecidos de rato. Fotomicrografia de fígado (**A e B**) e íleo (**C e D**) de rato, mostrando (**A e C**) marcação e (**B e D**) respectivos controles da reação. Cortes de 3 µm. Revelação: Envision-AP®. Contracoloração: hematoxilina, (200X)..... 39

Figura 9. Aspecto típico do fígado de ratos (**A**) inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou (**C**) injetados com solução salina pela via endovenosa, e respectivos controles negativos da reação (**B e D**). Fotomicrografia de cortes de 3µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x)..... 42

Figura 10. Aspecto típico do fígado de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela luz intestinal, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-β₂GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x)..... 43

Figura 11. Aspecto típico do intestino (íleo) de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela via endovenosa, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-β₂GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x)..... 48

Figura 12. Aspecto típico do intestino (íleo) de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela luz intestinal, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-β₂GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x)..... 49

Figura 13. Estudo citoquímico das áreas de marcação focal para β₂GPI em fígado de rato. Fotomicrografias de cortes independentes de uma mesma amostra, corados por **A:** reação imuno-histoquímica para β₂GPI com anticorpo monoclonal clone 5F7, revelação com Envision-AP®, contracoloração com hematoxilina. **B:** Hematoxilina-eosina. **C:** Vermelho Congo para amilóide. com espessura de 3µm, (400x)..... 50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Área total de células (mm^2), analisada para densidade de marcação imuno-histoquímica para $\beta_2\text{GPI}$ em cortes de fígado de ratos em cada um dos grupos experimentais: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S)..... 44

Gráfico 2.. Densidade da marcação difusa para $\beta_2\text{GPI}$ ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$), em fígado de rato, segundo grupo experimental: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S). Diferença estatística calculada pelo método One-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni..... 45

Gráfico 3. Densidade da marcação focal para $\beta_2\text{GPI}$ ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$) em fígado de rato, segundo o grupo experimental: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AP	Fosfatase alcalina
APS	Persulfato de amônia
BSA	Albumina de soro bovino
CL	Cardiolipina
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HE	Hematoxilina-eosina
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PS	Fosfatidil serina
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Silano	3-Aminopropiltrietoxi silano
TB	Translocação Bacteriana
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TEMED	N, N, N, N – tetrametiletilenodiamina
UFC	Unidades formadoras de colônias

UNIFESP/EPM	Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
β_2 GPI	β_2 -Glicoproteína I

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
Sepse e translocação bacteriana	1
Resposta inflamatória à seps e o circuito porta-hepático	5
β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI)	7
β_2 GPI e inflamação	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. PURIFICAÇÃO DE β_2 -GLICOPROTEÍNA I DE RATO	14
3.1.1. Precipitação em ácido perclórico	15
3.1.2. Cromatografia de afinidade em coluna de heparina Sepharose®	15
Montagem da coluna de cromatografia	15
Separação da β_2 GPI de rato por cromatografia de afinidade	16
3.2. ELETROFORESE EM SDS-PAGE	16
3.3. IMUNOBLOT PARA β_2 GPI	18
3.3.1. Transferência das amostras do gel para a membrana	19
3.3.2. Imunoblot	19
3.4. MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E SEPSE	20
3.4.1. Amostras bacterianas	21
3.4.2. Inoculação de bactérias nos animais para estudo da translocação bacteriana (TB)	21
3.4.3. Inoculação das bactérias nos animais para indução da seps e	22

3.4.4. Coleta dos órgãos e do sangue	23
3.4.5. Inclusão dos tecidos em parafina	23
3.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TECIDOS	24
3.5.1. Hematoxilina-eosina (HE)	24
3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA β_2 GPI EM FÍGADO E INTESTINO DE RATO.....	25
3.6.1. Preparação das lâminas	25
3.6.2. Imuno-histoquímica	26
3.7. ESTUDO CITOQUÍMICO	27
3.7.1. Vermelho Congo	28
3.8. ANÁLISE QUANTITATIVA DA MARCAÇÃO HEPÁTICA PARA β_2 GPI	28
3.9. ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
4.1. PURIFICAÇÃO DE β_2 -GLICOPROTEÍNA I DE RATO	30
4.2. IMUNOBLOT	31
4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO E INTESTINO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE	32
4.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA β_2 GPI EM FÍGADO E INTESTINO DE RATO	36
4.5. EFEITO DA VIA INFECÇÃO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DE β_2 GPI NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE	40
4.6. Efeitos da via de infecção sobre a localização de β_2 GPI no intestino de ratos submetidos à sepse	47

4.7. Estudo citoquímico das áreas de marcação focal para β_2GPI em fígado de rato	50
5. DISCUSSÃO	51
Purificação das formas monoméricas e multiméricas da β_2GPI de rato	51
Demonstração imuno-histoquímica de β_2GPI em tecidos de rato	53
β_2GPI e modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana.....	56
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO

Sepse e translocação bacteriana

A sepsse vem sendo estudada por muitos pesquisadores devido ao fato de ser uma das causas mais comum de mortes em hospitais. A infecção seguida de sepsse, frequentemente evolui para sepsse grave e choque séptico, levando à falência de múltiplos órgãos.

Sepsse é uma manifestação do organismo desencadeada por uma infecção grave, relacionada à reação inflamatória do hospedeiro. O termo sepsse significa putrefação, decomposição da matéria orgânica por um agente agressor (bactérias, fungos, parasitas, vírus). Os termos infecção e sepsse são geralmente utilizados de forma independente, mas existe uma relação entre eles, devido ao fato de que, a infecção também está relacionada à presença de um agente agressor numa localização (tecido, cavidade ou fluido corporal) normalmente estéril (MATOS & VICTORINO, 2005).

Em pacientes sépticos, especialmente quando o foco primário não é definido, o intestino representa um potencial reservatório de bactérias, que alcançariam os tecidos extra-intestinais pelo fenômeno denominado de translocação bacteriana (MEAKINS et al., 1989; HOFFMAN et al., 1996; DAVIES & HAGEN, 1997). O termo translocação bacteriana (TB) foi, inicialmente, empregado para descrever a passagem de bactérias através da parede intestinal (WOLOCHOW, 1966). Posteriormente, este conceito foi ampliado como sendo a passagem de bactérias viáveis, nativas do trato gastrointestinal, para sítios extra-intestinais como os linfonodos do mesentério, baço, fígado, rins, cavidade peritoneal e circulação sanguínea (BERG & GARLINGTON, 1979). Este processo parece ser um processo ativo,

dependente de compartimentalização, da patogenicidade das bactérias e da concentração bacteriana, mas sem correlação direta com o estado de imunodeficiência ou com lesão da mucosa intestinal no hospedeiro. O fenômeno translocação bacteriana não necessariamente leva à infecção sistêmica ou à mortalidade em ratos (KOH et al., 1996a, 1998a e 1998b; SILVA et al., 1996a e 1996b). Além disso, as bactérias translocadas mostram uma preferência pelos órgãos sólidos, linfonodo mesentérico, baço e fígado em comparação ao compartimento sanguíneo (MENCHACA-DIAZ, 2003).

Para a ocorrência da TB, ao menos uma das condições seguintes deve estar presente: sobrecrecimento bacteriano intestinal, deficiência na imunidade do hospedeiro ou aumento da permeabilidade da barreira mucosa intestinal (DEITCH, 1990; BERG, 1992).

Os principais agentes atualmente relacionados com a sepse em humanos são as bactérias gram-negativas, sendo a *Escherichia coli* o agente mais freqüente (MARSHALL et al., 1988; O'BOYLE et al., 1998; MACFIE et al., 1999).

Como, freqüentemente, o agente isolado do sangue é identificado entre os componentes da flora intestinal do indivíduo, uma das principais hipóteses para a origem das infecções na sepse, considera que a etapa inicial seja o escape de bactérias da luz intestinal para a circulação sistêmica (hipótese intestinal da sepse) (MARSHALL et al., 1988; MACFIE et al., 1999). Segundo a hipótese intestinal da sepse, as bactérias translocadas induzem uma resposta sistêmica de ativação pró-inflamatória em células endoteliais. Como resultado, ativam-se o sistema complemento, o sistema de coagulação, fagócitos mononucleares e neutrófilos. Esta ativação em cascata pode causar dano, de

intensidade e extensão variáveis, em órgãos parenquimatosos e culminar com a morte do hospedeiro (DAVIES & HAGEN, 1997; DEITCH, 1992; HEUMANN et al., 1998).

Segundo a literatura, as bactérias do intestino alcançam a circulação sistêmica por duas vias: a via portal (hematogênica) e a via linfática. Culturas de sangue positivas mostraram que as bactérias aderem-se ao endotélio dos vasos sanguíneos (veia porta, veia cava inferior, renal e pulmonar) após a translocação (DEITCH, 1992; KOH et al., 1998a). Este fenômeno foi observado com bactérias *E. coli* R-6 inoculadas no intestino de ratos, tanto em concentrações letais, quanto não letais (KOH et al., 1998a). Entretanto, a via hematogênica da TB não foi consagrada como uma via habitual de TB, porque culturas do sangue portal em modelos experimentais de sepse mostraram resultados divergentes (MAINOUS et al., 1991; MOORE et al., 1991; BRATHWAITE et al., 1993; VAN GOOR et al., 1994; KOH et al., 1996a). A via linfática tem sido reconhecida como sendo a principal via de TB, devido à demonstração clara de bactérias translocadas do intestino nos linfonodos mesentéricos (BERG & GARLINGTON, 1979; DEITCH et al., 1986 e 1990; WELLS et al., 1990; ALEXANDER et al., 1991; MAINOUS et al., 1991; BRATHWAITE et al., 1993; GAUTREAUX et al., 1994; KOH et al., 1996c; WOLOCHOW et al., 1966; LJUNGDAHL et al., 2000). Entretanto, vários estudos sugerem que a via linfática de TB relacione-se à ativação da resposta imunológica do hospedeiro e não seja uma via importante para o tráfego de bactérias de origem intestinal para a circulação sistêmica (KOH et al., 1996b; NIEUWENHUIJZEN et al., 1996; RUIZ-SILVA et al., 2002).

Além de ser o reservatório dos agentes de infecção, o intestino é um órgão importante no desenvolvimento da sepse (CARRICO et al., 1986; BERG, 1999). Em consequência da agressão à mucosa intestinal, sua permeabilidade aumenta, permitindo que mais bactérias presentes na luz ultrapassem a parede do intestino e invadam sítios extraintestinais do hospedeiro (DEITCH, 1987). Portanto, a ruptura da barreira epitelial do intestino normal, com subsequente translocação bacteriana, pode não só gerar um estado de sepse, como também provocar o agravamento do estado de sepse pré-existente, amplificando a resposta inflamatória sistêmica (ANTONSSON & FIDDIAN-GREEN, 1991).

Resposta inflamatória à sepse e o circuito porta-hepático

A via hematogênica portal de infecção sistêmica implica o fígado e o baço como barreiras importantes na resistência à sepse (SILVA et al., 1998; MENCHACA-DIAZ et al., 2002). Entretanto, em ambas as vias (hematogênica e linfática) o fígado é um órgão importante da resposta inflamatória aguda.

A circulação porta-hepática drena uma extensa região de mucosa intestinal não estéril. O intestino tem um sistema linfóide desenvolvido e é permanentemente estimulado pela flora normal, rica, presente na luz do órgão. A topografia e a intensidade da colonização pela flora normal são mantidas devido à contínua migração de leucócitos polimorfonucleares e monócitos do sangue, além da ação especializada de células epiteliais, imunoglobulinas e outras substâncias imunoprotetoras sintetizadas por células do sistema imune. Este conjunto de ações cooperativas mantém a integridade histológica e funcional do tecido (ANDERSON et al., 1991; CARRERAS et al., 1994; CONNELLY et al., 2001). Ao mesmo tempo, mucosas representam interfaces de troca com o ambiente externo, e requerem uma seleção precisa de antígenos a serem tolerados pelo sistema imune (MAYER et al., 1996). A tolerância a antígenos da dieta e da flora normal também é regulada localmente de forma dinâmica (DIETER et al., 1995a; MAYER et al., 1996).

Além da barreira local, o fígado desempenha um papel central na regulação da resposta imune (ROGOFF & LIPSKY, 1981). Nos sinusóides, as células de Kupffer interagem entre si e com o parênquima hepático para produzir mediadores inflamatórios que regulam o estado de ativação, a composição e o tamanho da população de leucócitos que migra do sangue para os tecidos (NAITO et al., 1997; ROGOFF & LIPSKY, 1981; SHI et al.,

2001). A ativação de fagócitos, entre eles as células de Kupffer, produz interleucinas, derivados do ácido araquidônico, produtos de ativação plaquetária, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podendo levar à resolução da infecção ou à morte do hospedeiro pela falência de múltiplos órgãos (DIETER et al., 1995a, 1995b e 2000; RIGATO et al., 2001). Durante a indução da inflamação, parte das interleucinas liberadas atua no sentido de inibir a progressão da resposta inflamatória. As células de Kupffer, endoteliais, musculares e outras células do sinusóide hepático regulam o fluxo e a distribuição do sangue pela rede capilar hepática (MCCUSKEY, 2000). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, juntamente com a endotelina e as prostaglandinas modificam o tônus vascular, regulando a perfusão. Em condições inflamatórias, temos ainda a indução de iNOS nas células endoteliais e macrófagos e variações na atividade de heme-oxigenase-1 e na síntese de prostaglandinas (CANTONI et al., 1991; MONCURE et al., 1999; DIETER et al., 2000).

β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI)

A β_2 -glicoproteína I é uma proteína de aproximadamente 50kDa, que consiste de uma cadeia polipeptídica simples contendo 326 resíduos de aminoácidos, cinco deles ligados à oligossacarídeos, com cinco domínios (figura 1) de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, quatro deles iguais e típicos da família *short consensus repeats* ou das proteínas de controle do complemento, e um quinto domínio, ligeiramente diferente (SCHULTZ et al., 1961; LOZIER et al., 1984; DAY et al., 1989). A β_2 GPI de rato apresenta homologia em relação à β_2 GPI humana baseada na sequência de aminoácidos da proteína (AOYAMA et al., 1989). É encontrada no plasma circulante de diversas espécies, inclusive de humanos, cerca de 60% na forma livre e 40% ligada à diversas frações de lipoproteínas, principalmente VLDL e quilomicrons, e também é denominada apolipoproteína H (POLZ et al., 1980). Sua concentração no plasma de rato é de aproximadamente 200 μ g/mL (HORBACK et al., 1998; KANDIAH & KRILIS, 1994; BARSHACK et al, 2003). A β_2 GPI também é encontrada na linfa, no líquido cefalorraquidiano e no humor aquoso de várias espécies.

Figura 1. Estrutura da β_2 GPI apresentando cinco domínios (I-V), quatro deles típicos da família *Short Consensus Repeats* e um domínio rico em aminoácidos com carga positiva (V).

A β_2 GPI é produzida principalmente em hepatócitos, no fígado (DAY et al., 1992), e sua expressão (RNAm e proteína) tem sido demonstrada em astrócitos fetais, células do intestino e da placenta (AVERY et al., 1993; AVERNA et al., 1997; CHAMLEY et al., 1997), células endoteliais, linfócitos, monócitos, astrócitos e neurônios (CARONTI et al., 1998 e 1999; CONTI et al., 2003; AVERNA et al., 2004), com reabsorção renal (KLAERKE et al., 1997).

Sua função fisiológica ainda é desconhecida, mas ela tem sido implicada no metabolismo dos lipídeos e na regulação da hemostasia. A β_2 GPI liga-se às superfícies contendo lipídios com carga negativa, como fosfatidilserina (PS) e cardiolipina (CL), heparina, dextran sulfato e DNA (BRIGTHON et al., 1994 e 1999; GOLDSMITH et al., 1994; AVERNA et al., 2004). A β_2 GPI liga-se a plaquetas ativadas com PS e CL e inibe a agregação plaquetária e a fase de contato da cascata de coagulação (BRIGTHON et al., 1994; GOLDSMITH et al., 1994). Pela sua capacidade em ligar-se a superfícies contendo lipídios negativamente carregados, foi proposta como um

sinalizador de apoptose para macrófagos (CHONN et al., 1995). A associação entre β_2 GPI e membranas ocorre através do seu quinto domínio (SANGUERA, 1997a e 1997b), como mostrado na figura 2. Após ancorar-se à membrana, a proteína sofre mudanças conformacionais e oligomerização (HAMMEL et al., 2001).

Figura 2. Esquema da ligação da β_2 GPI a superfícies carregadas negativamente através do quinto domínio.

Formas clivadas de β_2 GPI foram detectadas no plasma de pacientes com Coagulação Intravascular Disseminada, assim como em pacientes tratados com estreptoquinase, com leucemia e atividade do anticoagulante lúpico (HORBACH et al., 1999; ITOH et al., 2000). Este processamento proteolítico da β_2 GPI *in vivo* ocorre durante a ativação da fibrinólise mediado pela plasmina. A clivagem *in vitro* da β_2 GPI é causada por plasmina, tripsina e elastase e é prevenida pelo pré-tratamento do plasma com precipitação em ácido perclórico (HORBACH et al., 1999).

β_2 GPI e inflamação

A ligação de β_2 GPI a superfícies lipídicas contendo fosfatidilserina levou à proposta por Chonn e colaboradores (1995) de que esta proteína pudesse servir como um sinalizador biológico para remoção de células apoptóticas e plaquetas ativadas. Esta proposta foi referendada pelos resultados de Barshack e colaboradores (2003), que demonstraram a presença de β_2 GPI associada a regiões de lesão em músculo cardíaco de ratos infartados. Foram demonstrados também, efeitos de β_2 GPI sobre a fagocitose e sobre o *burst* respiratório de fagócitos (BALASUBRAMANIAN et al., 1998; GOMES et al., 2002).

A β_2 GPI inibe o *burst* respiratório de células de Kupffer sem afetar na mesma intensidade o processamento de antígenos fagocitados, ao menos no caso de atividade fungicida contra *Candida albicans* (GOMES et al., 2002 e 2004b). Em humanos, foi descrito o aumento da concentração de β_2 GPI em doenças inflamatórias com componente autoimune e em idosos hipercolesterolêmicos sem história de doença cardiovascular (GOMES, 2004a).

A associação entre trombose e inflamação é relevante no caso de doenças autoimunes que apresentam anticorpos com especificidade para β_2 GPI, por exemplo, no Lupus Eritematoso Sistêmico e na Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido Primário. Nestas patologias aumenta a concentração plasmática da proteína, sem que se conheça o significado clínico desta alteração (GEORGE et al., 1999). Além dos leucócitos e das plaquetas, células endoteliais são alvos potenciais dos efeitos de β_2 GPI. A β_2 GPI liga-se às células endoteliais através do seu quinto domínio e a formação do complexo

entre anticorpo autoimune e β_2 GPI ancorada às células endoteliais leva à ativação dessas células *in vitro* em pacientes com síndrome antifosfolipídica (DEL PAPA et al., 1998). A ligação com o endotélio também se dá através de anexina A2 (ZHANG & MCCRAE, 2005). Em modelo murino, o efeito inibidor do *burst* respiratório de células de *Kupffer* é mais pronunciado no órgão inteiro perfundido *in vitro* do que em suspensões de células não parenquimatosas isoladas, indicando que a interação endotélio-macrófago possa participar da resposta à β_2 GPI (GOMES et al., 2004b).

Recentemente foi descrita, em modelo murino, a indução de autoanticorpos reativos para β_2 GPI em modelos animais infectados com *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* entre outros patógenos. Autoanticorpos produzidos após administração de toxóide tetânico ou infecção por estas bactérias foram capazes de induzir a síndrome do anticorpo antifosfolipídio em animais saudáveis (BLANK et al., 2002).

Se considerados em conjunto, a presença de β_2 GPI na circulação sanguínea e linfática (VLDL e quilomicrons), a localização anatômica de sua produção (fígado e mucosa intestinal são os principais sítios de sua produção), seus efeitos antiinflamatórios, metabólicos e suas ações sobre a coagulação sanguínea e sobre as células endoteliais, sugere-se existência de um compartimento funcional para seu papel imunorregulador, associado ao circuito porta-hepático.

A hipótese em estudo neste trabalho é de que a modulação da resposta imune por β_2 GPI no circuito da circulação porta-hepática seja relacionada à absorção de nutrientes e à condição da flora local, embora este sítio não se represente como um compartimento delimitado por barreiras anatômicas. A

própria mucosa intestinal e o fígado poderiam regular esta função da proteína, alterando a sua concentração local e a sua disponibilidade, tanto no sangue portal, quanto na linfa mesenterial. Por isso, o estudo da localização de β_2 GPI na mucosa intestinal e no tecido hepático, em modelo animal de sepse e translocação bacteriana, permitirá avançar no estudo do modo de ação da proteína sobre a regulação da resposta inflamatória aguda local.

2. OBJETIVOS

Estabelecer um método imuno-histoquímico para detecção de β_2 GPI em tecidos de rato.

Estudar, através de técnicas de marcação imuno-histoquímica, a presença de β_2 GPI no tecido hepático e na mucosa intestinal de ratos.

Comparar a distribuição da β_2 GPI *in vivo* em duas condições distintas de indução de resposta inflamatória aguda à sepse, associadas respectivamente à via de infecção por inoculação direta e à translocação bacteriana através da mucosa intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PURIFICAÇÃO DE β_2 -GLICOPROTEÍNA I DE RATO

Para a purificação da β_2 GPI, foi utilizado um *pool* de soro de ratos Wistar, reunindo o soro dos animais controle utilizados nos ensaios de sepse e de animais utilizados da etapa de padronização da técnica imuno-histoquímica. Para os ensaios de sepse e translocação bacteriana, foram utilizados 24 ratos fêmeas, da linhagem Wistar, com idade aproximada de três meses e peso entre 175 e 225 g procedentes do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia-CEDEME, da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

A β_2 GPI foi purificada a partir de 85 mL de soro de ratos por cromatografia em coluna de Heparina Sepharose® CL-6B (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ).

Tampões utilizados na purificação:

Tris.HCl* 20 mM com NaCl 30 mM, pH 7,1.

Tris.HCl 20 mM com NaCl 150 mM, pH 7,0.

Tris.HCl 20 mM com NaCl 350 mM, pH 8,5.

Tris.HCl 20 mM com NaCl 500 mM, pH 8,5.

*Trizma.HCl® ou Trizma base® preparado com HCl (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)

3.1.1. Precipitação em ácido perclórico

Inicialmente, o soro foi transferido para a membrana de diálise Spectra/Por® (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) e dialisado em tampão Tris 20 mM / NaCl 30 mM sob agitação por 24 horas à 4°C. Em seguida, o soro foi adicionado de ácido perclórico a 70%, na proporção de 1,25 mL de ácido para cada 50 mL de soro, seguida de centrifugação a 10621 g por 30 minutos à 4°C (Hitachi Ltda., Chiyoda-ku, Tokio). Este procedimento precipita uma grande quantidade das proteínas da solução e corresponde a uma etapa de pré-purificação do soro. O sobrenadante foi neutralizado com carbonato de sódio a pH 7,0 e dialisado em tampão Tris 20 mM / NaCl 30 mM sob agitação, por 12 horas, a 4°C.

3.1.2. Cromatografia de afinidade em coluna de heparina Sepharose®

Montagem da coluna de cromatografia

A resina de heparina Sepharose® CL-6B foi pesada (3,5 g), hidratada e lavada várias vezes em água destilada. O gel formado foi colocado, com excesso de água, em um *erlenmeyer* sem tampa, deixado dentro de um dessecador fechado e degaseado por cerca de 1 hora com o auxílio de uma bomba de vácuo para remoção do ar que fica aprisionado nas partículas hidratadas do gel. Em seguida, o gel hidratado foi colocado na coluna de vidro (7 x 18 cm) sobre uma fina camada de lã de vidro introduzida na base da coluna. A distribuição homogênea, em toda a altura da coluna de gel, foi conseguida ajustando-se as condições de fluxo durante esta etapa. A coluna

foi equilibrada com a passagem de água destilada, seguida de tampão Tris 20 mM / NaCl 30 mM. Todo o procedimento foi realizado a 4°C.

Separação da β_2 GPI de rato por cromatografia de afinidade

Após o equilíbrio da coluna de cromatografia, a amostra foi passada pela coluna em fluxo de 10 mL/h. Em seguida, as ligações inespecíficas foram removidas com o tampão Tris 20 mM / NaCl 150 mM em fluxo de 30 mL/h, até que a absorbância fosse menor que 0,01.

A proteína foi eluída em tampão Tris 20 mM / NaCl 350 mM em fluxo de 30 mL/h e alíquotas foram colhidas e analisadas no espectrofotômetro. O perfil de eluição foi determinado a partir do gráfico das absorbâncias das alíquotas coletadas em função do volume eluído, em cada etapa. Foram recolhidas as amostras ricas em proteína de cada uma das etapas de purificação, reunidas em um volume único por etapa. As alíquotas foram armazenadas no freezer a -20°C para utilização dentro de 30 dias e no freezer -80°C para estoque por tempo prolongado.

A coluna foi lavada com tampão Tris 20 mM / NaCl 500 mM e re-equilibrada com tampão Tris 20 mM / NaCl 30 mM.

3.2. ELETROFORESE EM SDS-PAGE

As amostras da β_2 -glicoproteína I de rato, colhidas na cromatografia, foram submetidas à eletroforese da proteína em gel SDS-poliacrilamida a 12,5%. Formas dimérica e monomérica da β_2 GPI humana serviram como controle positivo da separação. A concentração da proteína de rato foi

estimada a partir de sua absorbância em 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1,00 \text{ mL/mg.cm}$), considerada por analogia com a proteína humana (AOYAMA et al., 1989).

Soluções utilizadas:

Tampão do compartimento inferior: Tris-HCl a 1,5 M pH 8,8 / dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,4%.

Tampão do compartimento superior: Tris-HCl a 1 M pH 6,8 / SDS a 0,4%.

Acrilamida SDS-PAGE: acrilamida a 30%; bisacrilamida a 0,8%.

APS: 0,1 g de persulfato de amônia; 1 mL de água destilada.

Tampão de amostra: 4ml de Tris-HCl a 1 M pH 6,8; 5 mL de SDS a 20%; 5 mL de glicerol; 0,5 mL de azul de bromofenol® a 0,1% (Difco Laboratories, Livonia, MI); 32,5 mL de água bidestilada; β -mercaptoetanol a 10%.

Tampão de corrida: 12 g de Tris; 57 g de glicina® (Ajinomoto Company Inc., Chuo-ku, Tokyo); 4 g de SDS; água destilada q.s.p. 1000 mL (4x concentrado).

A eletroforese da proteína foi realizada com gel de separação a 12,5% (5,3 mL de água destilada; 4,0 mL de tampão do compartimento inferior; 6,7 mL de acrilamida; 40 μL de APS a 10%; 25 μL de TEMED) e gel de empacotamento a 3,0% (2,95 mL de água destilada; 1,25 mL de tampão do compartimento superior; 0,8 mL de acrilamida, 25 μL de APS e 15 μL de TEMED) utilizando o sistema Protean 3® (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, PA).

O sistema foi montado e colocado em cuba contendo o tampão de eletroforese. Foi aplicado 0,5 µg de cada amostra por poço e 3 µL do padrão do padrão de peso molecular (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario) por poço. A cuba foi ligada a uma fonte de 120 v e 100 mA por 80 minutos.

Após a corrida, o gel foi corado pela prata e foi analisado por densitômetro de calibração GS-700 (BioRad) para medida dos pesos moleculares das bandas reveladas na eletroforese.

3.3. IMUNOBLOT PARA β_2 GPI

Para o imunoblot, foram utilizadas amostras de 2 µg da proteína purificada e submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5%. Para referência de calibração dos pesos moleculares das bandas obtidas, utilizamos 3 µL do padrão de peso molecular. O imunoblot foi realizado num sistema Trans-Blot® (BioRad).

Soluções utilizadas:

Tampão de transferência: 3 g de Tris; 14,4 g de glicina; 200 mL de metanol; água milli-Q q.s.p. 1000 mL.

Solução Ponceau: 1 g de Ponceau® (Merck & Co Inc., Whitehouse Station, NJ); 10 mL de ácido acético; água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Tampão de lavagem: PBS a 0,05 M com Tween 20 a 0,05% (PBST).

Solução de bloqueio: 5 g de leite desnatado em pó Molico® (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, SP) e 100 mL de PBST.

Solução de diluição: 1 g de leite desnatado em pó e 100 mL de PBST.

Solução reveladora: 2,5 mg de 3,3'-diaminobenzidina® (DAB) (Sigma); 15 mL de PBS; 75 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck).

3.3.1. Transferência das amostras do gel para a membrana

O gel retirado da eletroforese foi colocado em um recipiente contendo o tampão de transferência.

Uma membrana de nitrocelulose (Pharmacia) e papéis de filtro (Whatman Inc., Florham Park, NJ) de 1 e 3 mm de espessura foram cortados nas dimensões do gel. A membrana foi colocada em água milli-Q por 2 minutos e no tampão de transferência por 10 minutos.

Em seguida, o gel e a membrana foram fechados entre os papéis de filtro, previamente embebidos no mesmo tampão, e colocados em uma cuba de transferência. A cuba foi preenchida com o tampão de transferência e ligada a uma fonte de 50 v, 400 mA e 100 w de potência na geladeira à 4°C por 18 horas.

Após a transferência, a membrana foi colocada na solução corante Ponceau para visualização das bandas. Em seguida, foi lavada em água destilada e seca ao ar.

3.3.2. Immunoblot

A membrana foi cortada em tiras separando as bandas, numeradas segundo um esquema pré-estabelecido. As tiras foram colocadas na solução de bloqueio sob agitação por 2 horas, exceto as referentes ao padrão de peso molecular, que foram colocadas na geladeira entre papéis de filtro, para posterior comparação com as bandas reveladas no imunoblot. Após o bloqueio

das ligações inespecíficas, as tiras passaram por três banhos de 10 minutos cada, em tampão de lavagem.

Em seguida, foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI (1:1000), clone 5F7 (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA) e soro imune de coelho anti- β_2 GPI (1:1000) (produzido no laboratório), sob agitação, a 4°C por 12 horas. Após este período, passaram por três banhos em tampão de lavagem e foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de rato (1:200) conjugado com peroxidase (Sigma) sob agitação a 4°C por 1 hora. Finalmente, passaram por três banhos em tampão de lavagem e foram colocadas em solução reveladora até a visualização das bandas. A reação foi bloqueada com banhos de água milli-Q.

3.4. MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E SEPSE

Os modelos experimentais de translocação bacteriana e sepse utilizados foram os desenvolvidos no laboratório do Dr. Ivan Koh (KOH et al., 1996a; SILVA et al., 1998) da Disciplina de Técnica operatória e Cirurgia experimental da UNIFESP/EPM.

Os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) sob o número 11 (Anexo).

Os animais foram mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento em gaiolas plásticas, medindo 40x34x17 cm, com cinco animais em cada uma.

Para o experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de estudo:

Grupo de Controle de Translocação Bacteriana (CTB): Injeção de 10 mL de soro fisiológico no intestino delgado. (n=6).

Grupo de Translocação Bacteriana (TB): Inoculação de 10 mL de bactérias *E. coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) no intestino delgado. (n=6).

Grupo de Controle de Sepses (CS): Injeção de soro fisiológico (1 mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior. (n=6).

Grupo de Sepses (S): Inoculação de bactérias *E. coli* R-6 (10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior. (n=6).

3.4.1. Amostras bacterianas

Foram utilizadas cepas de bactérias Gram-negativas resistentes à Tetraciclina (Tet^R), caracterizadas como *Escherichia coli* R-6, previamente isoladas de rato submetido a experimentos de translocação *in vivo* (KOH & SILVA, 1996c; SILVA et al., 1996a e 1996b).

3.4.2. Inoculação de bactérias nos animais para estudo da translocação bacteriana (TB)

Para estudo do perfil da translocação bacteriana, foi escolhido um método em que, a condição de sobrecrecimento bacteriano (10^{10} UFC/mL) na luz intestinal foi o único fator estímulo para promover a translocação, ou seja, com a manutenção da integridade da barreira intestinal e com aparente normalidade da condição imunológica do hospedeiro (KOH & SILVA, 1996c).

Os animais foram anestesiados com Ketamina (AgribRANDS do Brasil Ltda, Brasil) + Xilasina (AgribRANDS) na diluição de 2:8, dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, intraperitoneal. Em seguida, foi realizada anti-sepsia do abdome com álcool a 70%; laparotomia mediana por planos anatômicos; ligadura do íleo terminal, a aproximadamente 1 cm do ceco; introdução de uma sonda oroduodenal na primeira porção do duodeno; e inoculação de 10 mL de bactérias *E. coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) ou de soro fisiológico, no grupo controle de TB, no duodeno. Após a inoculação, efetuou-se a ligadura obstrutiva do duodeno e remoção da sonda com subsequente fechamento da parede abdominal em dois planos com sutura contínua.

3.4.3. Inoculação das bactérias nos animais para indução da sepse

Para indução da sepse, foi empregado o modelo experimental utilizando bactérias na concentração não letal de 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal, o que representa aproximadamente 100 milhões de bactérias por mililitro de sangue circulante (SILVA et al., 1998).

Os animais foram anestesiados com Ketamina + Xilasina na diluição de 2:8, dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, intraperitoneal. Em seguida, foi realizada anti-sepsia do abdome com álcool a 70%; laparotomia mediana por planos anatômicos; e inoculação de bactérias *E. coli* R-6 (10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal), dose semi-letal, ou de soro fisiológico, no grupo controle de sepse (1 mL/100 g de peso), na veia cava inferior por punção com agulha número 27,5 G; hemostasia do local da punção com subsequente fechamento da parede abdominal em dois planos com sutura contínua.

3.4.4. Coleta dos órgãos e do sangue

A coleta dos órgãos e do sangue foi realizada após 2 horas da inoculação bacteriana, tempo suficiente para que o fenômeno da TB aconteça. Todos os animais sofreram nova laparotomia abdominal sob anestesia obtendo-se o material na seguinte ordem: sangue da veia porta (1 mL) coletado em seringa contendo 0,1 mL de EDTA, fígado e intestino delgado (íleo). Os fragmentos de tecidos foram lavados com solução fisiológica e imediatamente fixados em metacarn (BEHMER, 1976) a 4°C durante 3 a 4 horas e, posteriormente, em etanol absoluto a 4°C durante 12 a 24 horas. O metacarn é composto por metanol (60%), clorofórmio (30%) e ácido acético glacial (10%) e foi preparado aproximadamente uma hora antes da coleta. O intestino foi cortado transversalmente com bisturi e fixado aberto sobre papel filtro, para melhor visualização das vilosidades. Os animais, ainda sob anestesia, foram sacrificados por exsanguinação. O sangue dos animais controle foi centrifugado a 2000 g por 15 minutos, separado o plasma e congelado no freezer a -80°C para posterior separação da β_2 GPI.

3.4.5. Inclusão dos tecidos em parafina

Os fragmentos de tecidos foram processados no dia seguinte à coleta. Tecnicamente, foram submetidos à desidratação em etanol absoluto (três banhos de 30 minutos cada), diafanização em xilol (três banhos de 15 minutos cada), impregnação em parafina a 58°C (três banhos de 30 minutos cada) e, finalmente, foram incluídos em blocos de parafina.

3.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TECIDOS

Para análise morfológica dos tecidos, os cortes histológicos de fígado e intestino, dos animais submetidos à translocação bacteriana e sepse, foram corados pelo método hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1998).

3.5.1. Hematoxilina-eosina (HE)

Soluções corantes utilizadas:

Hematoxilina de Harris: 0,5 g de hematoxilina (Merck), 5 mL de álcool absoluto, 10 g de alúmen de potássio, 0,25 g de óxido de mercúrio e 100 mL de água destilada.

Eosina: 0,5 g de eosina Y (Merck), 10 mL de água destilada e 90 mL de álcool a 95%.

As lâminas passaram por uma bateria de três banhos de xilol, para desparafinização, seguida por em três banhos de etanol absoluto para remoção do xilol e rehidratação em água destilada antes de ficarem imersas em hematoxilina de Harris por 5 minutos, em seguida foram lavadas em água corrente, diferenciadas em álcool-ácido (5 mergulhos), lavadas novamente em água corrente por 1 minuto e finalmente imersas em eosina por 2 minutos, e em água amoniacal (10 mergulhos). As lâminas coradas foram diferenciadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Entelan® (Merck) e lamínula.

3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA β_2 GPI EM FÍGADO E INTESTINO DE RATO

Para determinação da presença de β_2 GPI nos tecidos, os cortes histológicos de fígado e intestino dos animais dos grupos CTB, TB, CS e S foram submetidos à reação imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal clone 5F7 ou soro imune como anticorpo primário e o sistema EnVision®, AP (Dako Corporation Inc., Carpinteria, CA) com o anticorpo secundário.

3.6.1. **Preparação das lâminas**

Silanização das lâminas

As lâminas utilizadas no experimento foram silanizadas para uso. Para isto, foram desengorduradas e limpas com um banho de acetona por 2 minutos, seguindo-se o banho de silano (Sigma) a 4%, em acetona, por 2 minutos e quatro mergulhos em acetona (ALVES et al., 1999). Em seguida, as lâminas silanizadas foram deixadas na estufa 60°C (Fabre 119) por 1 hora para secar.

Obtenção dos cortes histológicos

Os blocos de parafina contendo o tecido foram deixados no congelador a -20°C por 1 hora, antes de serem cortados.

Os tecidos foram cortados em micrótomo (American Optical 820) com a espessura de 3 μ m. Em seguida, os cortes foram cuidadosamente distendidos por flutuação em banho de água quente a 37°C (Fabre 167), colocados sobre

lâminas silanizadas e deixados na estufa a 60°C por 24 horas para melhor adesão do tecido.

3.6.2. Imuno-histoquímica

Tampões utilizados:

Tampão de lavagem: solução Tris salina tamponada (TBS) a 0,05 M com pH 7,2 a 7,6 contendo NaCl a 0,3 M e Tween 20 a 0,1% (TBST).

Tampão de diluição: Tris-HCl a 0,05 M, pH 7,2 a 7,6 com soro albumina bovina (Sigma) a 1% (TBS/BSA) e soro normal de cabra a 5%.

Solução de bloqueio: 5 g de leite desnatado em pó e 100 mL de tampão TBST

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em dois banhos de xilol por 5 minutos cada, dois banhos de etanol absoluto por 3 minutos cada, dois banhos de etanol a 95% por 3 minutos cada e foram então hidratadas em água destilada por 1 minuto.

Para bloquear as ligações inespecíficas, passaram por um banho em solução de bloqueio por 20 minutos e foram lavadas no tampão de lavagem.

Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI clone 5F7 (1:1000) e soro imune de coelho (1:5000) em câmara úmida (suporte plástico retangular contendo uma base de espuma umidecida com água) a 4°C durante 16 a 18 horas. Após este período, passaram por três banhos em tampão de lavagem de 5 minutos cada.

Foram então, incubadas com o anticorpo secundário do kit EnVision®, AP, acoplado a um polímero conjugado com fosfatase alcalina para amplificação do sinal, em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida passaram por três banhos em tampão de lavagem de 5 minutos cada.

A revelação da reação foi realizada com cromógeno *Fast Red*, adicionado de levamisol, (inibidor da fosfatase alcalina endógena), o qual foi preparado e imediatamente colocado sobre os cortes à temperatura ambiente durante 5 a 30 minutos. Deste procedimento resulta um precipitado corado em vermelho no lugar do antígeno. O aparecimento da cor foi monitorado pelo microscópio óptico comum (Olympus América Inc., Melville, NY) e a reação foi bloqueada com um banho de água destilada por 5 minutos.

A contracoloração foi feita com hematoxilina de Mayer (MICHALANY, 1998) por 30 segundos e banho em água corrente até clarear, seguidos de 10 mergulhos em água amoniácal a 37mM e banho em água corrente durante 2 a 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio aquoso Faramount® (Dako) e lamínula.

3.7. ESTUDO CITOQUÍMICO

As áreas de marcação imuno-histoquímica focal nos cortes de fígado de ratos submetidos à sepse associada ou não à translocação bacteriana foram também analisadas por estudo citoquímico utilizando dois diferentes métodos de colorações: método hematoxilina-eosina (descrito acima) e o método de Highman com o vermelho Congo para o amilóide (MICHALANY, 1998).

3.7.1. Vermelho Congo

Soluções corantes utilizadas:

Vermelho Congo: 0,5g de vermelho Congo e 100 mL de álcool a 50%.

Hidróxido de potássio: 0,2g de hidróxido de potássio e 100 mL de álcool a 80%.

As lâminas foram, previamente, desparafinizadas, desidratadas e hidratadas. Em seguida foram lavadas em água destilada, coradas no vermelho Congo por 5 minutos, diferenciadas rapidamente em hidróxido de potássio (3 a 5 segundos) e lavadas em água corrente. As lâminas foram contracoradas pela hematoxilina, lavadas em água corrente, diferenciadas em álcool-ácido e novamente lavadas em água corrente. Finalmente, foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

3.8. ANÁLISE QUANTITATIVA DA MARCAÇÃO HEPÁTICA PARA β_2 GPI

Após a reação imuno-histoquímica, foram capturados 12 campos contíguos de cada corte histológico com aumento de 400 vezes em câmera DP12 (Olympus) acoplada a um microscópio óptico (Olympus). A marcação imuno-histoquímica foi estudada utilizando o programa UTHSCSA ImageTool 3.0.

O programa foi calibrado para as medidas em unidades de área, μm^2 , através da medida de um retículo padrão. Em seguida as imagens capturadas foram transformadas de coloridas para tons de cinza. As áreas correspondentes a células de cada campo capturado foram medidas,

manualmente, descontando-se os espaços extracelulares (luz de vasos, principalmente). Esta medida foi identificada como “Área Total”, para cada animal do experimento. Em cada campo capturado, foram também contadas as células marcadas por imuno-histoquímica e medidas as áreas de marcação. Em ambos os casos, foram considerados independentemente os resultados dos dois padrões de marcação observados no material: citoplasmática difusa e focal. A Área Total de marcação por animal, para cada padrão de marcação, foi calculada a partir dos dados individuais obtidos por campo.

3.9. ESTATÍSTICA

Os resultados da análise quantitativa foram analisados pelo método One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparação de médias de amostras independentes. Os cálculos foram feitos com o programa de estatística SPSS (SPSS Inc).

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICAÇÃO DE β_2 -GLICOPROTEÍNA I DE RATO

Alíquotas de β_2 GPI de rato, obtidas da eluição da coluna em tampão Tris 20mM / NaCl 350mM, pH 8,5, foram utilizadas para estudo do padrão de migração em gel de eletroforese em SDS-PAGE corado pela prata, densitometria e imunoblot. O resultado típico de uma eletroforese da β_2 GPI de rato em gel de SDS-PAGE a 12,5% corado pela prata, está mostrado na figura 3A. A linha 1 mostra o perfil de migração eletroforética da β_2 GPI de rato. As linhas 2 e 3 mostram as formas dimérica e monomérica da β_2 GPI humana, respectivamente, nas mesmas condições de análise, que serviram como controle positivo da separação.

Para determinação dos pesos moleculares de cada banda de β_2 GPI de rato, foi realizada a densitometria, mostrada na figura 3B. Foram identificadas 6 bandas principais, formando um grupo, na região de peso molecular entre 40 e 64 kDa e uma banda isolada, em 133 kDa. A banda mais fortemente marcada apareceu na região correspondente ao peso molecular de 50 kDa, compatível com a literatura (YAN et al, 2004).

Figura 3. Padrão típico de migração da β_2 GPI em gel SDS-PAGE a 12,5% corado pela prata **(A)** e imagem da densitometria **(B)**. **PM**: padrão de peso molecular; **linha 1**: β_2 GPI purificada de soro de rato; **linha 2**: forma dimérica e **linha 3**: forma monomérica da β_2 GPI purificada de soro humano.

4.2. IMUNOBLOT

O imunoblot, representado na figura 4, foi realizado com 2 μ g da β_2 GPI de rato purificada. Amostras de 2 μ g da β_2 GPI purificada de soro humano, nas formas dimérica e monomérica, serviram como controle da reação com o anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI humana (clone 5F7) e soro imune de coelho. A proteína purificada de rato não pode ser identificada na forma monomérica com anticorpo monoclonal (figura 4A), nem com o soro imune (figura 4B), específicos para a proteína humana, apresentando somente bandas de aproximadamente 130 kDa que talvez correspondam a formas clivadas e dimerizadas da β_2 GPI. Os controles positivos de β_2 GPI humana nas formas dimérica e monomérica, apresentaram bandas com peso molecular de aproximadamente 50k Da fortemente marcadas pelo anticorpo monoclonal e uma marcação fraca com o soro imune.

Figura 4. Imunoblot para β_2 GPI revelado com anticorpo anti- β_2 GPI **(A)** monoclonal, clone 5F7 e **(B)** soro imune de coelho. **PM:** padrão de peso molecular. **Linha 1:** β_2 GPI purificada de soro de rato. **linha 2:** amostra de β_2 GPI humana contendo a forma dimérica. **linha 3:** β_2 GPI humana purificada (forma monomérica). Sistema Trans-Blot (BioRad).

4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO E INTESTINO DOS / SUBMETIDOS À SEPSE

A análise morfológica dos cortes de fígado e intestino dos grupos experimentais CTB, TB, CS e S está mostrada nas figuras 5 e 6. Todos os grupos estudados (CTB, TB, CS e S) mostraram preservação na morfologia dos tecidos, tanto no fígado, quanto no intestino (íleo) dos aminsais.

No fígado, os animais do grupo S (figura 5A) e do grupo TB (figura 5C) não apresentam sinais celulares evidentes de inflamação, nem presença de

infiltrado inflamatório, comparando com os grupos CS (figura 5B) e CTB (figura 5D), que também mostraram ausência de alterações morfológicas.

No intestino, o grupo S (figura 6A) e o grupo TB (figura 6C) mostraram preservação morfológica da mucosa intestinal, porém com infiltrado inflamatório na região submucosa, mostrando a presença de células mononucleares do sangue e algumas células apoptóticas. Células em apoptose aparecem também nos grupos CS (figura 6B) e CTB (figura 6D).

Figura 5. Aspecto histológico típico do fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana e seus respectivos controles. **A:** sepse (S). **B:** controle da sepse (CS). **C:** translocação bacteriana (TB). **D:** controle da translocação bacteriana (CTB). Fotomicrografia de cortes de 3 μ m, HE, (400X).

Figura 6. Aspecto histológico típico do intestino (íleo) de ratos submetidos ao modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana e seus respectivos controles. **A:** sepse (S). **B:** controle da sepse (CS). **C:** translocação bacteriana (TB). **D:** controle da translocação bacteriana (CTB). Fotomicrografia de cortes de 3 μ m, HE, (400X).

4.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA β_2 GPI EM FÍGADO E INTESTINO DE RATO

O resultado da marcação imuno-histoquímica em tecidos de rato para β_2 GPI está demonstrado nas figuras 7 e 8.

A figura 7 mostra os resultados obtidos em cortes de fígado e intestino de ratos com o anticorpo monoclonal clone 5F7, comercial. A figura 8 mostra os resultados obtidos com o soro imune de coelho anti- β_2 GPI, produzido no laboratório.

Leite e soro normal de cabra foram utilizados para eliminar as marcações inespecíficas da reação, em ambos os casos. A revelação com o sistema EnVision®, AP e a contracoloração com hematoxilina foram mantidas em todo o trabalho. As áreas marcadas coram em vermelho sobre um fundo azul. A marcação hepática aparece em todo o citoplasma ou em regiões citoplasmáticas focais dos hepatócitos localizados principalmente em regiões perivasculares (figuras 7A e 8A). O controle negativo da reação com o anticorpo monoclonal não apresentou marcação (figura 7B). Com o anticorpo policlonal, o fígado apresentou um padrão de marcação difusa, no citoplasma dos hepatócitos, em regiões perivasculares entremeadas com regiões não coradas. Este padrão é mais fraco nos controles do que na amostra, porém esta coloração inespecífica é intensa e presente na maioria das amostras (figura 8B). Com o anticorpo monoclonal, o intestino apresentou marcação difusa extracelular fraca, geralmente associada a infiltrado inflamatório (figura 7C). O citoplasma de algumas células mononucleares do infiltrado inflamatório e das células do endotélio dos vasos sanguíneos e linfáticos, localizados na submucosa, foram fortemente marcados com este anticorpo (figura 7C). O

controle negativo da reação não apresentou marcação (figura 7D). Com o anticorpo policlonal, o intestino apresentou marcação semelhante à obtida para o anticorpo monoclonal e, adicionalmente, positividade nas células glandulares da mucosa, submucosa e lâmina própria, (figura 8C). Entretanto, o controle negativo da reação apresentou marcação inespecífica (figura 8D).

A marcação inespecífica obtida com o soro imune não foi melhorada com o uso de bloqueadores nem com o aumento do número de lavagens. Por isso, no estudo dos modelos de sepse, apenas o anticorpo monoclonal foi usado.

Figura 7. Aspecto típico da marcação imuno-histoquímica para β_2 GPI com anticorpo monoclonal, clone 5F7, em tecidos de rato. Fotomicrografia de fígado (**A e B**) e íleo (**C e D**) de rato, mostrando (**A e C**) marcação e (**B e D**) respectivos controles da reação. Cortes de 3 μ m. Revelação: Envision-AP®. Contracoloração: hematoxilina (400X).

Figura 8. Aspecto típico da marcação imuno-histoquímica para β_2 GPI com soro imune de coelho, em tecidos de rato. Fotomicrografia de fígado (**A e B**) e íleo (**C e D**) de rato, mostrando (**A e C**) marcação e (**B e D**) respectivos controles da reação. Cortes de 3 μ m. Revelação: Envision-AP®. Contracoloração: hematoxilina (200X).

4.5. EFEITO DA VIA DE INFECÇÃO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DE β_2 GPI NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE

As figuras 9 e 10 mostram resultados típicos da reação imuno-histoquímica para β_2 GPI em cortes de fígado de ratos submetidos à sepse.

As regiões marcadas em vermelho no fígado dos animais submetidos à sepse por via endovenosa (S) (figura 9) ou associada à translocação bacteriana (TB) (figura 10), bem como de seus respectivos controles (CS e CTB) identificam a distribuição tecidual da proteína. Os dois padrões de marcação citoplasmática foram observados nos animais estudados, em todos os grupos: marcação citoplasmática difusa e focal. Nos animais do grupo S, inoculados por via endovenosa para indução de sepse (figura 9), foi observada uma área de marcação difusa (figura 9A), maior do que nos grupo controle CS (figura 9C). A marcação focal aumentou em alguns animais submetidos à sepse, mas este aumento não foi homogêneo no grupo S. Os respectivos controles da reação não apresentaram marcação (figuras 9B e 9D).

Nos animais do grupo TB foram observados raros hepatócitos com marcação citoplasmática focal e fraca marcação difusa (figura 10A), em intensidade semelhante à observada nos animais controle (figura 10C). Os respectivos controles da reação não apresentaram marcação (figuras 10B e 10D). A marcação focal não foi diferente entre os grupos TB e CTB (figura 10).

A quantificação da marcação imuno-histoquímica de β_2 GPI em cortes de tecido de fígado de ratos dos grupos CTB, TB, CS e S está representada nos gráficos 1 a 3. O gráfico 1 mostra a Área Total de células nos cortes de tecido de fígado de ratos com imuno-histoquímica para β_2 GPI em cada grupo experimental (CTB, TB, CS e S). O gráfico 2 representa a densidade da

marcação citoplasmática difusa em unidades de área ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos CTB e TB, porém o grupo S apresentou área de marcação difusa maior do que a do grupo CS. O gráfico 3 mostra a densidade de marcação das regiões citoplasmáticas focais, em unidades de área ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$). Não foram observadas diferenças entre as médias de densidade de marcação entre os grupos CTB, TB, CS e S. Quanto à variância dos resultados o grupo TB mostrou-se mais homogêneo que os demais, apesar das médias equivalentes.

Figura 9. Aspecto típico do fígado de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela via endovenosa, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3μm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-β₂GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x).

Figura 10. Aspecto típico do fígado de ratos (A) inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou (C) injetados com solução salina pela luz intestinal, e respectivos controles negativos da reação (B e D). Fotomicrografia de cortes de 3μm, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-β₂GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x).

Gráfico 1. Área total de células (mm²), analisada para densidade de marcação imuno-histoquímica para β_2 GPI em cortes de fígado de ratos em cada um dos grupos experimentais: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S).

Gráfico 2. Densidade da marcação difusa para β_2 GPI ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$), em fígado de rato, segundo grupo experimental: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S). Diferença estatística calculada pelo método One-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Gráfico 3. Densidade da marcação focal para β_2 GPI ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$) em fígado de rato, segundo o grupo experimental: controle da translocação bacteriana (CTB), translocação bacteriana (TB), controle da sepse (CS) e sepse (S).

4.6. EFEITOS DA VIA DE INFECÇÃO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DE β_2 GPI NO INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE

As figuras 11 e 12 mostram a distribuição de β_2 GPI em cortes de tecido de intestino (íleo) de ratos submetidos à sepsé associada ou não à translocação bacteriana. Nos animais do grupo S (figura 11) a mucosa intestinal mostrou-se negativa para a marcação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal, enquanto que as células endoteliais no endotélio dos vasos sanguíneos e linfáticos ao longo da submucosa foram marcadas em vermelho, bem como as células do infiltrado inflamatório (figura 11A). Esta marcação não foi mais intensa do que no grupo CS, que recebeu injeção de solução salina (figura 11C). Os respectivos controles da reação não apresentaram marcação (figuras 11B e 11D). Nos animais do grupo TB, que foram inoculados na luz intestinal (figura 12), as células da mucosa intestinal também não apresentam marcação, porém a submucosa e as células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, bem como as células do infiltrado inflamatório apresentam forte marcação (figura 12A), ausente no grupo CTB, que recebeu solução salina estéril na luz intestinal (figura 12C). Os respectivos controles da reação não apresentaram marcação (figuras 12B e 12D).

Figura 11. Aspecto típico do intestino (íleo) de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela via endovenosa, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3 μ m, reação imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x).

Figura 12. Aspecto típico do intestino (íleo) de ratos **(A)** inoculados com *E. coli* R-6 para indução de sepse ou **(C)** injetados com solução salina pela luz intestinal, e respectivos controles negativos da reação **(B e D)**. Fotomicrografia de cortes de 3 μ m, reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI, clone 5F7, revelada com Envision-AP®, (400x).

4.7. ESTUDO CITOQUÍMICO DAS ÁREAS DE MARCAÇÃO FOCAL PARA β_2 GPI EM FÍGADO DE RATO

As áreas de marcação focal (figura 13A), não puderam ser visualizadas nos cortes corados com hematoxilina-eosina (figura 13B), o que exclui sua identificação como substância hialina. Da mesma forma, mostram-se negativas na coloração por vermelho congo (figura 13C), indicando não tratar-se de depósito de substância amilóide.

Figura 13. Estudo citoquímico das áreas de marcação focal para β_2 GPI em fígado de rato. Fotomicrografias de cortes independentes de uma mesma amostra, corados por **A:** reação imuno-histoquímica para β_2 GPI com anticorpo monoclonal clone 5F7, revelação com Envision-AP®, contracoloração com hematoxilina. **B:** Hematoxilina-eosina. **C:** Vermelho Congo para amilóide. Cortes de 3 μ m, (400x).

5. DISCUSSÃO

Purificação das formas monoméricas e multiméricas da β_2 GPI de rato

Como não existem padrões comerciais desta proteína, foi necessária sua purificação, a partir de amostras de soro de rato, para analisar se o anticorpo anti- β_2 GPI clone 5F7 e o soro imune de coelho anti- β_2 GPI reconheceriam a proteína do rato pelo imunoblot. Os resultados mostrados nas figuras 3 e 4 apresentam bandas na região de peso molecular entre 40 e 64 kDa, que provavelmente correspondem à β_2 GPI de rato em sua forma monomérica. A β_2 GPI de rato apresenta alta homologia com a β_2 GPI humana e peso molecular de aproximadamente 40 kDa, baseado na sequência de aminoácidos. Sua migração em SDS-PAGE corresponde a um peso molecular aparente de 50 kDa, devido a glicosilação (LOZIER, 1984; WALSH et al, 1990; AOYAMA, 1989). A purificação de β_2 GPI a partir da precipitação do soro com ácido perclórico é a técnica clássica de purificação da proteína (POLZ et al, 1980). Entretanto, é possível que a proteína purificada contenha a forma monomérica e formas modificadas da β_2 GPI, em mistura. Não existem critérios de pureza para proteína humana, nem para a de rato, que permitam aferir a pureza da proteína obtida no laboratório. Critérios indiretos foram utilizados, com base em dados da literatura.

Como a estrutura da β_2 GPI é bastante conservada entre as espécies, amostras de β_2 GPI humana produzidas no laboratório foram usadas como controle da técnica de purificação. A migração eletroforética da β_2 GPI humana em gel de SDS-PAGE 12,5% mostra um conjunto de bandas com peso molecular de cerca de 50kDa, compatível com a literatura. Este padrão deve-

se a variações na glicosilação da proteína. Estão descritos contaminantes, em preparações da proteína humana, compostos por formas multiméricas ou clivadas de β_2 GPI (CAI et al, 1996; GALASKA et al, 1998; BALASUBRAMANIAN et al, 1997). Não há literatura disponível sobre a presença destas formas em soro de rato.

Os anticorpos utilizados não foram capazes de marcar a proteína no imunoblot (figura 4). Diversos fatores podem contribuir para esta ausência de marcação. Entre eles: proteólise parcial da amostra de proteína de rato, presença de contaminantes não caracterizados, pequenas diferenças estruturais entre as proteínas humana e de rato e a utilização de condições de transferência e cálculo de concentração, baseados na experiência com a proteína humana, que não necessariamente aplicam-se à proteína de rato. Foram observadas bandas nas regiões de peso molecular alto, acima de 133 kDa. Estes resultados sugerem a presença de oligômeros da proteína, provavelmente compostos por produtos de proteólise parcial (OHKURA et al., 1998; HORBACH et al., 1999; MATSUURA et al., 2000). Embora não se conheçam produtos de clivagem da proteína de rato, está descrita a clivagem proteolítica da β_2 GPI humana, pela plasmina, tripsina e elastase. Esta clivagem pode ocorrer in vivo e in vitro, durante a etapa inicial da purificação. O sistema fibrinolítico do rato é bem desenvolvido (KRINKE, 2000), portanto não é impossível que a amostra purificada contenha produtos de proteólise formados pela ação da plasmina. Chama a atenção, a marcação destas bandas no imunoblot. Esta marcação não é observada nos oligômeros da proteína humana. Seria necessário um estudo estrutural mais detalhado para comprovar a identidade destas bandas com produtos modificados de β_2 GPI.

Demonstração imuno-histoquímica de β_2 GPI em tecidos de rato

A β_2 GPI foi demonstrada em cortes de tecidos fígado e de intestino de ratos, referendando dados da literatura (AVERNA et al, 1997). Entretanto, um padrão diferente do mostrado nas figuras 5 e 6 foi encontrado por Aversa e colaboradores (1997). Os resultados publicados por este grupo assemelham-se mais à reação observada nos tecidos dos nossos animais com o soro imune de coelho. Porém, a marcação obtida com o soro imune, no caso dos nossos resultados, não pode ser atribuída inequivocamente à presença da β_2 GPI nos tecidos. Embora o soro imune de coelho forneça uma reação mais intensa do que o anticorpo monoclonal, para o mesmo material, tem a inconveniência da baixa especificidade. Reações inespecíficas foram observadas nos controles negativos (figuras 5D e 6D), praticamente com a mesma intensidade que nas lâminas teste (figuras 5B e 6B). Por isso, para diminuir o risco de falsos negativos, o anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI foi escolhido como anticorpo primário, nos estudos de aplicação. Diferenças de especificidade e sensibilidade são bem caracterizadas na literatura. O anticorpo policlonal é produzido por muitos clones de linfócitos B e pode ligar-se a diferentes porções (epítomos) de um antígeno, enquanto que, o anticorpo monoclonal é produzido por apenas um clone e é de especificidade singular, liga-se a apenas um epítomo do antígeno. O anticorpo policlonal é mais sensível, porém, menos específico, enquanto que o anticorpo monoclonal é altamente específico.

No sistema proposto neste trabalho, reações inespecíficas podem dever-se também à ligação do anticorpo secundário com imunoglobulinas de rato presentes no tecido, que dificultam a discriminação das diferenças de coloração entre os controles negativos (sem anti- β_2 GPI) e o teste (com anti-

β_2 GPI). Este tipo de reação é mais importante quanto mais restrita é a ligação do anticorpo primário ao material em estudo (BOENISCH, 2001). Para minimizar este efeito, utilizaram-se sistemas de bloqueio, que diminuem a ligação inespecífica dos anticorpos (primário e secundário) à amostra. Desta forma, melhora-se o contraste entre a cor resultante da marcação específica e a reação de fundo. O uso de albumina bovina é recomendado para favorecer a ligação específica de imunoglobulinas G (IgG) a seus antígenos, sendo o método mais amplamente utilizado para o bloqueio de reações inespecíficas em testes imunológicos que empregam anticorpos da classe IgG (BOENISCH, 2001). O uso de leite desnatado baseia-se na competição entre as proteínas do leite e os anticorpos do teste pelos antígenos da amostra. O leite atua eliminando sítios de possíveis reações cruzadas, tanto do anticorpo primário quanto do secundário, pela sua ligação inespecífica com proteínas da amostra (DUHAMEL et al, 1985). O uso de soro, neste caso o soro de um animal da mesma espécie na qual foi produzido o anticorpo secundário, não imunizado com o antígeno de interesse, tem o mesmo princípio. Porém, espera-se uma competição mais dirigida aos sítios comuns entre as imunoglobulinas do soro e a ligação inespecífica do anticorpo secundário (BOENISCH, 2001).

Com o anticorpo monoclonal, além do padrão difuso, associado à síntese da proteína, observamos um padrão focal, também citoplasmático. Uma possível explicação para o padrão focal seria a associação da β_2 GPI com regiões de degeneração celular. Porém, a marcação citoplasmática focal foi negativa na coloração de hematoxilina-eosina que identificaria substância hialina (figura 13B) e no vermelho Congo, para substância amilóide (figura 13C). A coloração HE mostrou também que não há presença de infiltrado

inflamatório nem alterações celulares inflamatórias no tecido hepático (figura 5). Como não foi possível atribuir à degeneração celular, a nossa hipótese atual é que esse padrão corresponda a estruturas de secreção ou armazenamento intracelular da proteína. Entretanto, não é possível excluir a ligação da proteína a corpos apoptóticos e antígenos lipídicos modificados que seriam englobados por fagócitos não profissionais. Esta hipótese corresponde à proposta de Chonn e colaboradores (1995) e nunca teve demonstração histológica. Nossos dados não permitem confirmar ou excluir nenhuma destas duas hipóteses. Para isso, serão necessários estudos de ultra-estrutura.

β_2 GPI e modelo experimental de sepse associada à translocação bacteriana

Os dados mostrados nas figuras 9 e 10 e nos gráficos 1-3, mostram aumento na marcação difusa no fígado de ratos submetidos à sepse pela inoculação de endovenosa de bactérias *E. coli* R-6. Este aumento não foi observado nos animais sujeitos à sepse iniciada a partir da translocação bacteriana através da parede intestinal. A marcação citoplasmática difusa, nos hepatócitos localizados na região centrolobular é sugestiva da síntese local de β_2 GPI. A marcação é presente nos animais controles e aumenta em resposta à inoculação de bactérias *E. coli* R-6 na circulação (figuras 9 e 10). A marcação focal, não se modificou pela infecção, em nenhum dos grupos experimentais.

O resultado é compatível com a literatura que situa a β_2 GPI como uma proteína de fase aguda. A β_2 GPI é sintetizada principalmente no fígado. Seu RNAm é expresso nas células de linhagem hepática HepG2 e Hep3B, demonstrado em diversos tecidos de humanos, ratos e camundongos (DAY et al, 1992; STEINKASSERER et al, 1992; SELLAR et al, 1994). O gene da β_2 GPI é estritamente relacionado ao status proliferativo das células hepáticas. Foi sugerido que esta proteína pode manter a vitalidade das células do fígado quando expostas à diferentes fatores de estresse, como regeneração após hepatectomia parcial e depleção de fatores do crescimento (AVERNA et al, 2004).

Embora no modelo considerado não seja possível evidenciar morfológicamente alterações celulares inflamatórias no tecido hepático (figura 5), a resposta hepática de produção de mediadores é presente nestes tempos após a inoculação. Menchaca-Diaz (2003) mostrou que a sepse com inóculo

10^9 UFC/mL foi suficiente para provocar o óbito em 84.6% dos animais inoculados e sobrevida média de 26 horas. No mesmo modelo, um inóculo de 10^{10} UFC/mL é 100% letal em 5 horas e um inóculo de 10^7 UFC/mL não é letal (KOH, et al, 1998a; MENCHACA-DIAZ, 2003).

Foi demonstrado que a depuração de bactérias da circulação acontece, principalmente, na primeira hora após a inoculação (KOH et al., 1998a). Bactérias inoculadas na circulação sistêmica são depuradas mais lentamente do que as inoculadas no sangue portal, por um fator de 55 vezes (KOH et al., 1998b). Esta diferença na velocidade de depuração, tem relevância clínica: no modelo de sepse semi-letal com *E.Coli* R-6, animais inoculados no sangue portal têm mortalidade maior do que os animais inoculados na veia cava. Por isso, é de se supor que o controle do processo inflamatório pela resposta hepática de fase aguda seja importante. Assim, é possível que, diferenças na distribuição das bactérias pelos órgãos sólidos determinem a maior produção hepática da β_2 GPI, como uma proteína imuno-reguladora nos animais do grupo S. Nos animais do grupo TB, mesmo considerando-se que a via importante para a invasão sistêmica seja hematogênica, a principal barreira permanece sendo o linfonodo regional.

A presença de bactérias nos linfonodos mesentéricos tem sido usada como critério de diagnóstico de translocação bacteriana (BERG & GARLINGTON, 1979; DEITCH et al., 1986 e 1990; WELLS et al., 1990; MAINOUS et al., 1991; ALEXANDER et al., 1991; BRATHWAITE et al., 1993; GAUTREAUX et al., 1994; KOH et al., 1996c; LJUNGDAHL et al, 2000). Entretanto, não foi confirmada a presença de bactérias na linfa eferente (MAINOUS et al., 1991; KOH et al., 1996c). Em um estudo recente, aplicado

ao modelo de translocação bacteriana por inoculação de bactérias *E. coli* R-6 na luz intestinal, foi observada a presença de bactérias vivas no linfonodo mesentérico de 100% e 0% nos controles, com 100% de negatividade na linfa (RUIZ-SILVA et al., 2002).

Os resultados obtidos para a marcação intestinal, mostrados nas figuras 11 e 12, sugerem que a produção local ou a distribuição da proteína pode depender da via de infecção. Segundo Aversa e colaboradores, a β_2 GPI é produzida e pode ser localizada no citoplasma de enterócitos tanto na superfície quanto no epitélio glandular, sendo negativas as células globosas secretoras de muco e as células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos da submucosa (AVERNA et al, 1997). Nossos resultados não mostraram a marcação nas células glandulares, porém as células do endotélio dos vasos sanguíneos e linfáticos na região submucosa, bem como as células do infiltrado inflamatório apresentam forte marcação no grupo TB, uma menor intensidade de marcação nos animais dos grupos S e CS e praticamente nenhuma marcação nos animais do grupo CTB (figuras 11 e 12). Esta distribuição é compatível com a prevalência da síntese e secreção local da proteína, sendo esperado que a manipulação da mucosa possa resultar nessa diminuição da expressão. Nesse sentido, o aumento observado no grupo TB pode até estar subestimado pelo desenho experimental, que inclui a obstrução do fluxo durante o período de 2h. A associação entre a proteína e inflamação foi evidenciada pela demonstração do infiltrado inflamatório na região submucosa nos cortes corados pela hematoxilina-eosina (figura 6). Nesse sentido, de acordo com as teorias atuais da fisiopatologia da sepse, a inflamação da mucosa intestinal é presente em todos os modelos. Entretanto,

quando a infecção inicia-se na mucosa, esta pode produzir mediadores inflamatórios locais e ativar o endotélio vascular mais precocemente do que nas situações em que a inflamação da mucosa intestinal é secundária ao processo sistêmico (Carrico et al., 1986; Berg, 1999). De fato, o intestino é sugerido como um possível reservatório de bactérias para infecções sistêmicas (MARSHALL et al., 1988; MACFIE, et al., 1999) o que implica a produção de imuno-reguladores como um processo contínuo. As principais alterações morfo-funcionais observadas no modelo são associadas à microcirculação. Em um estudo recente, Koh e colaboradores (2002) mostraram dano expressivo e duradouro da microcirculação mesenterial, decorrente de um único episódio de TB, com inoculação de bactérias *E. coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) na luz intestinal, a partir das primeiras 2 horas até 14 dias.

O padrão de marcação hepática e intestinal β_2 GPI é compatível com o papel imunomodulador sugerido para esta proteína.

6. CONCLUSÃO

A β_2 GPI pode ser demonstrada por reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal específico clone 5F7 em cortes de tecido de fígado e de intestino de rato, revelados com o sistema EnVision®-fosfatase alcalina.

A β_2 GPI é encontrada tanto no fígado quanto, no intestino dos ratos utilizados como controle dos ensaios de infecção, confirmando relatos da literatura.

Dois padrões de marcação são observados no fígado de ratos. Um padrão citoplasmático difuso, com distribuição predominantemente perivascular, corresponde ao descrito na literatura para os sítios de produção da proteína. Um padrão focal, com regiões citoplasmáticas fortemente marcadas, não tem correspondente na literatura. As regiões de marcação focal não puderam ser identificadas com regiões de degeneração hialina ou depósito de substância amilóide, sendo sugerido que correspondam a regiões de secreção da proteína. Ambos os padrões são observados nos animais controle.

A β_2 GPI marca a região submucosa dos cortes de intestino de ratos, com marcação difusa extracelular fraca, associada à infiltrado inflamatório. Nesta região, aparecem fortemente corados o citoplasma de algumas células mononucleares esparsas e a camada endotelial de capilares sanguíneos e linfáticos, bem delimitada. As células glandulares da mucosa são negativas para esta marcação.

Nos animais submetidos à indução de sepse por inoculação de *Escherichia coli* cepa R-6 pela via endovenosa, mas não daquela associada à translocação bacteriana pela parede intestinal, aumenta a área de marcação

hepática para β_2 GPI com padrão difuso. A densidade de marcação citoplasmática focal não é modificada pela sepse.

A marcação intestinal mostrou aumento, em relação aos controles, nos animais submetidos à translocação bacteriana através da mucosa intestinal. Esta diferença não foi importante no grupo dos animais submetidos à sepse por inoculação de *Escherichia coli* cepa R-6 pela via endovenosa.

7. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.W.; GIANOTTI, L.; PYLES, T.; CAREY, M.A.; BABCOCK, G.F.
Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.213, n.6, p.558-66, 1991.
- ALVES, VAF; BACCHI, CE; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**.
Sociedade Brasileira de Patologia: São Paulo, 1999. 269p.
- ANDERSON, B.O.; BROWN J.M.; HARKEN A.H.; Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. **J. Surg. Res.**, Philadelphia, v.51, n.2, p.179-180, 1991.
- ANTONSSON, J.B.; FIDDIAN-GREEN, R.G. The role of the gut in shock and multiple system organ failure. **Eur. J. Surg.**, Stockholm, v.157, n1, p.3-12, 1991.
- AOYAMA, Y.; CHAN, Y.L.; WOOL, I.G. The primary structure of rat β_2 -glycoprotein I. **Nucleic Acids Res.**, London, v.17, n.15, p.6401, 1989.

*As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

AVERNA, M.; PARAVIZZINI, G.; MARINO, G.; EMMANUELE, G.; CEFALÙ, A.B.; MAGRO, C.; BARTOLONI, G.; RAGUSA, M.; NOTO, D.; BARBAGALLO, C.M.; CALLARI, D.; MAZZARINO, M.C.; NOTASBASTOLO, A.; TRAVALI, S. Beta-2-glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Oxford, v.36, p.1297-1305, 2004.

AVERNA, M.; PARAVIZZINI, G.; MARINO, G.; LANTERI, E.; CAVERA, G.; BARBAGALLO, C.M.; PETRALIA, S.; CAVALLARO, S.; MAGRO, G.; GRASSO, S.; NOTARBARTOLO, A.; TRAVALI, S. Liver is not the unique site of synthesis of β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H): evidence for an intestinal localization. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, Berlin, v.27, p.207-212, 1997.

AVERY, V.M.; ADRIAN, D.L.; GORDON, D.L. Detection of mosaic protein mRNA in human astrocytes. **Immunol. Cell Biol.**, Adelaide, v.71, n.3, p.215-219, 1993.

BALASUBRAMANIAN, K.; CHANDRA, J.; SSCHOROIT, A. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes: the role of β_2 -glycoprotein I in macrophage recognition. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, p.31113-31117, 1997.

BALASUBRAMANIAN, K.; SCHOROIT, A. Characterization of phosphatidylserine-dependent β_2 -glycoprotein I macrophage interactions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.29272-29277, 1998.

- BARSHACK, I.; KEREN, P.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J.; KEREN, G.; GEORGE, J. Relation of preexisting anti-beta2GPI antibodies to infarct size in a rat model. **Cardiovasc. Pathol.**, New York, v.12, n.4, p.195-201, 2003.
- BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1976. p.30.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **J. Med.**, Basel, v.23, p.217-244, 1992.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v.473, p.11-30, 1999.
- BERG, R.D.; GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.23, n.2, p.403-411, 1979.
- BLANK, M.; KRAUSE, I.; FRIDKIN, M.; KELLER, N.; KOPOLOVIC, J.; GOLDBERG, I.; TOBAR, A.; SHOENFELD, Y. Bacterial induction of autoantibodies to β_2 -glycoprotein I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. **J. Clin. Invest.**, New York, v.109, p.797-804, 2002.
- BOENISCH, T. **Immunochemical Staining Methods**. 2001. Disponível em: <http://www.dakousa.com/ihcbook/hbcontent.htm>. Acesso em: 8 maio 2003.

- BRATHWAITHE, C.E.; ROSS, S.E.; NAGELE, R. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *J. Trauma.*, Baltimore, v.34, n.4, p.586-590, 1993.
- BRIGHTON, T.A.; DAI, Y.; HOGG, P.J.; CHESTERMAN, C.N. Microheterogeneity of β_2 -glycoprotein I: implications for binding to anionic phospholipids. **Biochem. J.**, London, v.340, p.59-67, 1999.
- BRIGHON, T.A.; CHESTERMAN, C.N. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. **Baillieres Clin. Haematol.**, Philadelphia, v.7, p.541-547, 1994.
- CAI, G.; GUO, Y.; SHI, J. Purification of apolipoprotein H by polyethylene glycol precipitation. **Protein Expression Purif.**, San Diego, v.8, p.341-346, 1996.
- CANTONI, L.; ROSSI, C.; RIZZARDINI, M.; GADINA, M.; GHEZZI, P. Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids. **Biochem. J.**, London, v.279, n.3, p.891-894, 1991.
- CARONTI, B.; CALDERARO, C.; ALESSANDRI, C.; CONTI, F.; TINGHINO, R.; PALLADINI, G.; VALESINI, G. β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in antiphospholipid syndrome-related tissue damage. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.115, p.214-219, 1999.
- CARONTI, B.; PITTONI, V.; PALLADINI, G.; VALESINI, G. Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies bind to central nervous system. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v.156, p.211-219, 1998.

- CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODEROSO, J.J.;
BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and
formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils.
FEBS Lett., Amsterdam, v.341, n.1, p.65-68, 1994.
- CARRICO, C.J.; MEAKINS, J.L.; MARSHALL, J.C.; FRY,D.; MAIER, R.V.
Multiple-organ-failure syndrome. **Arch. Surg.**, Chicago, v.121, n.2, p.196-
208, 1986.
- CHAMLEY, L.W.; ALLEN, J.L.; JOHNSON, P.M. Synthesis of beta2
glycoprotein 1 by the human placenta. **Placenta.**, London, v.18, n.5-6,
p.403-410, 1997.
- CHONN, A.; SEMPLET, S.C.; CULLIS, P.R. β_2 -glycoprotein I is a major protein
associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a
significant role in the immune clearance of non-self particles. **J. Biol.**
Chem., Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.
- CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.;
HOBBS, A.J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-
and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J. Immunol.**, Baltimore, v.166,
n.6, p.3873-3881, 2001.
- CONTI, F.; SORICE, M.; CIRCELLA, A.; ALESSANDRI, C.; PITTONI, V.;
CARONTI, B.; ALDERARO, C.; GRIGG, T. β_2 -glycoprotein I expression on
monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and
correlates with tissue factor expression. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v132,
p.509-516, 2003.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. **Brit. J. Surg.**, Bristol, v.84, p.920-935, 1997.

DAY, A.J.; CAMPBELL, R.D.; REID, K.B.M. The mosaic nature of the complement proteins. In: MELCHERS, F. **Progress in immunology VII**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, p.209-212, 1989.

DAY, J.R.; O'HARA, P.J.; GRANT, F.J.; LOFTON-DAY, C.; BERKAW, M.N.; WERNER, P.; ARNAUD, P. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding human apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). **Int. J. Clin Lab. Res.**, Berlin, v.21, n.3, p.256-263, 1992.

DEITCH, E.A. Bacterial translocation of the gut flora. **J. Trauma**., Baltimore, v.30, p.184-189, 1990.

DEITCH, E.A. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.216, p.117-134, 1992.

DEITCH, E.A.; WINTERTON, J.; BERG, R. Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mice with impaired T-cell-mediated immunity. **Arch. Surg.**, Philadelphia, v.121, n.1, p.97-101, 1986.

DEITCH, E.A.; WINTERTON, W.; BERG, R. The gut as a portal of entry for bacteremia. Role of protein malnutrition. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.205, n.6, p.681-692, 1987.

DEL PAPA, N.; SHENG, Y.H.; RASCHI, E.; KANDIAH, D.A.; TINCANI, A.; KHAMASHTA, M.A.; ATSUMI, T.; HUGHES, G.R.V.; ICHIKAWA, K.; KOIKE, T.; BALESTRIERI, G.; KRILIS, S.A.; MERONI, P.L. Human β_2 -glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipids binding and offers epitopes for anti- β_2 -glycoprotein I antibodies. **J. Immunol.**, Baltimore, v.160, p.5572-5578, 1998.

DIETER, P.; AMBS, P.; FITZKE, E.; HIDAKA, H.; HOFFMANN, R.; SCHWENDE, H. Comparative studies of cytotoxicity and the release of TNF-alfa, nitric oxide, and eicosanoids of liver macrophages treated with lipopolyssacharide and liposome-encapsulated MTP-PE. **J. Immunol.**, Baltimore, v.155, n.5, p.2595-2604, 1995a.

DIETER, P.; FITZKE, E. Differential regulation of phospholipase-D and phospholipase-C by protein kinase-C-beta and protein-kinase-c-delta in liver macrophages. **Cell Signal.**, Oxford, v.7, n.7, p.687-694, 1995b.

DIETER, P.; SCHEIBE, R.; JAKOBSON, P.J.; WATANABE, K.; KOLADA, A.; KAMIONKA, S. Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.276, n.2, p.488-492, 2000.

DUHAMEL, R.C.; JOHNSON, D.A.J. Use of nonfat dry milk to block nonspecific nuclear and membrane staining by avidin comjugates. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.33, n.7, p.711-714, 1985.

- GALASKA, M.; KEIL, L.B.; KOHLES, J.D.; KELTY, S.P.; PETERSHEIM, M.; DEBARI, V.A. A stable, multi-subunit complex of β_2 -glycoprotein I. **Thromb. Res.**, Oxford, v.90, p.131-137, 1998.
- GAUTREAUX, M.D.; DEITCH, E.A.; BERG, E.D. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.62, n.7, p.2874-2884, 1994.
- GEORGE, J.; GILBURD, B.; LANGEVITZ, P.; LEVY, Y.; NEZLIN, R.; HARATS, D.; SHOENFELD, Y. β_2 -Glycoprotein I containing immune-complexes in lupus patients: association with thrombocytopenia and lipoprotein (a) levels. **Lupus.**, Basingstoke, v.8, p.116-122, 1999.
- GOLDSMITH, G.H.; PIERANGELLI, L.S.; BRANCH, D.W.; GHARAVI, A.E.; HARES, E.N. Inhibition of protrombin activation by antiphospholipids antibodies and β_2 -glycoprotein I. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.87, p.548-554, 1994.
- GOMES, L.F.; ALVES, A.F.; SEVANIAN, A.; PERES, C.A.; CENDOROGLIO, M.S.; MELLO-ALMADA FILHO, C.; QUIRINI, L.M.; RAMOS, L.R.; JUNQUEIRA, V.B.C. Role of β_2 -glycoprotein I, LDL -, and antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. **Antiox. Redox Signal.**, Larchmont, v.6, n.2, p.237-244, 2004a.
- GOMES, L.F.; GONÇALVES, L.M.; FONSECA, F.L.A.; CELLI, C.M.; VIDELA, L.A.; JUNQUEIRA, V.B.C. β_2 -glycoprotein I (Apolipoprotein H) modulates uptake and endocytosis associated chemiluminescence in rat Küpffer cells. **Free Rad. Res.**, Amsterdam, v.36, n.7, p.741-747, 2002.

- GOMES, L.F.; KNOX, P.R.; SIMON-GIAVAROTTI, K.A.; JUNQUEIRA, V.B.C.; SANS, J.; VIDELA, L.A. Beta2-glycoprotein I inhibition of mouse Kupffer cells respiratory burst depends on liver architecture. *Comp. Hepatol.*, London, v.3, n.1, p.S43, 2004b. Disponível em: <http://comparative-hepatology.com/content/3/S1/S43>. Acesso em: 31 julho 2005.
- HAMMEL, M.; SCHWARZENBACHER, R.; GRIES, A.; KOSTNER, G.M.; LAGGNER, P.; PRASSL, R. Mechanism of the interaction of β_2 -GPI with negatively charged phospholipid membranes. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.14173-14181, 2001.
- HEUMAN, D.; GLAUSER, M.P.; CALANDRA, T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v.1, n.1, p.49-55, 1998.
- HOFFMAN, W.D.; DANNER, R. L.; QUEZADO, Z.M.N.; BANKS, S.M.; ELIN, R.J.; HOSSEINI, J.M.; NATANSON, C. Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and lethality: Virulence and nonvirulent *Escherichia coli* challenges in a canine model of septic shock. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.64, n.2, p.406-412, 1996.
- HORBACH, D.A.; OORT, E.; LISMAN, T.; MEIJERS, J.C.M.; DERKSEN, R.H.W.M.; GROOT, P.G. β_2 -glycoprotein I is proteolytically cleaved *in vivo* upon activation of fibrinolysis. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.81, p.87-95, 1999.

- HORBACH, D.A.; OORT, E.; TEMPELMAN, J.M.; DERKSEN, R.H.W.M.; GROOT, P.G. The prevalence to a non-phospholipid-binding form of β_2 -glycoprotein I in human plasma. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.80, p.791-797, 1998.
- ITOH, Y.; INUZUKA, K.; KOHNO, I.; WADA, H.; SHIKU, H.; OHKURA, N.; KATO, H. Highly increased plasma concentrations of the nicked form of beta₂ glycoprotein I in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V. **J. Biochem.**, Tokyo, v.128, p.1017-1024, 2000.
- KANDIAH, D.A.; KRILIS, S.A. Beta 2-glycoprotein I. **Lupus.**, Basingstoke, v.3, n.4, p.207-212, 1994.
- KLAERKE, D.A.; ROJKJAER, R.; CHRISTENSEN, L.; SCHOUSBOE, I. Identification of β_2 -glycoprotein I as a calmodulin affinity chromatography. **Bioch. Bioph. Acta.**, Amsterdam, v.1339, p.203-216, 1997.
- KOH, I.H.J.; MONTERO, E.; KELLER, R.; SILVA, M. GOLDBERG, S.; SILVA, R. Can the portal vein be a conduit for bacterial translocation? **Transplant. Proc.**, New York, v.28, p.2671, 1996a.
- KOH, I.H.J.; MONTERO, E.F.S.; KELLER, R. Can bacterial translocation to the mesenteric lymph node be correlated with systemic infection? **Transplant. Proc.**, New York, v.30, p.2663, 1996b.

KOH, I.H.J.; MONTERO, E.F.S.; NETO, U.F.; FAINTUCH, S.; SHRAIBMAN, V.; SILVA, R.M. Clearance of Lethal and Non-lethal Concentrations of Bacteria from Systemic Circulation. **Transplant. Proc.**, New York, v.30, p.2564-2565, 1998a.

KOH, I.H.J.; MONTERO, E.F.S.; NETO, U.F.; SHRAIBMAN, V.; FAINTUCH, S.; SILVA, R.M. Increased Bacterial Clearance with Portal Bacterial Challenge Compared to Systemic Bacterial Challenge. **Transplant. Proc.**, New York, v.30, p.2565-2566, 1998b.

KOH, I.H.J.; MENCHACA-DIAZ, J.L.; FARSKY, S.H.P.; SIQUEIRA, A.F.R.; RUIZ-SILVA, M.; PUPPI, J.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; SILVA, R.M. Injuries to the mesenteric microcirculation due to bacterial translocation. **Transplant. Proc.**, New York, v.34, p.1003-1004, 2002.

KOH, I.H.J.; SILVA, R.M. Novel in vitro small intestinal graft model for study of bacterial in the rat. **Transplant. Proc.**, New York, v.28, p.2667-2668, 1996c.

KRINKE, G. The laboratory rat. London: Academic Press, 2000. 756p.

LJUNGDAHL, M.; LUNDHOLM, M.; KAGLUND, U.; RASMUSSEN, I.; HAGLUND, U. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v.35, n.4, p. 389-97, 2000.

LOZIER, J.; TAKAHASHI, N.; PUTNAM, F.W. Complete amino acid sequence of human plasma β -2-glycoprotein I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.81, p.3640-3644, 1984.

MACFIE, J.; O'BOYLE, C.J.; MITCHELL, C.J.; BUCKLEY, P.M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origem of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut.*, London, v.45, p.223-228, 1999. Disponível em: <http://gut.bmjjournals.com/cgi/content/full/45/2/223>. Acesso em: 31 julho 2005.

MAINOUS, M.; TSO, P.; BERG, R.D. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **Arch. Surg.**, Chicago, v.126, p.33-37, 1991.

MARSHALL, J.C.; CHISTOU, N.V.; HORN, K. The microbiology of multiple organ failure. The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. **Arch. Surg.**, Chicago, v.123, p.309-315, 1988.

MATOS, G.F.J.; VICTORINO, J.A. Critérios para o diagnóstico de sepse, sepse grave e choque séptico. **Consenso Brasileiro de Sepse**. Disponível em: <http://medicinaintensiva.com.br/consenso-sepse.html>. Acesso em 23 jun 2005.

MATSUURA, E.; INAGAKI, J.; KASAHARA, H.; YAMAMOTO, D.; ATSUMI, T.; KOBAYASHI, K.; KAIHARA, K.; ZHAO, D.; ICHIKAWA, K.; TSUTSUMI, A.; YASUDA, T.; TRIPLETT, D.A.; KOIKE, T. Proteolytic cleavage of β_2 -glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. **Int. Immunol.**, Oxford, v.12, n.8, p.1183-1192, 2000.

- MAYER, L.; YIO, X.Y.; PANJA, A.; CAMPBELL, N. Non professional antigen presentation: new rules and regulations. In: KAGNOFF, M.F., KIYONO, H. eds. **Essentials of mucosal Immunology**. San Diego: Academic Press, 1996.
- MCCUSKEY, R.S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **Liver.**, Copenhagen, v.20, n.1, p.3-7, 2000.
- MEAKINS, J.L.; MARSHALL, J.C. The gut as the motor of multiple system organ failure. In: MARSTON, A.; BULKLEY, G.B.; FIDDIAN-GREEN, R.G.; HAGLUND, U.F. **Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure**. London: Edward Arnold, 1989. p.339-348.
- MENCHACA-DIAZ, J.L. **Translocação bacteriana na vigência da sepse e sua influência na evolução clínica da sepse. Estudo experimental**. São Paulo, 2003. 84p. Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo.
- MENCHACA-DIAZ, J.L.; SILVA, R.M.; SIQUEIRA, A.F.R.S.; RUIZ-SILVA, M.; BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; KOH, I.H.J. Changes in bacterial translocation profile induced by sepsis. **Transplant. Proc.**, New York, v.34, n.3, p.1007-1008, 2002.
- MICHALANY, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3ª edição. São Paulo: Michalany, 1998. 295p.

- MONCURE, M.; BRATHWAITE, C.E.M.; SAMAHA, E.; MARBURGER, R.; ROSS, S.E. Carboxyhemoglobin elevation in trauma victims. **J. Trauma**, Baltimore, v.46, n.3, p.424-427, 1999.
- MOORE, F.A.; MOORE, E.E.; PORGETTI, R.; McANENA, O.J.; PETERSON, V.M.; ABERNATHY, C.M.; PARSONS, P.E. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. **J. Trauma**, Baltimore, v.31, n.5, p.629-638, 1991.
- NAITO, M.; HAZEGAWA, G.; TAKAHASHI, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v.39, n.4, p.350-364, 1997.
- NIEUWENHUIJZEN, G.A.; DEITCH, E.A.; GORIS, R.J. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. **J. Anat.**, London, v.189, n.3, p.537-48, 1996.
- O'BOYLE, C.J.; MACFIE, J.; MICHELL, C.J.; JHOSTONE, D.; SAGAR, P.M.; SEDMAN, P.C. Microbiology of bacterial translocation in humans gut. *Gut*, London, v.42, p.29-35., 1998. Disponível em: <http://gut.bmjjournals.com/cgi/content/full/42/1/29>. Acesso em 31 julho 2005.
- OHKURA, N.; HAGIHARA, Y.; YOSHIMURA, T.; GOTO, Y.; KATO, H. Plasmin Can Reduce the Function of Human b₂ Glycoprotein I by Cleaving/ **Blood**, New York, v.91, n.11, p.4173-4179, 1998.
- POLZ, E.; WURM, H.; KOSTNER, G.M. Investigations on β_2 -glycoprotein I in the rat: isolation form serum and demonstration in lipoprotein density fractions. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.11, n.3-4, p.265-270, 1980.

RIGATO, O.; SILVA, E.; KALLAS, E.G.; BRUNIALTI, M.K.C.; MARTINS, P.S.; SALOMÃO, R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. **Curr. Drug. Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.**, Hilversum, v.1, n.1, p.13-30, 2001.

ROGOFF, T.M.; LIPZKY, P.E. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. **Gastroenterology**., Baltimore, v.80, n.4, p.854-860, 1981.

RUIZ-SILVA, M.; SILVA, R.M.; MENCHACA-DIAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.; BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R.; TAJIKI, M.H.; SALOMÃO, R.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; KOH, I.H.J. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. **Transplant. Proc.**, New York, v.34, p.1001-1002, 2002.

SANGUERA, D.K.; KRISTENSEN, T.; HAMMAN, R.F.; KAMBOH, M.I. Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) protein polymorphism. **Hum. Genet.**, Berlin, v.100, p.57-62, 1997a.

SANGUERA, D.K.; WAGENKENECHT, D.R.; McINTYRE, J.A.; KAMBOH, M.I. Identification of structural mutations in fifth domain of Apolipoprotein H which affect phospholipid binding. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.6, p.311-316, 1997b.

SCHULTZ, H.E., HEIDE, K., HAUPT, H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekul es beta2-globulin humanserums. **Naturwissenschaften**., Berlin, v.48, p.719-726, 1961.

- SELLAR, G.C.; STEEL, D.M.; ZAFIROPOULOS, A.; SEERY, L.T.; WHITEHEAD, A.S. Characterization, expression and evolution of mouse beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H). **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, New York, v.200, p.1521-1528.
- SHI, J.; YOSHIHIRO, K.; OHASHI, T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. **Blood.**, New York, v.98, n.4, p.1226-1230, 2001.
- SILVA, R.; KELLER, R.; MONTERO, E.; SILVA, M. GOLDBERG, S.; KOH, I.H.J. Can Bacterial Translocation to the Mesenteric Lymph Node Be Correlated with Systemic Infection? **Transplant. Proc.**, New York, v.28, p.2673-2674, 1996a.
- SILVA, R.; KELLER, R.; MONTERO, E.; SILVA, M. GOLDBERG, S.; KOH, I.H.J. Role of Peyer's Patch in Bacterial Translocation. **Transplant. Proc.**, New York, v.28, p.2672-2673, 1996b.
- SILVA, R.M.; MONTERO, E.F.S.; NETO, U.F.; KOH, I.H.J. The role of the small bowel as a barrier for bacterial septic shock. **Transplant. Proc.**, New York, v.30, p.2553-2554, 1998.
- STEINKASSERER, A.; COCKBURN, D.J.; BLACK, D.M.; BYD, Y.; SOLOMON, E.; SIM, R.B. Assignment of apolipoprotein H (APOH: beta-2-glycoprotein I) to human chromosome 17q23-qter; determination of the major expression site. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v.60, p.31-33, 1992.

- WALSH, M.T.; WATZLAWICK, H.; PUTNAM, R.W.; SCHMID, K.; BROSSMER, R. Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of beta 2-glycoprotein I. Implications for the biosynthesis and folding of glycoproteins. **Biochemistry**, Washington, v.29, p.6250-6257, 1990.
- WELLS, C.L.; JECHOREK, R.P.; ERLANDSEN, S.L. Evidence for the translocation of enterococcus faecalis across the mouse intestinal tract. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.162, n.1, p.82-90, 1990.
- WOLOCHOW, H.; HILDEBRAND, G.J.; LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.116, p.523-529, 1966.
- YAN, X.; MORSELT, H.W.M.; SCHERPHOF, G.L.; POELSTRA, K.; KAMPS, J.A.A.M. The role of β_2 -glycoprotein I in liposome-hepatocyte interaction. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1667, p.208-214, 2004.
- ZHANG, J.; MCCRAE, K.R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. **Blood**, New York, v.105, n.5, p.1964-1969, 2005.

ANEXO

Of. CEEA n° 11**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Modulação funcional de fagócitos na circulação porta por $\beta 2$ glicoproteína I” (Protocolo nº12), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Sheila Vieira da Cruz e do orientador(a) Lígia Ferreira Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 02/06/2003.

São Paulo, 03 de junho de 2003.

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*