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

A β_2 -Glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de
fase aguda

Elisângela Monteiro Pereira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2010

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

A β_2 -Glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de
fase aguda

Elisângela Monteiro Pereira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2010

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

P436b Pereira, Elisângela Monteiro
A β_2 -glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de
fase aguda / Elisângela Monteiro Pereira. -- São Paulo, 2010.
138p.

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

Orientador: Gomes, Lígia Ferreira

1. Bioquímica clínica 2. Biologia celular 3. Teste
imunoenzimático : ELISA : Medicina 4. Inflamação : Medicina
I. T. II. Gomes, Lígia Ferreira, orientador.

616.0756 CDD

Elisângela Monteiro Pereira

A β_2 -glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de fase aguda

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus queridos pais, Élia e Sebastião

*Vocês são fundamentais em todas as etapas da minha vida.
Qualquer obstáculo é mais fácil de ser vencido diante do amor, da
força e das orações que me prestam.
Obrigada... Muito obrigada!*

A Deus,

*“Eu Te louvarei, de todo o meu coração;
na presença dos deuses a Ti cantarei louvores.
Inclinar-me-ei para o Teu Santo Templo,
e louvarei o Teu nome pela Tua benignidade, e pela Tua verdade;
pois engrandeceste a Tua palavra acima de todo o Teu nome.
No dia em que eu clamei, me escutaste;
e alentaste com força a minha alma...”*

Salmo 138

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Lúgia Ferreira Gomes, pela carinhosa acolhida, pelos ensinamentos e compartilhamento dos seus conhecimentos científicos e das suas experiências de vida, pelo carinho de irmãos recebido de seus filhos Gabriel e Marina.

Aos colegas integrantes do nosso grupo Fernanda Martins Pozzi, Júlia Havandjian Begalli, Carolina Nigro Stella, Lucas Vicente da Silva, Cássia Prado, Andréia Silva Ramos, Flávia Cristina de Oliveira, Willian Alves dos Santos, Sara Virginia Martins Amorim Vaz, Daniel Simioni, pelo espírito de colaboração, pela amizade e por suportarem as minhas músicas.

Aos colegas de laboratório Andréia Bartachini Gomes, Cristiane Rocha de Farias, Maria Cristina Cabral Garcia, Fabiana Maria dos Anjos, Noeli Maria Espíndola e aos técnicos, Alberto Hiroshi Iha e Elaine Moura Augusto pelo apoio diário, pela troca de experiências, pela amizade e também, por suportarem as minhas músicas.

Às professoras Dra. Adelaide José Vaz e Dra. Kioko Takei, pelo espaço dividido com nossa equipe, pelo carinho, pelos conselhos, pelas orientações.

Às equipes dos pesquisadores do nosso departamento, Dr. Sandro Rogério de Almeida, Dra. Ana Campa, Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdala, Dra. Primavera Borelli, Dra. Marina Baquerizo Martinez, Dra. Elza Masae Mamizuka, Dra. Irene da Silva Soares, Dra. Silvy Stuchi Maria Engler e Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros pela colaboração nos ensaios e pelo espírito acadêmico.

À professora Dra. Maria Júlia Manso Alves, que possibilitou as leituras de quimiluminescência no luminômetro de placa do seu laboratório, no Instituto de Química da USP.

Às equipes dos pesquisadores da UNIFESP, Dr. Reinaldo Salomão, pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo e pelas amostras de soro dos pacientes com sepse; Dr. Ivan Hong Jun Koh, pelo modelo experimental de sepse e translocação bacteriana; Dr. Hugo Pequeno Monteiro pela linhagem de células THP-1; Dra. Karin Argenti Simon e Dra. Virgínea Berlanga Campos Junqueira pelas colaborações durante a realização desse trabalho, pelos longos debates científicos. Obrigada a todos pela carinhosa receptividade.

Aos amigos de Bom Sucesso, de Alfenas, de São Paulo, pelas comemorações em cada etapa vencida, pela força em cada etapa difícil, pela torcida incondicional.

À grande amiga Tatiane Vanessa de Oliveira, pela parceria, pela paciência, pelos conselhos, pelos momentos de descontração, pelo carinho (seu e de seus familiares).

Às minhas irmãs Elisa Cristina Monteiro Pereira, Elissandra Monteiro Pereira, aos meus sobrinhos Thaísa Mara Pereira Silva, Nelson Sérgio Faria, Alisson Anderson Faria, aos meus tios, aos meus primos, aos meus cunhados Áureo Faria e Fábio Barbosa, pelo estímulo, pela confiança, pela alegria contagiante, pelas orações.

À minha avó Diva, por ensinar-me a lembrar sempre que a essência da vida está na capacidade de amar: “Dando amor ou fazendo com amor, a felicidade está garantida.”

À Mãe-Rainha que me protegeu e intercedeu por mim junto a Deus. Terei-te sempre no meu coração e em ti serei sempre confiante!

RESUMO

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína de fase aguda, produzida principalmente no fígado e intestino. Os efeitos dessa proteína sobre células mononucleares foram investigados tanto em monócitos humanos de sangue periférico quanto em células promonocíticas humanas da linhagem celular ATCC THP-1. As correlações entre sua concentração plasmática e a intensidade da inflamação sistêmica foram avaliadas em humanos e em um modelo experimental de infecção sistêmica, em ratos. Nenhum efeito da β_2 GPI foi observado sobre a resposta oxidativa de monócitos de sangue periférico durante a fagocitose de zymosan opsonizado ou de *S. aureus*, analisada respectivamente por quimiluminescência amplificada por luminol ou por citometria de fluxo. A β_2 GPI estimulou a viabilidade celular e estimulou a diferenciação dos promonócitos. As células THP-1 tratadas com β_2 GPI apresentaram adesão aumentada a placas de cultura bem como expressão aumentada de CD54 e CD14. A suplementação com β_2 GPI foi suficiente para manter a proliferação das células THP-1 em cultura sem a adição de soro por 72h. Não houve correlações entre a concentração plasmática da β_2 GPI e indicadores clínicos da resposta inflamatória aguda em pacientes sépticos. A concentração da β_2 GPI não correlacionou com as concentrações plasmáticas de IL-8, SAA e PCR, que foram encontradas elevadas no sangue de pacientes com sepse. A variação da concentração plasmática de β_2 GPI foi um fenômeno muito precoce no modelo experimental de sepse e translocação bacteriana. Nas primeiras três horas após a indução da sepse endovenosa, a concentração plasmática de β_2 GPI diminuiu de forma dependente da intensidade de infecção. Sugere-se que efeitos muito precoces de compartimentalização associados ao sangue portal mediem esta regulação. As concentrações mais baixas de β_2 GPI foram observadas nos animais expostos à translocação bacteriana através da mucosa intestinal, associada a uma condição inflamatória leve. A derivação da linfa preveniu completamente a diminuição da concentração plasmática de β_2 GPI. Em conjunto, os resultados revelaram a relevância combinada de via e de intensidade da infecção para o controle da concentração plasmática de β_2 GPI no início na resposta inflamatória aguda.

Palavras-chave: β_2 -glicoproteína I. Inflamação. Monócitos. Células THP-1. Proliferação celular. Diferenciação celular. Sepse. Translocação bacteriana. Quimiluminescência. Citometria de fluxo. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The β_2 GPI in the acute phase of the inflammatory response condition

The β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) is an acute phase protein, produced mainly in the liver and intestine. The effects of this protein upon mononuclear cells were investigated both in monocytes from human peripheral blood, and in the human promonocytic cells from the ATCC THP-1 cell line. The correlations between its plasma concentration and systemic inflammation intensity were evaluated in humans and in an experimental model of systemic infection in rats. No β_2 GPI effects were observed upon the oxidative response of blood monocytes during the phagocytosis of opsonized zymosan or *S. aureus* as analysed by luminol amplified chemiluminescence and flow cytometry. β_2 GPI enhanced the cellular viability and stimulated the differentiation of the promonocytes. The THP-1 cells treated with β_2 GPI presented increased adhesion to the plastic of cell culture plates as well as increased expression of CD54 and CD14 antigens. The supplementation with β_2 GPI was sufficient to support the proliferation of THP-1 cells in serum free culture conditions for 72 h. There were no correlations between the β_2 GPI plasma concentration and clinical parameters of the acute inflammatory response in septic patients. The β_2 GPI concentrations didn't correlated with the plasma concentrations of IL-8, SAA and C reactive protein, despite these substances were found increased in the blood of patients with sepsis. The β_2 GPI plasma concentration response was a very early phenomenon in the experimental sepsis and bacterial translocation model. The β_2 GPI concentration decreased within the first 3h after endovenous sepsis induction, depending on the infection intensity. Very early compartment effects associated with the portal blood are suggested to mediate such regulation. The lowest β_2 GPI concentrations were found in the animals exposed to bacterial translocation through the intestinal mucosa, associated with a mild inflammatory condition. The lymph derivation completely prevented the plasma β_2 GPI decrease. Taken together, the results revealed the relevance of both the infection route and intensity to the control of plasma β_2 GPI concentrations during the acute phase response.

Keywords: β_2 -glycoprotein I. Inflammation. Monocytes. THP-1 cells. Cell proliferation. Cell differentiation. Sepsis. Bacterial translocation. Chemiluminescence. Flow cytometry. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

Lista de figuras	15
Lista de tabelas	17
Lista de abreviatras	18
1. Introdução	22
1.1. A β_2 -glicoproteína I	22
1.2. Sepses	38
2. Objetivos	43
3. Material e métodos	44
3.1. Obtenção e caracterização da β_2 GPI	44
3.1.2. Purificação da β_2 GPI.....	44
3.1.2.1. Precipitação de soro humano em ácido perclórico.....	44
3.1.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina	44
3.1.3. Eletroforese SDS-PAGE	45
3.1.4. Imunoblote.....	46
3.1.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 GPI	46
3.1.5.1. ELISA direto.....	46
3.1.5.2. ELISA indireto.....	47
3.2. Aprovações dos Comitês de Ética e Pesquisa para realização dos ensaios biológicos	47
3.3. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre monócitos isolados de sangue periférico humano	48
3.3.1. Dosagem de β_2 GPI, colesterol total e frações no soro dos indivíduos do grupo amostral	48
3.3.2. Separação dos monócitos do sangue periférico para os ensaios de quimiluminescência e produção de NO^*	49
3.3.3. Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por monócitos isolados de sangue periférico humano através da quimiluminescência amplificada por luminol (QL-luminol).....	50

3.3.4. Medida da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) por monócitos de sangue total humano através da citometria de fluxo	50
3.3.5. Medida da produção de NO [•] por monócitos isolados de sangue periférico humano	51
3.4. Estudo do efeito de β_2 GPI sobre células promonocíticas humanas (THP-1)	52
3.4.1. Ensaio de QL-luminol com células THP-1	52
3.4.2. Ensaio de proliferação das células THP-1	53
3.4.3. Ensaio de adesão das células THP-1	53
3.4.4. Ensaio de citometria de fluxo para pesquisa de expressão de moléculas de superfície (CD54 e CD14).....	53
3.5. Estudo da correlação da concentração plasmática de β_2 GPI com a intensidade da resposta inflamatória associada à sepse.....	54
3.5.1. Determinação das concentrações de β_2 GPI, Proteína C Reativa (PCR), Proteína Amiloide Sérica A (SAA) e Interleucina-8 (IL-8) em soro humano de indivíduos com sepse	54
3.5.1.1. Determinação da concentração sérica de β_2 GPI	55
3.5.1.2. Determinação da concentração sérica de SAA	55
3.5.1.3. Determinação da concentração sérica de IL-8	55
3.5.1.4. Determinação da concentração sérica de PCR	56
3.5.2. Modelo experimental de sepse e translocação bacteriana (TB).....	56
3.5.2.1. Amostra microbiológica	57
3.5.2.2. Inoculação de bactérias em ratos para indução de translocação bacteriana.....	57
3.5.2.3. Inoculação de bactérias em ratos para indução de sepse	57
3.5.2.4. Coleta da linfa, do sangue e dos órgãos dos animais	58
3.5.2.5. Análise microbiológica do fígado e do linfonodo mesentérico dos ratos	58
3.5.2.6. Determinação da concentração de β_2 GPI no plasma e na linfa dos animais.....	58

3.5.2.6.1. Testes de reatividade do AcMo anti- β_2 GPI humana com amostras de ratos	59
3.5.2.6.2. ELISA indireto β_2 GPI dos ratos	59
3.5.2.7. Imuno-histoquímica para β_2 GPI no fígado e no intestino dos ratos	59
3.5.2.7.1. Processamento das amostras e confecção das lâminas	59
3.5.2.7.2. Ensaio imuno-histoquímico para β_2 GPI	60
3.5.2.7.3. Contra-coloração dos tecidos para análise morfológica	61
4. Resultados.....	62
4.1. Efeitos da β_2 GPI sobre monócitos isolados de sangue periférico humano.....	62
4.1.1. Caracterização da β_2 GPI utilizada nos ensaios	62
4.1.2. Caracterização do grupo amostral	63
4.1.3. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo de monócitos de sangue periférico humano	65
4.1.4. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre a produção de NO [•]	67
4.2. Efeitos da β_2 GPI sobre a linhagem de célula monocítica humana (THP-1).....	68
4.2.1. Efeito da β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo das células THP-1.	68
4.2.2. Efeito da β_2 GPI sobre a proliferação das células THP-1.....	68
4.2.3. Efeito da β_2 GPI sobre a adesão das células THP-1.....	70
4.2.4. Efeito da β_2 GPI sobre a expressão de CD14 e CD54 em células THP-1	70
4.3. Efeito da inflamação associada a sepse sobre as concentrações plasmáticas de β_2 GPI	74
4.3.1. Determinação das concentrações de β_2 GPI em soro humano de indivíduos com sepse	74
4.3.2. Estudo da variação das concentrações plasmáticas de β_2 GPI em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana	76
5. Discussão	82

6. Conclusões	98
7. Referências Bibliográficas.....	100
Anexo 1: Aval do Comitê de Ética e Pesquisa : Protocolo 440/2007.....	134
Anexo 2: Aval do Comitê de Ética em Experimentação Animal - Protocolo 16/08.....	135
Anexo 3: Dados clínicos epidemiológicos dos pacientes com sepse.....	136
Anexo 4: Tabela: Concentração plasmática de β_2 GPI em indivíduos normocolesterolêmicos.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	β_2 -Glicoproteína I bovina – conformação molecular apresentando “domínios sushi”	24
Figura 2	Estrutura da β_2 -Glicoproteína I	25
Figura 3	Interação da β_2 GPI com superfícies carregadas negativamente.....	26
Figura 4	Modelo de interação dos anticorpos anti-fosfolipídios com a β_2 GPI	28
Figura 5	Modelo de interação entre β_2 GPI, Ac antifosfolipídios/anti- β_2 GPI e receptores de superfície celular (receptor Apo ER2' em plaquetas ativadas).....	29
Figura 6	Modelo de ativação de células endoteliais dependente de Anexina A2, induzida por β_2 GPI e Ac anti- β_2 GPI ou Ac anti-Anexina 2	30
Figura 7	Modelo de participação da β_2 GPI no sistema fibrinolítico	33
Figura 8	Esquema da participação da β_2 GPI nativa e clivada ($c\beta_2$ GPI) na cascata da coagulação e sistema fibrinolítico.....	33
Figura 9	Esquema da participação da β_2 GPI clivada na trombose isquêmica. Interação com angiostatina AS4.5 e inibição de suas ações antiangiogênicas	34
Figura 10	SDS-PAGE 12,5% de β_2 GPI purificada a partir da precipitação de soro humano em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B.....	63
Figura 11	Distribuição das concentrações plasmáticas de β_2 GPI versus colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides, determinadas em amostras de soro dos indivíduos voluntários, pertencentes ao grupo amostral desse trabalho.....	64
Figura 12	Efeito da β_2 GPI na QL-luminol de monócitos estimulados com zimosan opsonizado	65
Figura 13	Citometria de fluxo de sangue total humano.....	66

Figura 14	Efeito da β_2 GPI na oxidação da DCFH pelas espécies reativas produzidas por monócitos de sangue total dos grupos controle, estimulado com zimosan opsonizado e estimulado com <i>S. aureus</i>	66
Figura 15	Efeito da β_2 GPI sobre a produção de NO [•] por monócitos isolados de sangue periférico.....	67
Figura 16	Efeito da β_2 GPI sobre a proliferação de células THP-1.....	69
Figura 17	Efeito da β_2 GPI sobre a proliferação de células THP-1 tratadas com PMA	69
Figura 18	Efeito da β_2 GPI (10, 20, 40 e 80 μ g/mL) sobre a adesão de células THP-1 em placas de cultura.....	70
Figura 19	Citometria de fluxo das células THP-1.....	71
Figura 20	Expressão de CD14 e CD54 nas subpopulações de células THP-1	72
Figura 21	Ensaio dot-blot em membrana de nitrocelulose, de amostra de β_2 GPI purificada a partir de soro humano e de plasma de rato com AcMo anti- β_2 GPI humana 5F7- ICN	76
Figura 22	Imuno-histoquímica para β_2 GPI em fígado de ratos Wistar, após 3h de infecção por <i>E.coli</i> R-6, em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana.....	80
Figura 23	Imuno-histoquímica para β_2 GPI em intestino (íleo) de ratos Wistar, após 3h de infecção por <i>E.coli</i> R-6, em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações plasmáticas de β_2 GPI, colesterol total e frações lipídicas do grupo amostral.....	63
Tabela 2	Porcentagem de expressão de CD14 e CD54, total (marcação simples + dupla marcação) ou em dupla marcação (CD14+CD54) na superfície de células THP-1.....	73
Tabela 3	Concentração de β_2 GPI, SAA, PCR e IL-8 séricas em indivíduos saudáveis e em diferentes estadios de sepse.....	74
Tabela 4	Concentração de β_2 GPI sérica nas condições clínicas de sepse em geral e nos seus diferentes estadios, discriminando o foco infeccioso da infecção.....	75
Tabela 5	Concentração plasmática da β_2 GPI e distribuição tecidual de <i>E. coli</i> R-6 em fígado e linfonodo mesentérico de ratos Wistar, após 3 horas de infecção.....	77
Tabela 6	Concentrações plasmática e linfática da β_2 GPI e distribuição tecidual de <i>E. coli</i> R-6 em fígado e linfonodo mesentérico de ratos Wistar, após 3 horas de infecção.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – Anticorpo
AcMo – Anticorpo monoclonal
AIDS – Síndrome da deficiência imuno-adquirida
ApoER2' – Receptor 2 da apolipoproteína E
APS – Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido
APt – Ativador de plasminogênio tecidual
 β_2 GPI - β_2 -Glicoproteína I
BCIP – 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indol-Fostato
 CaCl_2 – Cloreto de cálcio
 $\text{c}\beta_2\text{GPI}$ – $\beta_2\text{GPI}$ clivada
CCP – Proteínas de controle do complemento
CD – *Cluster designation* (antígeno de superfície celular)
CL – Cardiolipina
 Cl^- - Ânion cloreto
 CO_2 – Dióxido de carbono, gás carbônico
CRO – Grupo controle sem manipulação
CS – Grupo de controle de manipulação para sepse
CTB – Grupo de controle de manipulação para translocação bacteriana
C3b – Proteína complemento-3b
DCF - 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH – Diclorofluoresceína
DCFH-DA – 2'7'-diclorofluoresceína diacetato
DIC – Coagulação intravascular disseminada
DNA – Ácido desoxirribonucléico
D.O. – Densidade óptica
D.P. – Desvio padrão
EDTA – Ácido etilenodiamino-tetraacético
ELISA – Ensaio imunoenzimático

ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ERON – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
Fc – Fração complemento
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
FVa – Fator V ativado
FXa – Fator X ativado
GALT – Tecido linfóide associado ao intestino
HClO – Ácido hipocloroso
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ – Ácido fosfórico
HDL – Lipoproteína de alta densidade
hsPCR – Proteína C reativa de alta sensibilidade
HUVEC – Célula endotelial de veia umbilical humana
IAPt 1 – Inibidor do ativador de plasminogênio tecidual tipo 1
ICAM – Molécula de adesão intercelular
IFN – Interferon
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
L-NAME – Éster de N^g-nitro-L-arginina (inibidor de óxido nítrico sintase)
LPS – Lipopolissacarídeo
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MGIF – Média geométrica da intensidade de fluorescência
MPO – Mieloperoxidase
MyD88 – Gene de resposta primária da diferenciação mielóide 88
mRNA – RNA mensageiro
NaCl – Cloreto de sódio
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NADPH – Fosfato dinucleotídeo acetato de nicotinamida reduzido

NADPHox – Complexo enzimático NADPH oxidase

NBT – Azul de tetrazólio

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NIL-3 – Inibidor de interleucina 3

NO $^{\bullet}$ – Radical óxido nítrico

NO $_2^{\bullet}$ - Dióxido de nitrogênio

NO $_2^-$ – íon nitrito

O $_2^-$ - Ânion superóxido

1 O $_2$ – Oxigênio molecular singlete

$^{\bullet}$ OH – Radical hidroxila

ONOO $^-$ - Peroxinitrito

OPD – Orto-fenilenodiamina

PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno

PBS – Tampão salina fosfato

PCR – Proteína C reativa

PE – Proteína eritrina

PerCP – Proteína de clorofila peridina

PMA – Acetato de forbolmiristato

QL-lum - Quimiluminescência amplificada por luminol

RNA – Ácido ribonucléico

RRP – Receptores de reconhecimento padrão

RLU/s – Unidades relativas de luz por segundo

SAA – Proteína amilóide sérica A

SFB – Soro fetal bovino

SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio / Gel de poliacrilamida

S 10^7 – Grupo de Sepse (inoculação bacteriana de 10^7 UFC/mL/100 g de peso corporal)

S 10^9 – Grupo de Sepse (inoculação bacteriana de 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal)

TB – Translocação bacteriana

TBST – Tampão Tris-HCl 50 mM

TBST – Tampão Tris-HCl 50 mM, Tween 0,1%

Tet^R – Resistente à tetraciclina

TGF – Fator de crescimento transformante

THP-1 – Linhagem de células leucêmicas monocíticas humanas

Th1 – resposta *T-helper* do tipo 1

Th2 – resposta *T-helper* do tipo 2

TLR – receptor *toll-like*

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral

tPA – Ativador de Plasminogênio Tecidual

tPAI1 – Inibidor do Ativador de Plasminogênio Tecidual tipo 1

TPA – Acetato de forbol-tetradecanoil

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

1. INTRODUÇÃO

1.1. A β_2 -glicoproteína I

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína inicialmente descrita como componente da fração beta-globulina do soro humano e identificada como Apolipoproteína H (Losier et al., 1984). Pode ser encontrada no plasma (Polz et al., 1980), no líquido cefalorraquidiano (Koch et al., 2001), na linfa (Borensztajn et al., 1985; Laplaud et al., 1991), no humor aquoso (Richardson et al., 2009), no fluido vítreo (Garcia-Ramírez et al., 2007), na saliva (Ramachandran et al., 2008) e no fluido folicular (Aleporou-Marinou et al., 2001). No plasma circula cerca de 40% ligada a lipoproteínas, principalmente VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), quilomicrons, frações ricas em triglicerídeos, e com menor frequência, HDL (lipoproteína de alta densidade) (Polz et al., 1980). A β_2 GPI é uma das proteínas mais abundantes no soro humano. Sua concentração plasmática é bastante variável em indivíduos saudáveis (desde valores não detectáveis pelos ensaios imunológicos disponíveis, cujos limites de detecção são maiores do que ng/mL, até concentrações de 350 μ g/mL), com uma média de 200 μ g/mL em brancos, e de 150 μ g/mL em negros (Balasubramanian et al., 1998; Koch et al., 2001; Mehdi et al., 2003). Dois alelos codominantes autossômicos tem sido propostos: β_2 GPI *N (normal) e β_2 GPI *D (deficiente), sendo que indivíduos NN homozigotos teriam uma concentração plasmática de 160 a 350 μ g/mL, indivíduos ND heterozigotos, de 60 a 150 μ g/mL, e os DD homozigotos, concentrações menores que 60 μ g/mL (Mehdi et al., 2003). Um fenômeno denominado de estado “*non-disease-forming*” foi verificado em indivíduos saudáveis, que não possuíam níveis detectáveis de β_2 GPI circulante (β_2 GPI *null*), nem apresentavam alterações no metabolismo de lipoproteínas (Hoeg et al., 1985).

As concentrações plasmáticas da β_2 GPI podem estar aumentadas nas infecções crônicas, enquanto nos quadros agudos de infecção a β_2 GPI comporta-

se como uma proteína de fase aguda negativa, diminuindo com a albumina (Brighton et al., 1996). Correlações positivas entre as concentrações de β_2 GPI e o tabagismo, o sexo masculino, a idade avançada e a hiperlipidemia foram demonstradas (Propert, 1978). Um aumento na concentração plasmática da β_2 GPI é observado na Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido Primário, no Lupus Eritematoso Sistêmico, na Doença de Chagas e na Sífilis congênita, mas existem dados contraditórios na literatura (Arvieux et al., 1996; Balasubramanian & Schroit, 1998; Biasiolo et al., 1999).

O principal sítio de produção da β_2 GPI é o fígado, mas a proteína ou seu RNA mensageiro (mRNA) também são expressos em outros tipos celulares como enterócitos, células endoteliais, monócitos, linfócitos, astrócitos, neurônios, células trofoblásticas, cardiomiócitos, colangiócitos e células dos túbulos convolutos proximais nos rins (Avery et al., 1993; Chamley et al., 1997; Aversa et al., 1997; Caronti et al., 1999; Conti et al., 2003; Ragusa et al., 2006). Quantidades consideráveis de β_2 GPI revestem a mucosa renal, e a megalina tem sido proposta como um eficiente receptor fisiológico para ela, mediando sua depuração nos túbulos proximais (Klaerke et al., 1997; Moestrup et al., 1998). A β_2 GPI não é detectada na urina de indivíduos saudáveis. Logo, tem sido utilizada como marcador diagnóstico para falência tubular renal nas doenças renais crônicas e nas intoxicações de túbulo renal, devido à atividade insuficiente da megalina nestas condições (Moestrup et al., 1998).

A β_2 GPI humana possui uma cadeia polipeptídica simples composta de 326 resíduos de aminoácidos, 11 pontes dissulfeto e cinco sítios de glicosilação (Losier et al., 1984; Kato & Enjyoji, 1991). Em condições denaturantes, possui um peso molecular aparente de 43 kDa, medido por equilíbrio de sedimentação, e de 50 kDa em SDS-PAGE (Sodin-Semrl & Rozman, 2007). Sua estrutura mostra quatro domínios homólogos e um quinto domínio, estruturalmente distinto. Cada um dos quatro domínios homólogos possui aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, duas pontes dissulfeto internas e cisteínas, prolinas e triptofanos altamente conservados. O quinto domínio apresenta uma ponte dissulfeto e 24

resíduos de aminoácidos adicionais. Este domínio contém um grupo carregado positivamente (K282NKEKK287), e um laço parcialmente hidrofóbico e flexível na região C-terminal (Schwarznbacher et al., 1999; Atsumi et al., 2005). Os quatro primeiros domínios, designados “domínios sushi”, incluem a β_2 GPI na superfamília das proteínas de repetições consensuais curtas (*Short Consensus Repeats*) da qual fazem parte as proteínas de controle do complemento (CCP) (Ichinose et al., 1990) (Figura 1). A estrutura cristal da β_2 GPI mostra uma disposição em forma de J ou anzol, com alinhamento dos “domínios sushi” da proteína (Schwarznbacher et al., 1999) (Figura 2).

Figura 1: β_2 -Glicoproteína I bovina - conformação molecular apresentando “domínios sushi” (–CHO: N-glicosilação) (Kato & Enjoji, 1991).

Figura 2: Estrutura da β_2 -Glicoproteína I. As conformações em folhas- β são mostradas em azul e as α -hélices em vermelho (Schwarznbacher et al., 1999).

O gene que codifica a β_2 GPI em humanos está localizado no cromossomo 17q23-24, e seu promotor já foi caracterizado (Okkels et al., 1999; Wang & Chiang, 2004). Altamente conservada entre os mamíferos, a β_2 GPI de humanos (Kristensen et al., 1991; Mehdi et al., 1991; Steinkasserer et al., 1991), ratos (Aoyama et al., 1989), camundongos (Nonaka et al., 1992; Sheng et al., 1997), bovinos, caninos (Sellar et al., 1993), chimpanzés (Sanghera et al., 2001), apresenta 60 a 80 % de homologia na sequência de aminoácidos dos cinco domínios, sendo o domínio V, o mais conservado.

Através da ligação específica do domínio V a superfícies contendo cargas negativas, a β_2 GPI interage com superfícies contendo fosfolipídios aniônicos, como fosfatidilserina e cardiolipina, vários lipídios oxidados e também a DNA, a

dextran e a heparina (Sanguera et al., 1997b; Guerin et al., 2002). A ligação da proteína aos fosfolipídios aniônicos, é prevenida pela heparina, que compete pelo sítio rico em lisinas do domínio V, responsável pela interação da proteína com esses fosfolipídios (Guerin et al., 2002) (Figura 3). Uma interação secundária entre o domínio I da β_2 GPI e fosfolipídios, através de cargas iônicas fracas, também foi sugerida (Lee et al., 2000). Porém, a relevância fisiológica dessa interação ainda não é bem esclarecida.

Figura 3: Interação da β_2 GPI com superfícies carregadas negativamente. Principal sítio de ligação localizado no domínio V da proteína (Guerin et al., 2002, modificado).

A clivagem entre Lys³¹⁷ e Thr³¹⁸ no domínio V, por enzimas proteolíticas como plasmina e com menor eficiência, o Fator X ativado (FXa), diminui significativamente a capacidade da β_2 GPI de ligar-se aos fosfolipídios (Ohkura et al., 1998; Horbach et al., 1999; Guerin et al., 2002; Atsumi et al., 2005). A heparina favorece a clivagem da β_2 GPI pela plasmina. Concentrações terapêuticas da heparina possibilitam um aumento da clivagem da β_2 GPI *in vitro*, na sua porção C-terminal (Guerin et al., 2002).

A β_2 GPI clivada ($c\beta_2$ GPI) tem sido detectada no plasma de pacientes com sepse associada a Coagulação Intravascular Disseminada (DIC), pacientes tratados com estreptoquinase (Horbach et al., 1999), pacientes com leucemia, pacientes com atividade do anticoagulante lúpico (Itoh et al., 2000), com acidente vascular cerebral isquêmico e indivíduos saudáveis com história de infarto lacunar (Yassuda et al., 2004). Esse processamento proteolítico da proteína ocorre durante a ativação da fibrinólise e é mediado pela plasmina (Horbach et al., 1999; Itoh et al., 2000; Yassuda et al., 2004). A heparina é capaz de potencializar a geração da forma clivada da β_2 GPI pela plasmina (Guerin et al., 2002). A ocorrência simultânea do aumento dos níveis plasmáticos de $c\beta_2$ GPI com a diminuição de β_2 GPI nativa, sugere que a clivagem da β_2 GPI induz ao aumento na velocidade de depuração da proteína da circulação. Porém, em pacientes com sepse e DIC, esse processamento proteolítico da β_2 GPI não é necessário para a depuração da proteína, sugerindo que sua remoção da circulação ocorre através da ligação a fosfolípidios carregados negativamente, expostos nos corpos apoptóticos que são abundantes nesses pacientes (Horbach et al., 1999).

In vitro, o pré-tratamento do plasma com precipitação em ácido perclórico pode prevenir a clivagem da β_2 GPI causada por plasmina, tripsina ou elastase (Ohkura et al., 1998; Horbach et al., 1999; Guerin et al., 2002; Atsumi et al., 2005).

Existem evidências de que a β_2 GPI em solução possui uma estrutura menos alongada e mais globosa, diferente da sua estrutura cristal. Essas diferenças são atribuídas às unidades de carboidrato e à flexibilidade entre os domínios sushi II e III (Hammel et al., 2002). Tem sido proposto que transições entre os estados conformacionais correlacionam diretamente com as propriedades da proteína, uma vez que a estrutura da β_2 GPI em solução demonstra uma menor atividade imunológica (Keeling et al., 1992). A interação da β_2 GPI com fosfolípidios aniônicos, microplacas de plásticos ou receptores celulares podem reorientar os domínios sushi e aumentar a densidade e/ou induzir a exposição de epítomos necessários para a ligação de anticorpos (Hasunuma et al., 1997).

Muitos trabalhos focam a participação da β_2 GPI na fisiopatologia das doenças inflamatórias com componente autoimune. Autoanticorpos com especificidade para β_2 GPI ou para complexos entre β_2 GPI e lipídios de membrana associam-se à fisiopatologia da Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (APS) Primário, Lupus Eritematoso Sistêmico, Doença de Chagas congênita, Sífilis congênita (George et al., 1999a). A proteína tem sido mostrada como um dos principais alvos antigênicos para alguns anticorpos (Ac) antifosfolipídios (Hammel et al., 2001). A interação com membranas carregadas negativamente induz mudanças conformacionais e exposição de regiões hidrofóbicas que se inserem na membrana. Diferentes estados conformacionais nos quais a proteína se orienta contribuem para sua antigenicidade e para a indução de autoimunidade *in vivo* (Wang et al., 2000). Laat e colaboradores (2006) propuseram um modelo onde a β_2 GPI é reconhecida pelo Ac após sua interação com a membrana aniônica, e a interação β_2 GPI/Ac anti- β_2 GPI é mais estável quando a proteína encontra-se na forma dimérica (Figura 4).

Figura 4: Modelo de interação dos anticorpos anti-fosfolipídios com a β_2 GPI (Laat et al., 2006).

Figura 5: Modelo de interação entre β_2 GPI, Ac antifosfolipídicos/anti- β_2 GPI e receptores de superfície celular (receptor ApoER2' em plaquetas ativadas) (Miyakis et al., 2004b).

Anticorpos antifosfolipídios dependentes de β_2 GPI estão mais amplamente relacionados com as manifestações clínicas de doenças inflamatórias crônicas com componente autoimune do que aqueles que reconhecem diretamente os fosfolipídios (Roubey et al., 1995). Pacientes com altos títulos de Ac anti- β_2 GPI e seus complexos *in vivo* apresentam uma relevante associação entre inflamação e trombose venosa ou arterial, e morte fetal recorrente (Celli, 1997; Gharavi et al., 2000).

Mecanismos importantes estão envolvidos nos eventos trombóticos, dentre eles, a ativação das células endoteliais e conseqüente comprometimento da hemostasia, com perda das funções anticoagulantes e aumento das pró-coagulantes (Rand, 2002). Muitos trabalhos têm demonstrado que o plasma de pacientes com APS possui Ac capazes de ligar e ativar células endoteliais (McCrae et al., 2001; Riboldi et al., 2003). E ainda, que a ativação das células endoteliais ocorre de uma maneira dependente de β_2 GPI (Simantov et al., 1995;

Del Papa et al., 1997) e pode ser mediada através de uma via de sinalização intracelular que envolve NF- κ B (Dunoyer-Geindre et al., 2002; Raschi et al., 2003). A β_2 GPI possui alta afinidade de ligação para Anexina A2 na superfície das células endoteliais em repouso (Ma et al., 2000; Zhang & MacCrae, 2005). Porém, Anexina A2 não é uma proteína transmembrana, e ainda não está claro como sua interação com β_2 GPI possibilita uma ativação das células endoteliais mediada pelo Ac anti- β_2 GPI/antifosfolípido. Zhan & MacCrae (2005) propuseram um modelo no qual a ativação das células endoteliais dependente de Anexina A2 pode ocorrer diretamente através do reconhecimento de Ac anti-Anexina A2, ou alternativamente através da interação de Ac anti- β_2 GPI com a β_2 GPI ligada na Anexina A2 na superfície das células. Nesse modelo, o *cross-linking* da Anexina A2 promove a sua agregação com proteínas transmembrana “adaptadoras”, talvez receptores com atividade tirosina-quinase, que através de mecanismos de fosforilação geram a transmissão de sinal para as proteínas do ambiente intracelular (Figura 6).

Figura 6: Modelo de ativação de células endoteliais dependente de Anexina A2, induzida por β_2 GPI e Ac anti- β_2 GPI ou Ac anti-Anexina 2 (Zhang & McCrae, 2009).

Raschi e colaboradores (2003) propuseram que a ativação das células endoteliais por Ac anti- β_2 GPI envolve uma via de sinalização dependente de MyD88 (gene de resposta primária da diferenciação mielóide 88) que leva à ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa B), e que é estimulada através da ligação de β_2 GPI a receptores *Toll-like* (TLR). É possível que TLRs, em particular TLR-4, possam associar-se com Anexina A2 formando um complexo de sinalização na superfície das células (Zobiack et al., 2002).

A β_2 GPI possui epítomos homólogos aos antígenos de superfície de vários microorganismos. Autoanticorpos reativos para β_2 GPI podem ser produzidos em modelos animais infectados com *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* entre outros patógenos e são capazes de induzir a Síndrome do Anticorpo Antifosfolipídico em animais saudáveis (Blank et al., 2002).

Com maior frequência em indivíduos idosos, autoanticorpos com reatividade para β_2 GPI também são encontrados em uma parcela da população assintomática (Celli, 1997).

Embora a função fisiológica da β_2 GPI ainda permaneça distante de um consenso, a β_2 GPI tem sido mostrada participando da regulação de vários mecanismos fisiológicos. Efeitos anti e procoagulantes foram descritos para a β_2 GPI nos processos de coagulação e fibrinolíticos (Nimpf et al., 1986; Ieko et al., 1999; Miyakis et al., 2004a; Bu et al., 2009). Existem algumas evidências da participação da β_2 GPI na coagulação mediada por trombina, com propriedades pró-trombóticas *in vivo* e *in vitro*. Embora camundongos deficientes em β_2 GPI tenham apresentado baixa produção de trombina, indivíduos deficientes em β_2 GPI não têm mostrado risco de trombose, e seus marcadores fibrinolíticos e hemostáticos são aparentemente normais (Yasuda et al., 2000; Sheng et al., 2001a). A adição de Ac anti- β_2 GPI em plasma humano normal causa um prolongamento na produção de trombina (Sheng et al., 2001b). Contudo, a produção de trombina é importante tanto para a formação de trombo quanto para a ativação da via anticoagulante dependente de proteína C. Outra ação pró-

coagulante da β_2 GPI é a de prevenir a degradação de FVa (Fator V ativado) pela proteína C ativada (Ieko et al., 1999).

Através da ligação em fosfolipídios aniônicos na superfície de plaquetas ativadas e células endoteliais, a proteína inibe a fase de contato da cascata de coagulação (Shousboe & Rasmussen, 1988). Além disso, a proteína também pode regular o processo de fibrinólise, que tem como evento primordial a conversão do plasminogênio à plasmina, pelo tPA (Ativador de Plasminogênio Tecidual). Bu e colaboradores (2009) mostraram que a β_2 GPI possui alta afinidade de ligação para o tPA, e estimula a ativação do plasminogênio dependente de tPA. Também já foi mostrado que a proteína é capaz de ligar Glu-plasminogênio e estimular a ativação do plasminogênio mediada por estreptoquinases (Lopez-Lira et al., 2006). Os eventos trombóticos observados nas doenças autoimunes, como a Síndrome do Anticorpo Antifosfolipídio e Lupus Eritematoso Sistêmico, e na morte fetal recorrente têm sido associados à presença de Ac anti- β_2 GPI (Lutters et al., 2002; Miyakis et al., 2004). A ligação da β_2 GPI ao tPA não ocorre na presença de Ac anti- β_2 GPI isolados de pacientes com Síndrome do Anticorpo Antifosfolipídio (Bu et al., 2009) e a prevenção da inibição do tPA por um Inibidor do Ativador de Plasminogênio Tecidual tipo 1 (tPAI1) é bloqueada por anticorpos monoclonais (AcMo) antifosfolipídios (Ieko et al., 2000).

Como mencionado, existem relatos de que a plasmina e o FXa podem clivar a β_2 GPI. A β_2 GPI clivada liga-se com baixa afinidade ao Glu-plasminogênio e, em concentrações importantes no plasma, limita a produção adicional de plasmina (Yasuda et al., 2004; Bu et al., 2009) (Figura 7). A produção de β_2 GPI clivada tem sido mostrada *in vivo* em estados patológicos com fibrinólise aumentada, sugerindo um importante mecanismo de *feedback* entre a β_2 GPI e os componentes da cascata da coagulação (Ohkura et al., 1998) (Figura 8).

Figura 7: Modelo de participação da β_2 GPI no sistema fibrinolítico. O plasminogênio associado à fibrina é convertido em plasmina por ação de tPA. Essa conversão pode ser estimulada pela β_2 GPI através de sua interação com tPA. A plasmina cliva a β_2 GPI e a forma clivada da proteína liga-se ao plasminogênio, inibindo sua ligação à fibrina e produção adicional de fibrina (Yassuda et al., 2004).

Figura 8: Esquema da participação da β_2 GPI nativa e clivada ($c\beta_2$ GPI) na cascata da coagulação e sistema fibrinolítico. Os efeitos pró-coagulantes da proteína estão representados pelas setas contínuas, os efeitos anticoagulantes estão representados pelas setas pontilhadas. Os fatores da via intrínseca da coagulação estão mostrados em caracteres planos, os elementos do mecanismo fibrinolítico estão escritos em itálico (Miyakis, 2004b).

A ligação da β_2 GPI clivada com o plasminogênio é mediada pela interação entre o grupo de lisinas localizado no domínio V da β_2 GPI e o sítio ligante de lisina no domínio K5 do plasminogênio (Yasuda et al., 2004). Mais recentemente, Nakagawa e colaboradores (2009) mostraram que através do mesmo sítio de interação com o plasminogênio, a β_2 GPI clivada é capaz de interagir especificamente com a angiostatina humana (isoforma AS4.5) produzida durante os eventos fibrinolíticos, e atenuar suas propriedades antiangiogênicas demonstradas em ensaios de proliferação de células endoteliais, de invasão celular, de formação de tubos endoteliais, e em um ensaio de angiogênese *in vivo*. Esses autores hipotetizam um papel benéfico para a β_2 GPI clivada em situações de trombose isquêmica, nas quais a proteína favorece a angiogênese (Figura 9). Em contrapartida, em outras condições patológicas como retinopatia diabética e formação de tumor, a β_2 GPI clivada pode ser um fator de agravamento do quadro, tornando-se alvo importante para o tratamento da doença.

Figura 9: Esquema da participação da β_2 GPI clivada na trombose isquêmica. Interação com angiostatina AS4.5 e inibição de suas ações antiangiogênicas (Nakagawa et al., 2009).

A função antiangiogênica da angiostatina é mediada pela interação com as células endoteliais. Através da ligação com a porção extracelular da adenosina trifosfato sintase F1F0, a angiostatina inibe essa enzima e promove a apoptose das células endoteliais, mediada por caspase (Moser et al., 2001; Veitonmäki et al., 2004). A interação da angiostatina AS4.5 com outras moléculas de superfície de células endoteliais como a integrina $\alpha V\beta 3$ e angiomotina, também já foi demonstrada (Trojanovsky et al., 2001). Logo, é possível que a β_2 GPI clivada interfira com a ligação da angiostatina AS4.5 nas células endoteliais, atenuando sua função antiangiogênica.

Dados de inibição da angiogênese e crescimento tumoral já foram demonstrados por outros pesquisadores, tanto com a β_2 GPI nativa quanto com sua forma clivada, e também com a proteína mutante, com deleção do domínio V (Beecken et al., 2006; Sakai et al., 2007; Yu et al., 2008). A β_2 GPI derivada de uma linhagem de células de carcinoma celular transicional inibiu a proliferação de células endoteliais e a formação de tubos. Esse efeito foi demonstrado com a forma clivada da proteína e mediado pela anexina 2 na superfície do endotélio (Beecken et al., 2006). Sakai e colaboradores (2007) mostraram que a β_2 GPI clivada inibe a migração celular, a proliferação e a neovascularização em implantes subcutâneos que contém VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) neovascularização também foi inibida pela forma nativa da proteína. Em um modelo experimental de câncer prostático, a injeção intraperitoneal de β_2 GPI clivada inibiu o crescimento de tumores injetados ortotopicamente em camundongos. Yu e colaboradores mostraram que a β_2 GPI nativa, clivada e mutante (sem o quinto domínio), inibiu a proliferação, migração e formação de tubos por HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana) induzidas por VEGF e FGF (fator de crescimento de fibroblasto). Esses pesquisadores concluíram que o domínio I da β_2 GPI é o principal mediador dos efeitos antiangiogênicos e antitumorais, que não foram demonstrados com uma mutante da proteína, com deleção no domínio I. Em concentrações maiores, o efeito da β_2 GPI clivada de inibir a função antiangiogênica da angiostatina AS4.5 é revertido

para um efeito de inibição da angiogênese. Em estado estacionário, pacientes com história de acidente vascular cerebral e reação positiva para anticoagulante lúpico, apresentam a β_2 GPI clivada em concentrações de até 0,5% e 1,5% da proteína íntegra. Logo, é provável que o efeito antiangiogênico e/ou antitumoral nos estados estacionários sejam dependentes da forma nativa da β_2 GPI (Itoh et al., 2000; Yasuda et al., 2004; Nakagawa et al., 2009).

Além de suas funções hemostáticas específicas, a β_2 GPI é capaz de aumentar a depuração de triglicerídeos por estimular a lipase lipoprotéica (Nakaya et al., 1980) e de ligar-se a lipídios modificados presentes na LDL oxidada (LDLox) *in vitro*, como por exemplo numa interação específica com a molécula de 7-cetocolesterol-9-carboxinanoato (ox-Lig1) (Kobayashi et al., 2001). Foi descrita uma ação antioxidante para a β_2 GPI de inibir a oxidação e a internalização de LDL por macrófagos e, assim, prevenir a progressão da aterosclerose (Lin et al., 2001). A interação da β_2 GPI ligada à LDLox com anticorpos antifosfolipídios favorecem a ingestão de partículas de LDLox por macrófagos. A proteína já foi demonstrada por imuno-histoquímica em placas de ateroma, tendo sido cogitada uma função reguladora local da resposta inflamatória (Hasunuma et al., 1997; George et al., 1999).

Consistente com uma ação antiinflamatória, a proteína foi proposta como um sinalizador de apoptose para macrófagos mesmo na ausência de anticorpos antifosfolipídios. Esta ação da β_2 GPI foi confirmada em modelos *in vitro* e *in vivo* (Chonn et al., 1995; Balasubramanian et al., 2005), sugerindo que a β_2 GPI possa ser um marcador endógeno para células apoptóticas e necróticas. Por outro lado, em linhagens de células de tumor hepático humano e durante a inflamação experimentalmente induzida em cães, a β_2 GPI foi capaz de estimular a expressão de mRNA para codificação de citocinas pró-inflamatórias, IL(interleucina)-1b e IL-6 (Mehdi et al., 1991; Sellar et al., 1993).

Especulamos sobre a participação da β_2 GPI na regulação do processamento silencioso de antígenos, em contraposição à indução de resposta inflamatória (Gomes et al., 2002).

Nossos resultados anteriores corroboram a hipótese de que a β_2 GPI, regula o processamento metabólico, não inflamatório, de antígenos por macrófagos, aumentando a eficiência da resposta fungicida de células de Kupffer (Gomes et al., 2002) e a produção de óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), associada à diminuição de *burst* respiratório e ingestão de partículas em macrófagos peritoniais inflamatórios diante de formas amastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* (Knox de Sousa et al., 2001). Ensaio *in vitro*, com neutrófilos de sangue periférico mostraram aumento na produção de $\text{NO}^\bullet$, associado à diminuição da quimiluminescência dependente do luminol e aumento da oxidação de diclorofluoresceína (DCFH) na citometria de fluxo associados à presença de β_2 GPI. O mecanismo destes efeitos ainda não é conhecido, entretanto, pode estar associado ou não a efeitos sobre o metabolismo oxidativo e a compartimentalização da mieloperoxidase (MPO) (PEREIRA et al., 2005). Esta competência da imunidade inata para o processamento metabólico de antígenos é fundamental para o equilíbrio geral do sistema imune e para o controle adequado da resposta a infecções e da autoimunidade. Foi demonstrada a identidade estrutural entre a β_2 GPI e um inibidor de interleucina-3 (NIL-3) (Adachi et al., 2002), o que a situou definitivamente como um imunomodulador *in vivo*.

Na vigência de infecções, a regulação negativa das funções de IL-3 é relevante. O impacto dessa inibição sobre a resposta imune, deve ser considerado em múltiplos aspectos. A β_2 GPI tem uma concentração relativamente alta no plasma e nos líquidos corporais, mantida em equilíbrio pela produção basal hepática, mas que também pode ser realizada por diversos tipos celulares parenquimatosos, além de, provavelmente por células da medula óssea, ao menos na presença de grandes quantidades de IL-3. IL-3 modifica a diferenciação de monócitos e células dendríticas: diminui a produção de IL-12 e aumenta a produção de IL-10 em culturas de células mononucleares. Além disso, implica potencialmente no favorecimento de um padrão Th2 (resposta *T-helper* do tipo 2) da resposta das células T em culturas mistas de células dendríticas e células T CD4⁺ naíve (Ebner et al., 2002). A indução de mecanismo de resposta Th1 (resposta *T-helper* do tipo 1) por β_2 GPI foi descrita na literatura (Butari et al.,

2005). Portanto, a inibição de IL-3 por β_2 GPI, associada ao seu papel no processamento de antígenos particulados e de lipídios modificados, não pode ser entendida como um simples efeito antiinflamatório. Ao contrário, o conjunto dos efeitos remete a um papel regulador de fenômenos relacionados à imunidade inata e adquirida, talvez dependentes da extensão e intensidade do dano tecidual, ativação de plaquetas e células endoteliais.

1.2. A sepse

A sepse é definida como síndrome clínica da resposta inflamatória sistêmica durante uma infecção. A interação entre o microorganismo invasor ou produtos bacterianos e as respostas imunológica e inflamatória do hospedeiro é complexa. Estas respostas são importantes para o controle da infecção, mas também contribuem para as seqüelas da sepse. A resposta inflamatória sistêmica à infecção resulta em mudanças hemodinâmicas, que cursam, no seu limite, com colapso da microcirculação, ausência de resposta a vasopressinas e coagulação intravascular disseminada, e podem levar à falência múltipla de órgãos e morte (Salomão et al., 1999; Oberholzer et al., 2001; Cohen, 2002; Hotchkiss et al., 2003; Bochud & Calandra, 2003; Russell, 2006).

Visando uma melhor definição no espectro de desordens associadas com a sepse, uma sistemática diagnóstica baseada no estadioprogressivo da infecção foi proposta por Bone e colaboradores (1991) sendo: bacteremia, uma condição de cultura sanguínea positiva; sepse, evidência clínica sugestiva de infecção, associada a sinais de resposta sistêmica à infecção; síndrome séptica, diagnóstico clínico de sepse associado às evidências de disfunções orgânicas; e choque séptico, diagnóstico de síndrome séptica, associada à hipotensão.

Os registros sobre a etiologia bacteriana da sepse mostram que os agentes predominantes modificaram-se ao longo do tempo, sendo atualmente 52,1% dos casos relacionados a bactérias Gram positivas e 37,6%, a bactérias Gram negativas (Martin et al., 2003; Opal, 2007). Métodos sofisticados de identificação

microbiológica, como a caracterização genotípica de bactérias, têm sido utilizados no rastreamento da origem da infecção (Grattard et al., 1994). Contudo, existem na literatura duas hipóteses para a etiopatogenia da sepse: em uma, a presença do microorganismo invasor é o principal promotor da ativação do estado inflamatório sistêmico no hospedeiro (Reynolds et al., 1995; Heumann et al., 1998); enquanto em outra, endotoxinas estimuladoras da produção de mediadores inflamatórios, são os principais indutores da resposta inflamatória na sepse, não havendo nesse caso a necessidade da presença do microorganismo (Cabié et al., 1993; Yao et al., 1995).

Afecções graves como trauma, choque hipovolêmico e queimaduras contribuem com a patogênese da sepse. Estas situações promovem alterações da microcirculação e desencadeiam fatores importantes associados à disfunção aguda de órgãos, tais como, hipóxia tecidual generalizada com lesão das células endoteliais, estresse mitocondrial e ativação da cascata de coagulação (Eaves & Alexander, 1998; Hassoun et al., 2001; Alverdy et al., 2003; Trzeciak & Rivers, 2005).

A translocação bacteriana (TB) através da mucosa do trato gastrointestinal já foi evidenciada como o principal iniciador da patogênese das infecções de origem endógena e como um fator de agravamento do quadro inflamatório da sepse. O termo “translocação bacteriana” refere-se à passagem, através da mucosa epitelial, de bactérias viáveis e não viáveis, ou produtos bacterianos como endotoxinas, do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos. Diversas desordens gastrointestinais como má nutrição, obstrução intestinal e obstrução biliar, podem estar envolvidas na promoção da TB. Todavia, três condições básicas são necessárias para a ocorrência da TB: o sobrecrecimento de bactérias intestinais, a disfunção da barreira intestinal e a imunodeficiência do hospedeiro (Berg & Garlington, 1979).

A passagem de bactérias do lúmen intestinal para os sítios extra-intestinais pode ocorrer pela via hematogênica ou pela via linfática. A via linfática é responsável pelo carreamento dos mediadores inflamatórios oriundos da ativação

do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), enquanto a via hematogênea é responsável pela distribuição das bactérias aos outros órgãos (Koh et al., 1996).

A hipótese intestinal da sepse é baseada no processo de TB como causa da infecção sistêmica e subsequente agravamento do estado inflamatório do hospedeiro (Clark & Coopersmith, 2007; Leaphart & Tepas, 2007).

A complexa interação entre o hospedeiro e o microorganismo invasor na patogênese da sepse inclui o reconhecimento da bactéria, a ativação e transmigração celular, a fagocitose e a destruição do patógeno. A defesa imunológica primária é mediada pelos fagócitos circulantes que desempenham suas funções principais de fagocitose, liberação de proteases e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), visando à destruição do microorganismo invasor (Salomão et al., 1999; Rigato et al., 2001). A interação das células com a bactéria ou com o produto bacteriano ocorre através do reconhecimento de estruturas preservadas do microorganismo - tais como lipopolissacarídeo (LPS), peptídeoglicanos, lipoproteínas - denominadas de Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMP), pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) que incluem os TLRs e CD14 (Takeda et al., 2005; Aderem et al., 2000). Monócitos e neutrófilos têm papel central na fisiopatologia da sepse e estão envolvidos tanto com a resposta de defesa como com as seqüelas da doença (Hotchkiss et al., 2003; Annane et al., 2005; Martins et al., 2006). A capacidade fagocítica, bem como de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), são maiores em neutrófilos e monócitos de pacientes com septicemia, quando comparados com células de indivíduos saudáveis (Martins et al., 2008; Brunialti et al., 2006). Um aumento de apoptose dessas células em sangue total de pacientes com sepse foi descrito e associado ao aumento do metabolismo celular em resposta à produção de ERO (Fanning et al., 1999; Martins et al., 2003). Em neutrófilos isolados de sangue periférico de indivíduos normais ou com sepse, os componentes do plasma de pacientes com sepse influenciam negativamente a resposta oxidativa (Pascual et al., 1998).

Vários trabalhos correlacionam a mortalidade na sepse com a estimulação exacerbada do sistema imunológico. Níveis elevados da citocina pró-inflamatória

TNF(Fator de Necrose Tumoral)- α foram mostrados na sepse em modelos experimentais, mas esse perfil nem sempre é mostrado com humanos, que na maioria dos casos apresentam fatores consistentes com imunossupressão. Existe um debate sobre o papel das citocinas produzidas durante a resposta inflamatória sistêmica. A literatura mostra resultados contraditórios das terapias com antagonistas de TNF- α e IL-1 nos modelos experimentais e em triagens clínicas, com aumento ou diminuição da sobrevida nos casos de sepse. Enquanto para alguns as citocinas são consideradas culpadas pelo prognóstico de mortalidade na sepse, outros trabalhos mostram que elas têm efeitos benéficos (Hotchkiss and Karl, 2003). Em resposta aos macrófagos e células dendríticas, linfócitos T CD4 ativados podem ter resposta Th1 e secretar citocinas com propriedades inflamatórias tais como TNF- α , IFN (interferon)- γ , IL-2; ou resposta Th2 com secreção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e IL-4. Os fatores que determinam um tipo de resposta Th1 ou Th2 são desconhecidos, porém são influenciados pelo tipo de patógeno, pelo tamanho do inóculo bacteriano, e pelo sítio de infecção (Abbas et al., 1996). Em pacientes, as respostas mudam no decorrer da sepse: inicialmente, pode ser caracterizada pelo aumento de mediadores inflamatórios, e uma mudança para um estado imunossuprimido e antiinflamatório pode ocorrer quando a sepse persiste (Lederer et al., 1999; Oberholzer et al., 2001). Um defeito na proliferação das células T ou na secreção de citocinas pode gerar um quadro de anergia (ausência de resposta do hospedeiro ao patógeno), altamente correlacionado com a mortalidade. A morte celular por apoptose pode ser responsável pela anergia na sepse. Uma grande quantidade de linfócitos e células epiteliais gastrointestinais morre por apoptose durante a sepse. Além disso, o tipo de morte celular determina a resposta imunológica: células apoptóticas induzem anergia ou produção de citocinas antiinflamatórias que diminuem a resposta ao patógeno, enquanto células necróticas estimulam a resposta imune e aumentam a resposta antimicrobiana (Green & Beere, 2000; Fadok et al., 2000).

O conjunto de evidências sobre as alterações hemodinâmicas, a extensa ocorrência de morte celular e as modificações na resposta das células de defesa

em pacientes com sepse motivaram-nos à investigação de associações entre a infecção sistêmica e as funções biológicas da β_2 GPI. Além disso, nos levaram a buscar correlações entre a concentração plasmática da β_2 GPI e a evolução do quadro clínico desses pacientes. A abordagem do trabalho foi delineada a partir da hipótese de que sua ligação às superfícies de células em apoptose, microrganismos invasores, lipoproteínas modificadas, endotélio e plaquetas ativadas teria um papel sinalizador para fagócitos.

2. OBJETIVOS

- 1 - Estudar a ação da β_2 GPI sobre a resposta inflamatória de monócitos de sangue periférico humano;
- 2 - Estudar a ação da β_2 GPI sobre a diferenciação, proliferação e resposta a estímulos inflamatórios em uma linhagem de células monocíticas humanas (THP-1);
- 3 - Verificar se a concentração plasmática de β_2 GPI pode ser correlacionada com a intensidade da resposta inflamatória associada à sepse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e caracterização da β_2 GPI:

3.1.2. Purificação da β_2 GPI:

A β_2 GPI foi purificada a partir de “pool” de soro humano através de precipitação em ácido perclórico, seguida de cromatografia em coluna de afinidade Sepharose Heparina (Heparin Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare CL-6B):

3.1.2.1. Precipitação de soro humano em ácido perclórico:

Para cada 50 mL de soro, foram acrescentados 1,25 mL de ácido perclórico (MERCK), gota a gota durante 15 minutos e sob agitação constante. A mistura formada foi centrifugada a 11000 g por 30 minutos, a 4 °C (Refrigerate Centrifuge Himac CR20B2 – Hitachi). Após a centrifugação o sobrenadante foi colhido, neutralizado a pH 7,0 com carbonato de sódio saturado (MERCK) e dialisado em tampão Tris 20mM pH 7,0 contendo 30mM de NaCl, por 24 horas, a 4 °C.

3.1.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina:

Para a cromatografia, a amostra pré-purificada, resultante do processo de precipitação em ácido perclórico, foi diluída 1:2 em tampão de equilíbrio 30 mM NaCl / 20mM Tris pH 7,0, e passada pela coluna de afinidade num fluxo de 0,5 mL por minuto.

Após a passagem de toda a amostra, as frações apresentando ligações fracas ou inespecíficas foram eluídas lavando-se a coluna com tampão 50 mM NaCl /20 mM Tris, pH 7,0 , até que a absorbância do eluído fosse menor que 0,01.

Em seguida, um tampão de 200 mM NaCl / 20mM Tris, pH 8,0 foi aplicado para a eluição da β_2 GPI nativa e alíquotas de 2 mL foram colhidas e analisadas no espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Uniscience) num comprimento de onda

de 280 nm. O perfil de eluição foi determinado a partir do histograma da variação da densidade óptica das alíquotas coletadas, em função do volume eluído. As amostras ricas em proteína foram recolhidas, reunidas num volume único, dialisadas em membrana (Spectra/Por[®]) impermeável a moléculas orgânicas com peso molecular aproximado entre 5 e 14 kDa, contra água Milli-Q, filtradas em membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,22 μ m (Millipore[®]) e estocadas a -20 °C.

A coluna foi, então, lavada com tampão 500 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5 e reequilibrada com tampão 30 mM NaCl/20 mM Tris, pH 7,0.

Todo o procedimento de purificação foi realizado a 4 °C. Para liofilização, a proteína foi previamente congelada a -80 °C para processamento num aparelho Edwards/L4kr118, em condições de condensação a -40 °C e secagem a 15 °C sob vácuo de 10^{-4} mbar. A proteína liofilizada foi guardada em geladeira e reconstituída em água Milli-Q para uso.

A pureza e a estabilidade de cada lote de proteína purificado ou reconstituído após liofilização foram analisadas por eletroforese, imunoblot e ensaios imunoenzimáticos.

3.1.3. Eletroforese SDS-PAGE:

A eletroforese foi realizada num sistema Protean 3 (BioRad), com gel de SDS-PAGE (Dodecil sulfato de sódio - Gel de poliacrilamida), 12,5% por 80 minutos a 120 V e 2 A. Aplicaram-se 0,5 μ g de proteína em cada poço e 5 μ L do padrão de peso molecular Protein Molecular Weight Marker – Fermentas.

3.1.4. Imunoblote:

Amostras preparadas por SDS-PAGE 12,5% (2 μ g/poço) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amershan-Pharmacia Biotech) por 18 horas em geladeira (4 °C, 50 V, 400 mA). A membrana foi bloqueada em PBS Tween 0,05%, leite 5% por 2 horas sob agitação, lavada e incubada por uma noite sob agitação, a 4 °C, com Anticorpo Monoclonal (AcMo) anti- β_2 GPI humana, clone 5F7 (ICN) diluído 1/1000 em PBS Tween 0,05% leite 1%. Após nova lavagem, foi incubada com Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Fc específico), conjugado a Peroxidase (SIGMA) diluído 1/2000 em PBS Tween 0,05% leite 1%, por 1 hora sob agitação, lavada e revelada (2,5 mg diaminobenzidina; 15 mL PBS; 75 μ L H₂O₂ 30%).

3.1.5. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para β_2 GPI:

A diluição do anticorpo primário (AcMo anti- β_2 GPI) e as concentrações de β_2 GPI, tanto para a sensibilização da placa quanto para a competição, foram padronizadas para cada novo lote de proteína purificada. Como suporte, utilizaram-se placas Maxisorp (Nunc) de 96 poços incubadas com solução de β_2 GPI em tampão carbonato (Merck) / bicarbonato (Merck), pH 9,6 (100 μ L/poço).

3.1.5.1. ELISA direto:

O ensaio iniciou com a lavagem da placa com PBS Tween 0,05% (5 vezes), seguida por bloqueio com 200 μ L de PBS Tween leite 5% por 90 min a 37 °C. Após nova lavagem, incubou-se a placa com o AcMo anti- β_2 GPI 5F7 (ICN) diluído em PBS Tween leite 1% (100 μ L/poço, 1 hora, 37 °C). Depois, a placa foi lavada, incubada com 100 μ L de Anticorpo de Cabra Anti-IgG (específico para Fc) de

camundongo, conjugado a Peroxidase - SIGMA, (1/5000 em PBS Tween leite 1%, a 37°C, 1 hora), novamente lavada e revelada com substrato de orto-fenilenodiamina (OPD/Sigma) e água oxigenada. A leitura das amostras, em duplicatas, foi feita em 492 nm num espectrofotômetro SLT Spectra.

3.1.5.2. ELISA indireto:

Efetuuou-se a lavagem da placa, previamente sensibilizada com a proteína como descrito anteriormente, com PBS Tween 0,05% (5 vezes). Seguiu-se com a etapa de bloqueio com 200 μ L de PBS Tween leite 5% por 90 minutos a 37°C, nova lavagem e competição com concentrações crescentes de β_2 GPI pré-incubadas com o AcMo anti- β_2 GPI 5F7 (ICN) diluído em PBS Tween leite 1% (1 hora a 37°C, 100 μ L). Depois, a placa foi lavada, incubada com 100 μ L de Anticorpo de Cabra Anti-IgG (específico para Fc) de camundongo, conjugado a Peroxidase - SIGMA, (1/5000 em PBS Tween leite 1%, a 37°C, 1 hora), novamente lavada e revelada com substrato de OPD (Sigma) e água oxigenada. A leitura das amostras, em duplicatas, foi feita em 490 nm num espectrofotômetro SLT Spectra. A curva padrão foi determinada e representada no formato linear (% de ligação x log da concentração). Esse ensaio foi empregado para medir a concentração de β_2 GPI em soluções biológicas.

3.2. Aprovações dos Comitês de Ética e Pesquisa para realização dos ensaios biológicos

Os ensaios com sangue periférico humano foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Farmácia da USP (protocolo 440/2007 – Anexo 1). As amostras foram coletadas após consentimento livre e esclarecido dos voluntários.

O modelo experimental de sepse e translocação bacteriana em ratos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Protocolo 16/08 - Anexo 2).

3.3. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre monócitos isolados de sangue periférico humano:

Para este estudo utilizaram-se monócitos em sangue total ou isolados do sangue periférico humano de indivíduos voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, sem evidências de sinais e sintomas de processos infecciosos e/ou inflamatórios. Os critérios de exclusão foram idade abaixo de 18 anos, perfil lipídico alterado, história clínica de infecção recente ou doença inflamatória de qualquer tipo, com sinais e sintomas de inflamação no momento da coleta.

3.3.1. Dosagem de β_2 GPI, colesterol total e frações no soro dos indivíduos do grupo amostral:

Após jejum de 12 horas, foram colhidos 10 mL de sangue periférico dos voluntários participantes dos ensaios de citometria de fluxo, quimiluminescência e dosagem de $\text{NO}^\bullet$. O soro foi isolado, congelado imediatamente em alíquotas e descongelado uma única vez, para dosagem de β_2 GPI, colesterol total e frações.

A medida da concentração de β_2 GPI nas amostras foi realizada pelo ELISA indireto, conforme descrito no item 3.1.5.2.

Para determinar o perfil lipídico dos indivíduos, utilizaram-se kits de dosagem de Colesterol, HDL, LDL e Triglicérides (LABTEST) e calcularam-se as concentrações séricas de VLDL a partir das concentrações de triglicérides.

3.3.2. Separação dos monócitos do sangue periférico para os ensaios de quimiluminescência e produção de NO[•]:

Foram colhidos 40 a 50 mL de sangue periférico humano de voluntários sadios, em tubos heparinizados contendo vácuo (Vacutainer). Os tubos foram colocados para centrifugar (Centrífuga Eppendorf 5804R) a 317 g, por 10 minutos e o plasma obtido foi retirado e substituído por NaCl 0,9% estéril, seguindo-se uma suave homogeneização da suspensão resultante, por inversão do tubo. A suspensão foi transferida delicadamente para tubos cônicos de 15 mL estéreis (Corning), contendo 4 mL de Histopaque 1077[®] (Sigma) e uma nova centrifugação foi efetuada a 416 g por 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o anel de mononucleares foi recolhido e lavado 2 vezes com PBS estéril. As lavagens foram seguidas de centrifugações de 10 minutos, a 563 g e 361 g respectivamente. Para obtenção da população de monócitos, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet em 5 mL de RPMI e transferiu-se a suspensão celular para para tubos cônicos de 15 mL estéreis, contendo 5 mL de solução de gradiente de Percoll[®] (Sigma). Os tubos foram colocados para centrifugar a 317 g durante 30 minutos sob 24 °C, sendo que nessa centrifugação, a aceleração foi fixada na escala 2 da centrífuga e não foi utilizado freio para a interrupção do movimento. Em seguida, recuperou-se a nuvem de monócitos e lavou-se a suspensão celular com PBS estéril, seguida de centrifugação a 361 g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL de PBS adicionado de glicose, MgCl₂ (2 mM) e CaCl₂ (2 mM). Amostras das células isoladas foram diluídas em azul de Tripán isosmótico para contagem em Câmara de Neubauer e medida da viabilidade celular.

3.3.3. Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por monócitos isolados de sangue periférico humano através da quimiluminescência amplificada por luminol (QL-luminol):

Os ensaios de produção de ERO foram realizados em placas brancas (Nunc – Maxisorp Surface) de 96 poços, fundo chato. Para um volume final de 200 μ L, em cada poço, trabalhou-se com 10^5 células, 10^{-1} M de luminol, 20 μ g de β_2 GPI, 10^6 partículas de zimosan opsonizado (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma). Em todos os poços o volume final foi completado com PBS. Como branco da reação utilizamos a mistura de células e luminol. Para controle do efeito da proteína, as misturas de reação continham células, β_2 GPI e luminol.

As medidas de quimiluminescência foram feitas em luminômetro de placa (LB96V – EG&G BERTHOLD) equipado para leitura de emissão de luz em placas de 96 poços. A leitura da quimiluminescência foi registrada continuamente em Unidades Relativas de Luz por Segundo (RLU/s) e as curvas foram medidas pelo aparelho durante um período de 30 minutos, na temperatura de 37 °C.

3.3.4. Medida da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) por monócitos de sangue total humano através da citometria de fluxo:

O ensaio foi realizado com 100 μ L de sangue total heparinizado, 200 μ L de DCFH-DA 0,3 mM (2'7'-diclorofluoresceína diacetato - Sigma), 20 μ g/mL de β_2 GPI, 1 mM de L-NAME (éster de N⁹-nitro-L-arginina – OXIS) e como estímulo, 8×10^6 partículas de zimosan opsonizado ou $2,4 \times 10^8$ *Staphylococcus aureus*. O volume final de 1 mL foi completado com PBS. Como branco, utilizou-se célula e PBS; como basal, célula, DCFH-DA e PBS; e como controle, célula, DCFH-DA, β_2 GPI e PBS. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos sob agitação constante. Em seguida, 2 mL de EDTA 3 mM foram adicionados a cada tubo, para terminar a reação e uma nova centrifugação foi realizada. Após a

centrifugação (361 g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos contaminantes da porção contendo as células, foram lisados. Para isto, foram acrescentados, a cada tubo, 2 mL de NaCl 0,2% e, após 20 segundos, 2 mL de NaCl 1,6%, seguindo-se uma centrifugação e descarte do sobrenadante. Esse procedimento de lise hipotônica foi efetuado 3 vezes. Após a lise hipotônica, os monócitos foram marcados com Ac monoclonal CD14 PerCP (Proteína de Clorofila Peridina) (BD), 4 μ L por tubo, com incubação em câmara escura durante 15 minutos em temperatura ambiente. Uma centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi descartado e cada tubo recebeu 300 μ L de EDTA 3 mM para leitura no citômetro de fluxo. Em cada conjunto de medidas adquirimos 5.000 eventos baseados nos parâmetros *forward*- e *side-scatter*, que correspondem ao tamanho e complexidade respectivamente, combinados com as células CD14-PerCP positivas. A média geométrica da intensidade de fluorescência (MGIF) foi analisada usando FL-3 para histograma de células CD14 positivas e FL-1 para histograma de produção de ERON. Utilizamos um citômetro de fluxo FACSCAlibur (BD Bioscience) e o software CellQuest (BD Bioscience) para aquisição e análise dos eventos.

3.3.5. Medida da produção de NO[•] por monócitos isolados de sangue periférico humano:

A produção de NO[•] pelos monócitos foi determinada através da medida de nitritos (NO₂⁻) nos sobrenadantes celulares, utilizando-se o microensaio de Griess (Ding et al., 1988). Em microtubos de 0,5 mL, trabalhou-se com 10⁶ células, 70 ou 210 μ g de β_2 GPI e 10⁷ partículas de zimosan opsonizado, para um volume final de 200 μ L completado com meio RPMI-1640. Incubaram-se os microtubos por 30 minutos em estufa de 37°C, centrifugou-se o conjunto por 10 minutos a 1800 rpm numa temperatura de 4°C e transferiu-se cada sobrenadante (100 μ L) para uma placa de 96 poços. Os poços foram adicionados de 100 μ L de reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e α -naftil etilenodiamina 0,1%, misturados 1:1), e após 10 minutos determinaram-se as absorbâncias em leitor de ELISA, utilizando

filtro de 550 nm. O branco da reação constituiu de meio e reagente de Griess. Os resultados obtidos por densidade óptica (D.O.) foram transformados em μM de NO_2^- , mediante equação de regressão linear com base em curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) aplicadas no mesmo ensaio.

3.4. Estudo do efeito de $\beta_2\text{GPI}$ sobre células promonocíticas humanas (THP-1):

Células promonocítica humanas da linhagem THP-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), acrescido de estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL), em estufa incubadora a 37°C sob atmosfera com 5% CO_2 , umidade relativa de 95%.

3.4.1. Ensaio de QL-luminol com células THP-1:

As células THP-1 (10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços brancas de fundo transparente (Costar) contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e foram tratadas ou não com $\beta_2\text{GPI}$ (100 $\mu\text{g/mL}$) ou com PMA (50 ou 100 nM). As células sobrenadantes das culturas foram colhidas após 24, 48 e 72 horas de cultivo, e transferidas para os poços contendo PBS. As células aderidas foram lavadas 3 vezes com PBS e para a reação, completou-se com PBS em cada poço, o volume final de 300 μL de PBS. Em seguida, cada poço recebeu 10^{-1}M de luminol e de zimosan (10 partículas/célula). As medidas da QL-luminol foram realizadas como descrito no item 3.3.3.

3.4.2. Ensaio de proliferação das células THP-1:

As células THP-1 (10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI-1640 contendo concentrações crescentes de soro fetal bovino (0%, 2,5%, 5% e 10%) e foram tratadas ou não com β_2 GPI (100 μ g/mL) ou PMA (acetato de forbolmiristato – Sigma), 50 ou 100 nM. Os sobrenadantes das culturas foram colhidos após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A proliferação das células sobrenadantes foi acessada por contagem em câmara de Neubauer, excluindo-se as células mortas pela inclusão do corante azul de tripan.

3.4.3. Ensaio de adesão das células THP-1:

As células THP-1 (10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e foram tratadas com concentrações crescentes de β_2 GPI (10, 20, 40 e 80 μ g/mL). Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, os sobrenadantes das culturas foram retirados dos poços, que em seguida foram lavados 2 vezes com 300 μ L de PBS e tratados com TrypLETMExpress – Invitrogen (30 μ L/poço). Após 10 minutos, 70 μ L de meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e a suspensão celular de cada poço foi recolhida para contagem. A contagem de células aderidas foi realizada em câmara de Neubauer, excluindo-se as células mortas pela inclusão do corante azul de tripan.

3.4.4. Ensaio de citometria de fluxo para pesquisa de expressão de moléculas de superfície (CD54 e CD14):

As células THP-1 (10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 12 poços, em meio RPMI-1640 livre de soro fetal bovino ou contendo 10% de soro fetal

bovino. A β_2 GPI (25 e 100 μ g/mL) foi adicionada ao meio no momento do cultivo das células. Após 48 horas de cultivo a 37° em estufa de CO₂, os sobrenadantes das culturas foram retirados dos poços e centrifugados por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenante foi descartado, e as células foram ressuspensas em PBS para lavagem seguida de nova centrifugação. Após descarte do sobrenadante, o pellet celular foi ressuspendido, foram adicionados aos tubos 6 μ L de AcMo anti-CD14 marcado com PerCP (BD Pharmingen™) e 8 μ L de AcMo anti-CD54 marcado com PE (BD Pharmingen™) e os tubos foram incubados por 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente. Como controles das marcações, os anticorpos não foram adicionados em um dos tubos, e marcações simples foram feitas em outros, adicionando-se separadamente os AcMo anti-CD14 e anti-CD54. A citometria de fluxo foi realizada em FACSCanto™II (BD) e para cada medida, foram adquiridos 50.000 eventos distribuídos nos parâmetros *forward-scatter* e *side-scatter*. A intensidade de fluorescência de PerCP e PE das células marcadas com anti-CD14 ou anti-CD54 respectivamente, foi analisada em software FlowJo v.7.5, e os dados emitidos em porcentagem de marcação.

3.5. Estudo da correlação da concentração plasmática de β_2 GPI com a intensidade da resposta inflamatória associada à sepse:

3.5.1. Determinação das concentrações de β_2 GPI, Proteína C Reativa (PCR), Proteína Amiloide Sérica A (SAA) e Interleucina-8 (IL-8) em soro humano de indivíduos com sepse:

Foram incluídos nesse estudo 16 indivíduos saudáveis, de diferentes faixas etárias, que não estavam em uso de medicação e 38 pacientes com quadro clínico laboratorial de sepse (13), sepse grave (10) ou choque séptico (15), classificados de acordo com as definições do consenso da Sociedade de Terapia intensiva e Colégio Americano de Tórax de 1992 (Bone et al.; 1992), admitidos no Hospital São Paulo e no Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo. Os dados

clínico-epidemiológicos dos pacientes incluídos neste estudo estão tabulados em anexo (Anexo 3).

Os critérios de exclusão para participação dos grupos de estudo foram: Indivíduos menores de 18 anos, pacientes em estágio terminal de outras doenças graves, como neoplasias ou AIDS; pacientes recebendo qualquer terapia experimental; pacientes com evento definidor de sepse grave ou choque ocorrido há mais de 48 h; pacientes moribundos ou com morte iminente.

A coleta do sangue foi realizada em até 72 horas após o diagnóstico clínico de sepse ou até 48 horas após manifestação da primeira disfunção orgânica nos pacientes com sepse grave ou choque séptico. As amostras de sangue, colhidas em tubo seco a vácuo, foram centrifugadas a 700 g por 15 min à temperatura ambiente para separação do soro, que foi aliquotado e armazenado a -80°C para dosagem de $\beta_2\text{GPI}$, SAA, PCR e IL-8. O material foi descongelado uma única vez, para as medidas.

3.5.1.1. Determinação da concentração sérica de $\beta_2\text{GPI}$:

O ensaio ELISA indireto para $\beta_2\text{GPI}$, descrito anteriormente (item 3.1.5.2), foi utilizado na dosagem da proteína nas amostras de soro (1/200). Utilizou-se a $\beta_2\text{GPI}$ liofilizada (lote 4) nas etapas de sensibilização e competição. Como Ac primário utilizou-se AcMo 5F7 (1/1000).

3.5.1.2. Determinação da concentração sérica de SAA:

Um kit ELISA para SAA (Hemagen[®]) foi utilizado para a dosagem manual, conforme as instruções do fabricante.

3.5.1.3. Determinação da concentração sérica de IL-8:

Utilizou-se o kit ELISA para IL-8 (human CXCL8/IL-8 – R&D). O procedimento seguiu as instruções do fabricante.

3.5.1.4. Determinação da concentração sérica de PCR:

A PCR foi determinada por método nefelométrico (High Sensitivity CRP, Dade Behring Marburg Germany) num sistema automatizado, no Setor de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP (HU/USP).

3.5.2. Modelo experimental de sepse e translocação bacteriana (TB):

Ratos Wistar machos, com 3 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), mantidos em jejum por 24 horas foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos segundo o modelo experimental (Koh & Silva, 1996a; Silva et al., 1998):

- Grupo Controle Sem Manipulação: CR0 (n=2);
- Grupo de Controle de Manipulação para Translocação Bacteriana (CTB): Injeção de 10 mL de soro fisiológico no intestino delgado (n=3);
- Grupo de Translocação Bacteriana (TB): Inoculação de 10 mL de bactérias *E. coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) no intestino delgado (n=5);
- Grupo de Controle de Manipulação para Sepse (CS): Injeção de soro fisiológico (1 mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (n=3);
- Grupo de Sepse ($S 10^7$): Inoculação de bactérias *E. coli* R-6 (10^7 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (n=6);
- Grupo de Sepse ($S 10^9$): Inoculação de bactérias *E. coli* R-6 (10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (n=8).

3.5.2.1. Amostra microbiológica

Para indução da sepse e da translocação bacteriana, 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 vitro* e *in vivo* foram preparadas em soro fisiológico (Koh & Silva, 1996a; Koh et al., 1996a e 1996b).

3.5.2.2. Inoculação de bactérias em ratos para indução de translocação bacteriana:

Para estudo da TB, os animais foram anestesiados com Ketamina (Agribands do Brasil Ltda, Brasil) + Xilasina (Agribands) 2:8, dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, intraperitoneal. Em seguida, realizou-se antissepsia 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 soro fisiológico para CTB. 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.

3.5.2.3. Inoculação de bactérias em ratos para indução de sepse:

Para indução de sepse, após a laparotomia, inoculou-se 10^7 ou 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal de bactérias *E. coli* R-6 na veia cava inferior. Realizou-se hemostasia do local da punção com subsequente fechamento da

parede abdominal em dois planos com sutura contínua. Para o grupo CS, a suspensão foi substituída por soro fisiológico (1 mL/100 g de peso).

3.5.2.4. Coleta da linfa, do sangue e dos órgãos dos animais:

Após 3 horas da inoculação bacteriana, tempo suficiente para que o fenômeno da TB aconteça, todos os animais sofreram nova laparotomia abdominal sob anestesia. A coleta de material foi realizada de maneira sequencial: primeiro a linfa (1 mL) do ducto linfático mesentérico, canulado e exteriorizado; depois o sangue da veia porta (5 mL) em seringa com 0,1 mL de EDTA e finalmente fígado, linfonodo mesentérico e intestino delgado (íleo). A eutanásia foi realizada por exsanguinação sob anestesia, ao final do procedimento de coleta.

3.5.2.5. Análise microbiológica do fígado e do linfonodo mesentérico dos ratos:

O fígado e o linfonodo mesentérico dos animais foram submetidos à trituração, ressuspensos em soro fisiológico e filtrados em gaze, em condições estéreis. Alíquotas de 100 μ L do macerado dos órgãos foram semeadas em placas de Petri contendo meio de Agar MacConkey. Após incubação a 37 °C por 18 - 24 horas, foi feita a contagem do número de colônias bacterianas presentes em cada placa de cultura para análise da infecção tecidual por TB ou sepse.

3.5.2.6. Determinação da concentração de β_2 GPI no plasma e na linfa dos animais:

A linfa e o plasma dos animais, separado por centrifugação a 2000 g por 15 minutos, foram congelados no freezer a -20°C.

3.5.2.6.1 Testes de reatividade do AcMo anti- β_2 GPI humana com amostras de rato:

β_2 GPI purificada de plasma humano (2 μ g) e amostras de plasma de rato (1/200) foram aplicadas em um sistema Bio-Dot SF (Bio-Rad) contendo membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) previamente umedecida em água Milli-Q (2 minutos) e em seguida em PBS (10 minutos). O sistema foi ligado a uma bomba de vácuo para melhor adesão das camadas. Após completa absorção das soluções, a membrana foi bloqueada em PBS Tween 0,05%, leite 5% por 2 h sob agitação, lavada e incubada por uma noite sob agitação, a 4 °C, com AcMo anti- β_2 GPI humana 5F7 (1/2000 em PBS Tween 0,05% leite 1%). Após nova lavagem, foi incubada com Anticorpo IgG de camundongo conjugado a fosfatase (SIGMA) diluído 1:2000 em PBS Tween 0,05% leite 1%, 1 h sob agitação, lavada e revelada NBT (Azul de tetrazólio) e BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3'-Indol-fostato).

3.5.2.6.2. ELISA indireto para β_2 GPI dos ratos

A concentração de β_2 GPI foi determinada no plasma dos animais submetidos ao modelo de sepse e TB e na linfa dos animais submetidos ao modelo de TB pelo ensaio ELISA indireto para β_2 GPI, descrito no item 3.1.5.2.

3.5.2.7. Imuno-histoquímica para β_2 GPI no fígado e no intestino dos ratos:

3.5.2.7.1. Processamento das amostras e confecção das lâminas:

Imediatamente após a coleta, fragmentos de fígado e intestino foram lavados com solução fisiológica e fixados em metacarn (Metanol, 60%;

clorofórmio, 30%; ácido acético glacial, 10% - BEHMER, 1976) a 4°C durante 3 a 4 horas e, posteriormente, em etanol absoluto a 4°C durante 12 a 24 horas. O intestino foi cortado transversalmente com bisturi e fixado aberto sobre papel filtro, para melhor visualização das vilosidades. Em seguida, os fragmentos dos tecidos foram incluídos em parafina e congelados a -20°C, para posterior obtenção de cortes histológicos de 3 μ m através de um micrótomo manual. Os cortes foram distendidos por flutuação em água destilada a temperatura ambiente, transferidos para lâminas de vidro previamente silanizadas e aderidos à superfície em banho de água destilada a 4°C. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em estufa a 55°C, por no mínimo 24 horas, e submetidas a banhos em xilol a 40°C por 30 minutos, xilol a temperatura ambiente por 20 minutos e em etanol absoluto a temperatura ambiente por 30 minutos, duas vezes. O material foi progressivamente hidratado com banhos de 3 minutos em etanol 95%, etanol 80% e água destilada.

3.5.2.7.2. Ensaio imuno-histoquímico para β_2 GPI:

Para as reações imuno-histoquímicas, preveniu-se a formação de ligações inespecíficas passando as lâminas por um banho de 20 minutos em Tampão Tris-HCl 50 mM, Tween 0,1% (TBST), acrescido de leite desnatado a 5%, seguido de três banhos de 5 minutos cada, em tampão de lavagem (TBST). Nessa etapa de bloqueio para ligações inespecíficas, o material ainda foi submetido à incubação em tampão TBS acrescido de *pool* de soro de cabra (5%), por 30 minutos à 37°C. As lâminas foram então incubadas com AcMo anti- β_2 GPI clone K₂2 (1/1000) a 37°C por 2 horas e lavado em TBST (três banhos de 5 minutos cada). A reação foi revelada com o sistema EnVision[®] Fosfatase Alcalina (Dako), um polímero conjugado à Fosfatase Alcalina, associado a Ac anti-IgG de camundongo e coelho. Este polímero é mais sensível do que a maioria dos sistemas utilizados em imuno-histoquímica para amplificação do sinal de ligação do Ac primário e é livre de biotina, sendo conveniente para amostras de fígado. As lâminas foram

incubadas com o polímero durante 30 minutos sob uma temperatura de 37 °C, e lavadas em TBST (três banhos de 5 minutos cada). O cromógeno Fast Red[®] (Dako), acrescido de Levamisol, preparado no momento do uso, foi aplicado sobre os cortes e deixado em repouso até que fosse observada reação cromógena satisfatória (5 ± 1 minutos, à temperatura ambiente). A revelação foi bloqueada por imersão dos cortes em água destilada por 5 minutos.

3.5.2.7.3. Contra-coloração dos tecidos para análise morfológica:

Os tecidos foram contra-corados com imersão em Hematoxilina de Harris por 10 segundos, seguido de banho em água destilada corrente, dez mergulhos em cuba contendo água amoniacal (Hidróxido de Amônio 0,5%) e lavagem em água destilada corrente. Finalmente, as lâminas receberam uma camada de meio de montagem aquoso Ultramount[®] (Dako) sobre os cortes e permaneceram em estufa sob uma temperatura de 55 °C durante 30 a 40 minutos, ou até que o meio estivesse completamente seco.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo Dr. José Luiz Menchaca Díaz, e os ensaios microbiológicos pela Dra. Ana Maria Alvim Liberatore, em colaboração. A obtenção do AcMo anti- β_2 GPI humana clone K₂2 e padronização do método imuno-histoquímico, foram realizados por Carolina Nigro Stella, durante seu trabalho de mestrado no nosso grupo de pesquisa (Stella, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da β_2 GPI sobre monócitos isolados de sangue periférico humano:

4.1.1. Caracterização da β_2 GPI utilizada nos ensaios:

A purificação da β_2 GPI é um procedimento de rotina no nosso laboratório, com rendimento de 12-15 mg/L de soro. Ensaios de eletroforese SDS/PAGE corado pela prata, imunoblot e ELISA são sempre usados para identificar a presença de contaminantes e a perda de características estruturais durante o armazenamento e após liofilização. As soluções padrão utilizadas nesse trabalho apresentaram obrigatoriamente aspecto límpido e incolor e a banda múltipla, característica da β_2 GPI nativa em SDS-PAGE, na altura correspondente ao peso molecular de 45 kDa (figura 10). A presença da banda múltipla foi mostrada por outros autores com pesos moleculares que variam de 40 a 66 kDa (Polz et al, 1980; Cai et al, 1996; Brighton et al, 1999). As diferenças na densidade de glicosilação são citadas como a principal fonte da variação no peso molecular aparente (Galazka *et al*, 1998). A proteína pode ainda formar agregados diméricos e multiméricos que caracterizam as bandas de alto peso molecular, enquanto as de baixo peso molecular podem corresponder a formas clivadas da proteína (Cai, *et al*, 1996; Galazka *et al*, 1998, Horbach *et al*. 1999).

Figura 10: SDS-PAGE 12,5% de β_2 GPI purificada a partir da precipitação de soro humano em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B. A: Lote 20, B: Lote 15 e C: Lote 29 – Linha 1: Padrão de Peso Molecular; Linha 2 – Gel corado pela prata; Linha 3 – Imunoblote com AcMo anti- β_2 GPI 5F7(ICN).

4.1.2. Caracterização do grupo amostral:

As médias e desvios padrão das concentrações plasmáticas de β_2 GPI, colesterol total e frações lipídicas em indivíduos saudáveis (9 mulheres e 10 homens) estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Concentrações plasmáticas de β_2 GPI, colesterol total e frações lipídicas do grupo amostral (n=19).

		β_2 GPI [*]	Colesterol ^{**}	Triglicérides ^{**}	HDL ^{**}	LDL	VLDL
	Idade	(μ g/mL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Média	25	179	177	101	44	113	20
D.P.	4	47	34	47	8	31	10

^{*}ELISA indireto

^{**}Ensaio colorimétrico

A análise da correlação entre as concentrações de β_2 GPI e as lipoproteínas sugere correlações fracas entre β_2 GPI e colesterol total e entre β_2 GPI e LDL. Para VLDL e triglicérides as correlações são muito fracas. Não existiu correlação ente β_2 GPI e HDL circulantes (figura 11).

Figura 11: Distribuição das concentrações plasmáticas de β_2 GPI versus colesterol total (A), HDL (B), LDL (C), VLDL (D) e triglicédeos (E), determinadas em amostras de soro dos indivíduos voluntários ($n=19$), pertencentes ao grupo amostral desse trabalho.

4.1.3. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo de monócitos de sangue periférico humano:

O metabolismo oxidativo de monócitos isolados de sangue periférico foi analisado através da QL-luminol, durante a fagocitose de zimosan opsonizado. A figura 12 mostra um aumento da quimiluminescência no grupo de células estimuladas com zimosan opsonizado em comparação com as células em repouso. Nenhum efeito da β_2 GPI (70 μ g/mL) foi observado sobre os monócitos, em repouso ou durante a fagocitose do zimosan.

Figura 12: Efeito da β_2 GPI (70 μ g/mL) na QL-luminol de monócitos (10^5 células) estimulados com zimosan opsonizado (10^6 partículas). Áreas integradas das curvas de emissão de luz, medidas em URL/s durante 30 min a 37°C em luminômetro de placa Berthold. Variação dos valores relativa ao grupo controle (n=6).

A citometria de fluxo permitiu estudar o metabolismo oxidativo das células em sangue total, minimizando os interferentes do microambiente celular. Analisamos a oxidação intracelular da DCFH (diclorofluoresceína) na população de monócitos, com base na distribuição populacional segundo o tamanho e a complexidade das células e na marcação com AcMo anti-CD14-PerCP (figura 13). Nossos resultados mostraram um aumento do metabolismo oxidativo dos monócitos durante a fagocitose de zimosan opsonizado ou de *S. aureus*. A adição

de β_2 GPI (20 ou 60 $\mu\text{g/mL}$) não modificou a oxidação da DCFH dessas células nos grupos estudados (figura 14).

Figura 13: Citometria de fluxo de sangue total humano. Dispersão frontal de luz (abscissa) e dispersão lateral de luz (ordenada), correspondendo ao tamanho e complexidade, respectivamente. A região selecionada (R1) corresponde à população de células marcadas com AcMo anti-CD14-PerCP. Para análise da oxidação da DCFH, foram adquiridos 5000 eventos nesta região. Para aquisição e análise dos eventos, utilizaram-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) e o software CellQuest (BD Bioscience).

Figura 14: Efeito da β_2 GPI (20 e 60 $\mu\text{g/mL}$) na oxidação da DCFH pelas espécies reativas produzidas por monócitos de sangue total dos grupos controle, estimulado com zimosan opsonizado (8×10^6 partículas/mL) e estimulado com *S. aureus* ($2,4 \times 10^9$). Média geométrica de intensidade de fluorescência das células marcadas, medida em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Variação dos grupos relativa ao controle basal não estimulado (n=6).

4.1.4. Estudo do efeito da β_2 GPI sobre a produção de $\text{NO}^\bullet$:

A produção de $\text{NO}^\bullet$ por monócitos isolados de sangue periférico foi determinada indiretamente pela dosagem de nitritos nos sobrenadantes das células. Nenhuma diferença foi verificada entre o grupo de monócitos em repouso e o grupo estimulado com zimosan opsonizado (figura 15). A figura também mostra que nas concentrações estudadas (70 e 210 $\mu\text{g/mL}$), a β_2 GPI não modificou a produção de $\text{NO}^\bullet$ pelas células de ambos os grupos.

Figura 15: Efeito da β_2 GPI sobre a produção de $\text{NO}^\bullet$ por monócitos isolados de sangue periférico. Determinação de NO_2^- nos sobrenadantes das células (10^6 cel/mL) em repouso ou estimuladas com zimosan opsonizado (10^7 partículas), na presença ou não da β_2 GPI (70 e 210 $\mu\text{g/mL}$). Microensaio de Griess (n=4).

4.2. Efeitos da β_2 GPI sobre a linhagem de célula monocítica humana (THP-1):

4.2.1. Efeito da β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo das células THP-1:

As células THP-1 não produziram ERO. Nenhuma QL-luminol foi obtida nos ensaios com células THP-1, sobrenadantes ou aderidas em placa de cultura de 96 poços, após tratamento com PMA (50 ou 100 nM) ou β_2 GPI (100 μ g/mL) ou zimosan opsonizado (10 partículas/célula).

4.2.2. Efeito da β_2 GPI sobre a proliferação das células THP-1:

Monitoramos a proliferação das células THP-1 em condições distintas de suplementação do meio de cultura com SFB (0%, 2,5%, 5% e 10% de SFB). Observamos um aumento no tempo de dobramento das células THP-1, quando cultivadas em meio de cultura sem SFB. Nenhuma modificação no tempo de dobramento foi observada entre os grupos na presença de β_2 GPI, sugerindo que a proteína tem um efeito sobre as THP-1 de manter a proliferação celular independente de SFB (figura 16).

A figura 17 ilustra o efeito da β_2 GPI sobre a proliferação das células THP-1 na presença de PMA. Além de aumentar a proliferação das células THP-1, a β_2 GPI (100 μ g/mL) bloqueou o efeito inibitório de PMA sobre a proliferação dessas células em cultura livre de soro fetal bovino.

Figura 16: Efeito da β_2 GPI (100 μ g/mL) sobre a proliferação de células THP-1 (n=3). A β_2 GPI mantém a sobrevivência celular na ausência de soro (Teste de Tukey para amostras repetidas, $p < 0,05$ em meio sem soro). Tempo de dobramento das células cultivadas em meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino ou com 2,5%, 5% e 10% de soro fetal bovino. Contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, recolhidas após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Figura 17: Efeito da β_2 GPI (100 μ g/mL) sobre a proliferação de células monocíticas THP-1 na presença de PMA (50nM e 100nM). Contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, colhidas após 48 de cultivo em meio RPMI-1640 livre de soro fetal bovino. Média de dois ensaios independentes.

4.2.3. Efeito da β_2 GPI sobre a adesão de células THP-1:

O efeito dose-dependente da β_2 GPI de aumentar a adesão das células THP-1, em meio RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino está mostrado na figura 18.

Figura 18: Efeito da β_2 GPI (10, 20, 40 e 80 μ g/mL) sobre a adesão de células monocíticas THP-1 em placas de cultura. Contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, colhidas após 24, 48 e 72 horas de cultivo em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino. Média de dois ensaios independentes.

4.2.4. Efeito da β_2 GPI sobre a expressão de CD14 e CD54 em THP-1:

Utilizou-se AcMo anti-CD14 marcado com PerCP e anti-CD54 marcado com PE para analisar a expressão dessas moléculas na superfície nas células THP-1. Os parâmetros *forward*- e *side-scatter* mostraram uma distribuição heterogênea das células, apresentando três populações celulares distintas. Denominamos as populações de A, B e C, de acordo com a distribuição crescente de tamanho e complexidade (figura 19).

Figura 19: Citometria de fluxo das células THP-1. Distribuição da população celular nos parâmetros de dispersão frontal de luz (*forward-scatter* - FSC-A) e dispersão lateral de luz (*side-scatter* - SSC-A) adquirida em FACSCantum™II. Aquisição dos eventos (50.000) em FACSCanto™II e análise em software FlowJo v.7.5.

A fluorescência de PerCP e PE foi analisada em cada uma dessas populações separadamente. A molécula de superfície CD54 foi detectada nas células do grupo controle (populações B e C), que por sua vez não mostraram, ou mostraram muito baixa expressão de CD14 (figura 20). A β_2 GPI induziu o aumento da expressão de CD54 e CD14 nas THP-1. Esse efeito da β_2 GPI foi dose-dependente e mostrou-se independente de soro fetal bovino. A indução da expressão de CD14 foi dependente da expressão de CD54 na superfície das células (tabela 2).

Figura 20: Expressão de CD14 e CD54 nas populações de THP-1 A, B e C. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640, livre de soro fetal bovino (I), ou em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (II) por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂. Marcação celular com AcMo anti-CD14-PerCP e anti-CD54-PE, aquisição dos eventos (50.000) em FACSCanto™II e análise dos dados em software FlowJo v.7.5. Os valores numéricos correspondem à porcentagem de células em cada quadrante.

Tabela 2: Porcentagem de expressão de CD14 e CD54, total (marcação simples + dupla marcação) ou em dupla marcação (CD14+CD54) na superfície de células THP-1. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640, não suplementado (- soro) ou suplementado com 10% de soro fetal bovino (+ soro), por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂, na ausência ou na presença de β_2 GPI (25 ou 100 μ g/mL). Marcação celular com AcMo anti-CD14-PerCP e anti-CD54-PE. Aquisição dos eventos (50.000) em FACSCanto™II e análise dos dados em software FlowJo v.7.5. (n=3)

β_2 GPI (μ g/mL)	Sem expressão		CD54 total		CD14 total		CD54+CD14	
	- soro	+ soro	- soro	+ soro	- soro	+ soro	- soro	+ soro
0	75,0 $\pm$ 16,4	78,5 $\pm$ 15,7	15,0 $\pm$ 10,2	11,1 $\pm$ 8,0	1,4 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,5
25	58,8 $\pm$ 27,0 ^a	65,4 $\pm$ 16,4 ^a	29,7 $\pm$ 19,8 ^a	24,7 $\pm$ 9,6 ^a	9,1 $\pm$ 7,3 ^a	3,7 $\pm$ 2,8 ^a	8,6 $\pm$ 6,9 ^a	3,6 $\pm$ 2,8 ^a
100	60,5 $\pm$ 19,5 ^a	48,4 $\pm$ 18,9 ^{abc}	30,0 $\pm$ 13,8 ^a	40,3 $\pm$ 13,0 ^{abc}	11,8 $\pm$ 9,5 ^a	8,2 $\pm$ 5,4 ^a	11,5 $\pm$ 9,2 ^a	8,0 $\pm$ 5,7 ^a

^a estatisticamente diferente do controle sem β_2 GPI

^b estatisticamente diferente dos valores de β_2 GPI 25 μ g/mL

^c estatisticamente diferente dos valores de β_2 GPI 100 μ g/mL, sem soro

4.3. Efeito da inflamação associada a sepse sobre as concentrações plasmáticas de β_2 GPI:

4.3.1. Determinação das concentrações de β_2 GPI em soro humano de indivíduos com sepse

A concentração plasmática da β_2 GPI não apresentou diferenças entre os grupos de indivíduos saudáveis e com sepse; nem entre os grupos distribuídos segundo a gravidade do quadro nos estádios clínicos: sepse, sepse grave e choque séptico. Tampouco foi possível identificar correlações com IL-8, SAA e PCR. Essas proteínas de fase aguda também não discriminaram o estágio clínico e não mostraram correlações entre si. No entanto, as concentrações de SAA, PCR e IL-8 foram diferentes para os grupos de sepse, em relação ao grupo controle. A média aritmética e o desvio padrão dos valores séricos das proteínas pesquisadas estão mostrados na tabela 3.

Por outro lado, a análise das concentrações plasmáticas de β_2 GPI segundo o foco infeccioso revelou que a origem da sepse talvez seja relevante para a determinação das suas concentrações plasmáticas.

Entre os pacientes com foco infeccioso no pulmão, que representam quase 50% das amostras, a distribuição das concentrações mostrou uma ordem crescente com a gravidade do quadro clínico (tabela 4).

Tabela 3: Concentração de β_2 GPI, SAA, PCR e IL-8 séricas em indivíduos saudáveis e em diferentes estádios de sepse. Determinação quantitativa por ELISA para β_2 GPI utilizando AcMo 5F7. Revelação com Ac anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

Grupos	β_2 GPI (mg/mL)	SAA (mg/mL)	PCR (mg/L)	IL-8 (pg/mL)
	Média $\pm$ D.P.	Média $\pm$ D.P.	Média $\pm$ D.P.	Média $\pm$ D.P.
Controle	231 $\pm$ 56	4 $\pm$ 8	3,2 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,8
Sepse	169 $\pm$ 60	241 $\pm$ 75	139 $\pm$ 60	157 $\pm$ 146
Sepse Grave	187 $\pm$ 38	402 $\pm$ 394	183 $\pm$ 142	147 $\pm$ 39
Choque Séptico	179 $\pm$ 72	176 $\pm$ 126	166 $\pm$ 126	113 $\pm$ 127

Esta correlação entre concentração de β_2 GPI e gravidade clínica não ocorreu com os pacientes com foco infeccioso no abdome. Embora o grupo de pacientes com foco abdominal seja pequeno - o que dificulta a análise por postos - os valores foram mais baixos para todos os indivíduos deste grupo em comparação com os outros grupos estudados.

Tabela 4: Concentração de β_2 GPI sérica nas condições clínicas de sepse em geral e nos seus diferentes estadios, discriminando o foco infeccioso da infecção.

FOCO INFECCIOSO	SEPSE		SEPSE GRAVE		CHOQUE SÉPTICO		Totais	
	N	β_2 GPI*	N	β_2 GPI*	N	β_2 GPI*	n	β_2 GPI*
<u>Controle Negativo</u>	-	-	-	-	-	-	15	231 $\pm$ 56
<u>Extra-abdominal</u>	13	169 $\pm$ 62	7	195 $\pm$ 43	11	205 $\pm$ 67	31	188 $\pm$ 61
Pulmonar	5	151 $\pm$ 39	6	195 $\pm$ 33	5	243 $\pm$ 69	16	201 $\pm$ 59
Outros	8	180 $\pm$ 73	1	126	6	178 $\pm$ 57	15	176 $\pm$ 63
<u>Abdominal</u>	-	-	2	151	3	91 $\pm$ 28	5	115 $\pm$ 39

* μ g/mL, média aritmética $\pm$ desvio padrão

Considerando o desequilíbrio do número de amostras entre os grupos apresentados na tabela 4, e que não há amostras de pacientes classificados no estadio sepse com foco abdominal, comparamos os controles saudáveis com os pacientes considerando apenas o foco infeccioso pulmonar ou abdominal. Isto resulta em três grupos, apenas: um grupo de controles saudáveis (n=15; β_2 GPI= 231 $\pm$ 56) e dois grupos de pacientes de sepse grave+choque séptico: um com foco pulmonar (n=11; β_2 GPI= 221 $\pm$ 53) e um com foco abdominal (n=5; β_2 GPI= 115 $\pm$ 39). O desequilíbrio entre os grupos ainda não permite confiar num teste ANOVA, porém sugere efeitos de via de infecção.

4.3.2. Estudo da variação das concentrações plasmáticas de β_2 GPI em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana:

A sequência de aminoácidos da β_2 GPI é altamente conservada em humanos, bovinos, caninos, chimpanzés, ratos e camundongos, o que possibilita reatividade cruzada de Ac anti- β_2 GPI entre as espécies (Kato, et al, 1991; Bendixen, et al, 1992; Nonaka, et al, 1992; Ayoama, et al, 1989). Antes da determinação plasmática da β_2 GPI nas amostras do nosso modelo experimental com ratos, analisamos a reatividade do AcMo anti- β_2 GPI humana 5F7 (ICN) com as amostras desses animais. A figura 21 confirma a literatura quanto à similaridade entre a reação do Ac Mo com β_2 GPI purificada de plasma humano e a reação com a amostra de plasma de rato, em ensaio dot-blot. Este resultado nos permitiu dosar a β_2 GPI nas amostras dos ratos, por ELISA indireto, utilizando o AcMo anti- β_2 GPI humana 5F7 (ICN).

Figura 21: Ensaio dot-blot em membrana de nitrocelulose, de amostra de β_2 GPI purificada a partir de soro humano (2 μ g/poço) e de plasma de rato (1:200) com AcMo 5F7 anti- β_2 GPI humana (1:2000). Revelação com Ac anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase e substrato NBT/BCIP.

A concentração plasmática de β_2 GPI evidenciou diferenças entre os grupos experimentais, tanto com procedimento de infecção quanto com a concentração do inóculo. Os animais dos grupos controles do modelo (CTB, CS e CR0) têm uma concentração de β_2 GPI mais alta do que os animais inoculados com a bactéria. Entre os grupos controle, as concentrações dos animais naive (CR0) são maiores do que a dos animais submetidos à cirurgia (CTB e CS) (Tabelas 5 e 6). Os grupos de animais submetidos à sepse mostraram níveis diminuídos de β_2 GPI plasmática em comparação aos seus controles (Tabela 5). Sugere-se uma correlação inversa entre a concentração plasmática da proteína e a intensidade da

seps (S10⁷ e S10⁹). Entretanto, a via de infecção modificou as concentrações de forma independente da intensidade da infecção, porque concentrações baixas também foram observadas no grupo TB (Tabela 6). Para ter acesso à produção intestinal da β_2 GPI, os níveis da proteína foram dosados na linfa dos animais dos grupos TB e CTB. Esses dois grupos não apresentaram diferenças na concentração linfática da β_2 GPI nem entre si, nem em relação ao grupo CR0. Os níveis plasmáticos da β_2 GPI dependeram da drenagem linfática intestinal. A derivação da linfa preveniu completamente a diminuição da concentração plasmática de β_2 GPI observada nos animais submetidos à translocação bacteriana (Tabela 6).

Tabela 5: Concentração plasmática da β_2 GPI e distribuição tecidual de *E. coli* R-6 em fígado e linfonodo mesentérico de ratos Wistar, após 3 horas de infecção. Legenda: CR0: controle sem manipulação; CS: controle de manipulação para seps; S 10⁷: seps (inoculação de bactérias *E. coli* R-6 - 10⁷ UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior; S 10⁹: seps (inoculação de bactérias *E. coli* R-6 - 10⁹ UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior.

Grupos	β_2 GPI (μ g/mL) ^a [n]	Infecção (UFC/g) ^a [n =6]	
		Fígado	Linfonodo Mesentérico
CR0	420 $\pm$ 6 [2]	0	0
CS	335 $\pm$ 17 [3]	0	0
S 10 ⁷	291 $\pm$ 48 [6]	1,7E+04 ^b	1,0E+00 ^b
S 10 ⁹	223 $\pm$ 39 [8] ^b	8,0E+07 ^b	1,0E+01 ^b

^a média aritmética dos valores independentes $\pm$ desvio padrão

^b estatisticamente diferente do respectivo controle

Tabela 6: Concentrações plasmática e linfática da β_2 GPI e distribuição tecidual de *E. coli* R-6 em fígado e linfonodo mesentérico de ratos Wistar, após 3 horas de infecção. Legenda: CR0: controle sem manipulação; CTB: controle da manipulação para TB; TB: translocação bacteriana (infecção intraluminal com 10¹⁰UFC/mL/kg).

Grupos	β_2 GPI ($\mu\text{g/mL}$) ^a [n]			Infection (UFC/g) ^a [n =6]	
	Plasma	Linfa	Plasma ^{DL}	Fígado	Linfonodo Mesentérico
C	420 $\pm$ 6 [2]	474 $\pm$ 6 [2]	-	0	0
CTB	347 $\pm$ 43 [3]	377 $\pm$ 85 [5]	-	0	0
TB	189 $\pm$ 27 [6] ^b	395 $\pm$ 83 [8]	418 $\pm$ 68 [8] ^c	6,5E+03 ^b	6,7E+05 ^b

^a média aritmética dos valores independentes $\pm$ desvio padrão

^b estatisticamente diferente do respectivo controle

^c estatisticamente diferente do plasma sem derivação da linfa

^{DL} Plasma colhido após drenagem da linfa mesentérica

No conjunto, a concentração plasmática de β_2 GPI não pode ser relacionada apenas à gravidade do quadro clínico, uma vez que a mortalidade (48h) associada a cada uma das condições do modelo é de 0% para os grupos Controle, S10⁷ e TB, e 50% para o grupo S10⁹. A funcionalidade do modelo experimental foi avaliada pela cultura microbiológica do fígado e do linfonodo mesentérico. A distribuição das bactérias mostrada nas tabelas 5 e 6 confirma a literatura (Koh et al., 1996 a, b e c).

4.3.3. Estudo da variação da expressão hepática e intestinal de β_2 GPI em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana:

A imuno-histoquímica para a β_2 GPI mostrou diferenças na expressão hepática da proteína, dependentes do estado clínico dos animais (figura 22). O grupo CR0 apresentou uma reatividade do Ac anti- β_2 GPI heterogeneamente distribuída, com marcação principalmente nos sinusóides (figura 22, CR0); enquanto nos grupos controles, uma marcação mais difusa da β_2 GPI foi observada no citoplasma dos hepatócitos (figura 22, CS e CTB). Nos animais com sepse a reatividade foi mais pronunciada nas regiões periportais e dos limites lobulares (figura 22, S). A reação intracelular focal e grosseiramente granular, observada nos fígados dos animais com sepse, pode ser morfológicamente comparada com a proteína denaturada ou regiões de secreção. Na contra coloração com a Hematoxilina de Harris essas regiões de marcação focal mostraram-se refringentes, a estrutura de proteína amilóide foi sugerida pela

coloração específica com vermelho congo (dados não mostrados). No grupo TB a reatividade do Ac anti- β_2 GPI apresentou um padrão difuso e mais fraco, com distribuição principalmente centrolobular (figura 22, TB).

No intestino (íleo), a β_2 GPI foi evidenciada no estroma das regiões apicais dos vilos, e nos revestimentos endoteliais dos vasos (figura 23). Este perfil foi observado nos grupos controles do modelo experimental, com variações na intensidade da marcação não conclusivas (figura 23, CR0, CS, CTB). Os animais infectados do grupo TB apresentaram marcações um pouco mais fracas nestas mesmas regiões (figure 23, TB). Contudo, os intestinos dos animais com sepse mostraram reatividade negativa para a β_2 GPI (figure 23, S).

Figure 22: Imuno-histoquímica para β_2 GPI em fígado de ratos Wistar, após 3h de infecção por *E.coli* R-6, em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana. CR0: controle sem manipulação; CS: controle da manipulação para sepse; S 10⁹: sepse (inoculação de bactérias *E. coli* R-6 - 10⁹ UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior. CTB: controle de manipulação para TB; TB: translocação bacteriana (infecção intraluminal com 10¹⁰UFC/mL/kg). Reação imuno-histoquímica com AcMo anti- β_2 GPI K₂₂ (1/1000), revelação com o sistema EnVision AP System (Dako) e contra-coloração tecidual com Hematoxilina de Harris. Imagens dos tecidos hepáticos obtidas com microscópio óptico no aumento de 100x.

Figura 23: Imuno-histoquímica para β_2 GPI em intestino (íleo) de ratos Wistar, após 3h de infecção por *E.coli* R-6, em modelo experimental de sepse e translocação bacteriana. CR0: controle sem manipulação; CS: controle da manipulação para sepse; S 10^9 : sepse (inoculação de bactérias *E. coli* R-6 - 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior. CTB: controle de manipulação para TB; TB: translocação bacteriana (infecção intraluminal com 10^{10} UFC/mL/kg). Reação imunohistoquímica com AcMo anti- β_2 GPI K22 (1/1000), revelação com o sistema EnVision AP System (Dako) e contra-coloração tecidual com Hematoxilina de Harris. Imagens dos tecidos hepáticos obtidas com microscópio óptico no aumento de 100x.

5. DISCUSSÃO

O sistema imune é responsável pela proteção contra a invasão e proliferação de microorganismos patogênicos ao hospedeiro. A invasão de microorganismos da microbiota normal é prevenida pela imunidade inata constitutiva da mucosa e do tecido epitelial. Sob infecção com patógenos altamente virulentos, que geralmente não fazem parte da microbiota normal, a imunidade inata auxiliar, representada por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, é de fundamental importância na defesa do hospedeiro. Os monócitos circulantes estão altamente envolvidos nesse mecanismo de defesa imunológica primária contra uma grande variedade de patógenos (Serbina et al., 2008). Essas células compõem o sistema mononuclear fagocitário, e no acme da sua diferenciação funcional respondem a estímulos quimiotáticos na circulação, migram para focos inflamatórios e sítios de infecção, fagocitam e matam os microorganismos através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e através da ação de enzimas fagolisossomais.

A β_2 GPI modula a resposta oxidativa de células de Kupffer e fagócitos peritoneais a diversos estímulos (Gomes et al., 2002; Knox de Sousa et al., 2001).

O estudo dos efeitos da β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo das células iniciou-se com monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Dentro dos critérios de exclusão para participação dos indivíduos do nosso grupo amostral, encontra-se o perfil lipídico alterado, ao considerarmos a interação entre β_2 GPI e lipoproteínas circulantes. Então, antes do isolamento das células, analisamos as concentrações plasmáticas de β_2 GPI e o perfil lipídico dos indivíduos. As concentrações de β_2 GPI nos plasmas dos indivíduos do nosso grupo amostral (179 ± 47 $\mu\text{g/mL}$, tabela 1) corresponderam aos valores referidos na literatura para indivíduos aparentemente saudáveis (Anexo 4). Os estudos em humanos têm de ser considerados com a perspectiva de que não estão descritos valores de referência para as concentrações plasmáticas da β_2 GPI. Correlações fracas foram encontradas entre β_2 GPI e colesterol total e LDL e nenhuma correlação foi observada entre os níveis séricos de β_2 GPI e VLDL, triglicerídeos ou

HDL (figura 11), confirmando estudos anteriores do grupo (Gomes et al., 2004b). Desconsideramos correlações com valores de $R^2 < 0,2$, cujo poder é sempre muito baixo, mesmo quando $p < 0,05$. As correlações encontradas sugerem efeitos da β_2 GPI de ocorrência abrangente. O grupo de risco estudado anteriormente era constituído por indivíduos idosos hipercolesterolêmicos, sem eventos cardiovasculares agudos (Gomes et al., 2004b). É possível que a condição pró-inflamatória associada à aterosclerose seja relevante para o aumento da β_2 GPI, uma vez que concentrações plasmáticas elevadas da proteína também foram descritas em portadores de doenças inflamatórias crônicas (Biasiolo et al., 1999). Além disso, em pacientes hipercolesterolêmicos infartados, as concentrações de β_2 GPI não se mostraram mais altas do que as observadas em indivíduos normocolesterolêmicos (Lin et al., 2004). Embora este estudo sugira que a β_2 GPI desempenhe uma função antioxidante direta, não exclui outros mecanismos para uma função reguladora da inflamação.

O metabolismo oxidativo dos monócitos isolados do sangue periférico foi inicialmente pesquisado através da QL-luminol. Nossos resultados mostraram um aumento da quimiluminescência nessas células durante a fagocitose do zimosan opsonizado, porém, sem alteração no perfil de resposta oxidativa quando na presença de β_2 GPI. A proteína também não modificou a quimiluminescência das células em repouso (figura 12). A resposta de quimiluminescência revela a resultante de uma série de fenômenos e foi, portanto, analisada neste contexto e comparada com a análise do mesmo fenômeno por citometria de fluxo.

A resposta oxidativa dos fagócitos diante de um estímulo, se dá com a ativação de um complexo sistema de transferência de elétrons chamado NADPH oxidase (NADPHox), formado nas membranas plasmáticas e nas membranas dos fagossomos. Esse complexo enzimático é capaz de catalisar a redução do oxigênio molecular à custa de NADPH. Os elétrons são transferidos pelo Citocromo b558 da NADPH através da membrana e liberados para o oxigênio presente no meio extracelular ou no compartimento intracelular (Hampton et al., 1998). A transferência de elétrons da NADPH citosólica para o oxigênio produz o radical ânion superóxido (O_2^-). Outras espécies reativas de oxigênio como

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) e radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) são formados por reações subseqüentes, parcialmente catalizadas por íons metálicos. A produção do ácido hipocloroso (HClO) a partir de O_2^- / H_2O_2 e Cl^- é catalisada pela MPO também ocorre, principalmente nos granulócitos. Espécies reativas de nitrogênio (ERN) também são produzidas durante a fagocitose a partir da síntese do óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$). $\text{NO}^{\bullet}$ e O_2^- reagem para formar peroxinitrito (ONOO^-), que por sua vez pode se decompor para gerar outras espécies reativas como radical hidroxila e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\bullet}$) que são oxidantes potentes, capazes de oxidar desoxirribose, dimetilsulfóxido ou sulfidrilas e induzir a peroxidação de lipídeos de membrana (Wang et al, 1993).

O luminol é um indicador bioquímico que reage com diferentes espécies reativas, tanto no compartimento intracelular como extracelular, mas apresenta maior sensibilidade para os produtos da MPO (Caldefie-Chézet et al., 2002). Ao contrário dos polimorfonucleares, os monócitos não possuem MPO em grande quantidade. Nos ensaios com monócitos, é provável que o principal oxidante do luminol seja o O_2^- .

O DCFH-DA é um composto apolar, não fluorescente e estável, que se difunde através da membrana celular, tem sido utilizado para estudar o metabolismo oxidativo das células. Nos compartimentos intracelulares, seus grupos acetil são clivados por esterases produzindo diclorofluoresceína (DCFH) não fluorescente, que é rapidamente oxidada a um composto altamente fluorescente na presença de oxidantes, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Vowells et al., 1995). Em neutrófilos humanos e sistemas livres de células, a DCFH mostra-se sensível à oxidação por ONOO^- , H_2O_2 em combinação com peroxidases celulares e $^{\bullet}\text{OH}$. Em sistemas biológicos, a DCFH apresenta baixa sensibilidade para a medida de $\text{NO}^{\bullet}$, HClO e O_2^- (Dicshist & Sharma, 2002; Myhre et al, 2003). Logo, utilizamos nesse trabalho sondas que apresentam reatividades distintas com as diversas espécies reativas produzidas nas células. Uma dissociação dos efeitos obtidos com as diferentes sondas poderia sugerir o envolvimento de um subgrupo de espécies oxidantes. Entretanto, os resultados obtidos com os ensaios de QL-luminol foram equivalentes aos obtidos nos ensaios

de citometria de fluxo, utilizando DCFH-DA como probe. A vantagem da citometria de fluxo é a de permitir a análise das células em sangue total, preservando o microambiente celular. Analisamos o metabolismo oxidativo na população de monócitos definida segundo os parâmetros de tamanho e complexidade das populações celulares, e a marcação positiva para CD14-PerCP (figura 13). A β_2 GPI não modificou a oxidação da DCFH nas células em repouso, nem naquelas estimuladas com zimosan opsonizado ou *S. aureus* (figura 14). Estes resultados sugerem ausência de efeito sobre o metabolismo de ERN, que também são importantes na resposta inflamatória. Nas condições de ensaio empregadas neste estudo, além dos monócitos não aumentarem a produção de NO^* durante a fagocitose de zimosan opsonizado, nenhum efeito da β_2 GPI foi observado nem sobre as células em repouso nem sobre as células estimuladas (figura 15). Publicações relacionadas à produção de NO^* por fagócitos humanos isolados de sangue periférico descrevem resultados variados, que incluem desde nenhuma produção sob qualquer condição, produção basal com nenhum aumento após ativação celular, ou produção limitada, mas somente depois de estímulo celular (Yan et al., 1994; Hampton et al., 1998). De qualquer forma, nossos resultados indicam que a β_2 GPI não influencia a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por monócitos humanos em repouso ou estimulados. Como não encontramos evidências de que o efeito antiinflamatório da β_2 GPI pudesse ser explicado por uma eventual inibição do burst respiratório, passamos a investigar efeitos relacionados a outros alvos da β_2 GPI. Por exemplo, a identidade estrutural com o inibidor de IL-3, NIL-3, é compatível com um efeito sobre o início da diferenciação celular de células mononucleares do sistema imune.

Células pluripotentes da medula óssea dão origem a células progenitoras que seguem uma variedade de vias de diferenciação para se tornarem células maduras com funções efectoras definidas. Os monócitos constituem uma população pleomórfica e pleotrópica de células mononucleares circulantes. Eles representam cerca de 5-10% dos leucócitos do sangue periférico de humanos e camundongos. São originados de um precursor mielóide da medula óssea, liberados na circulação e então, capazes de migrar para os tecidos e diferenciar

em macrófagos ou células dendríticas (Fogg et al, 2006). A meia-vida dos monócitos no sangue é relativamente curta, de aproximadamente um dia em camundongos e 3 dias em humanos. Postula-se que o curto período de tempo dessas células no sangue é devido ao fato de estarem continuamente renovando as populações de macrófagos e células dendríticas, afim de manter a homeostase e, durante a inflamação, exercer seu papel na imunidade inata e adaptativa. Contudo, grandes evidências sugerem que em diferentes tipos de órgãos, os macrófagos são auto-renovados, sem haver a necessidade de precursores sanguíneos. No entanto, no contexto de inflamação, o fato de que os monócitos dão origem aos macrófagos em praticamente qualquer órgão é indiscutível. Sob infecção, a via de diferenciação homeostática normal das células de defesa é temporariamente refocada; medula óssea e monócitos sanguíneos diferenciam em um espectro de células efetoras com distintas atividades antimicrobianas. Precursores e células-tronco hematopoiéticas podem recircular entre a medula óssea e os tecidos em adultos e contribuir diretamente para a diferenciação de certas células da linhagem mielóide nos sítios inflamados (Tacke & Randolph, 2006). Buttari e colaboradores (2005) mostraram que a modificação oxidativa da β_2 GPI confere-lhe um efeito de indução da maturação de células dendríticas, paralela à produção de citocinas promotoras de resposta Th1, provavelmente através da interação com um receptor da família TLR.

O efeito inibidor de IL-3 remete à função ultra-precoce da β_2 GPI na inflamação. Sendo assim, é possível que uma parte relevante do efeito seja sobre o endotélio e que efeitos mais tardios verifiquem-se sobre as células precursoras de fagócitos, que são o principal alvo da IL-3. Como nenhum efeito da proteína foi observado sobre monócitos circulantes, partimos em busca dos seus efeitos sobre células precursoras, utilizando uma linhagem de células promonocíticas humanas, THP-1. Essa linhagem de células originou-se de uma população de células tumorais cultivadas a partir do sangue de um paciente com leucemia monocítica aguda (Auwerx, 1991). As células THP-1 possuem receptores de Fc (fração complemento) e C3b (proteína complemento – 3b), sem expressão citoplasmática ou de superfície de Ig (imunoglobulina) (Tsuchiya et al., 1980). Portanto, essas

células têm capacidade fagocítica e são caracterizadas pela presença de lisossomos e pela habilidade de produzir esterases (Kohro et al., 2004). Sob cultivo, as THP-1 mantêm suas características monocíticas por períodos maiores que 14 meses (Tsuchiya et al., 1980). Quando estimuladas com ésteres de forbol (por exemplo, PMA), as células THP-1 mimetizam os macrófagos derivados de monócitos por tornarem-se aderentes ao vidro e ao plástico, exibindo uma morfologia semelhante a do macrófago, e expressando marcadores de diferenciação para macrófagos, como receptores *scavenger* A (SR-A), apolipoproteína E (apoE), e lipoproteína lipase (Steinberg, 1987; Hara et al., 1987; Tajima et al., 1985; Kohro et al., 2004).

A literatura indica que existe uma heterogeneidade na linhagem de células THP-1. Um subtipo de THP-1 não expressa receptores *scavenger* quando tratadas com PMA, o que demonstra que essa linhagem de células não é uniforme (Nishimura et al., 1998). Nossos resultados mostram a existência de subpopulações de células THP-1, segundo a expressão de antígenos de diferenciação celular nessa linhagem. A análise das células THP-1 segundo seu tamanho e complexidade estrutural (associada aos parâmetros *side* e *forward-scatter*) sugere a presença de 3 populações celulares distintas (figura 19). Essas populações apresentaram expressão seqüencial crescente de CD14 e CD54 caracterizando distintos estágios de maturação celular (figura 20). Contrastando com os resultados obtidos por Rurault et al. (2001) de que células THP-1 indiferenciadas não expressam níveis detectáveis de CD54 e expressam baixos níveis de CD14, observou-se a expressão de CD14 principalmente na associada à expressão de CD54 (figura 20). Essa associação ocorreu em células cultivadas em meio suplementado ou não com soro fetal bovino.

Estudamos os efeitos da β_2 GPI sobre a proliferação e diferenciação das células THP-1 e nossos resultados mostram que a β_2 GPI foi capaz de aumentar a proliferação e a sobrevivência dessas células em cultura livre de soro (figura 16). Adicionalmente, a β_2 GPI bloqueou o efeito inibitório do PMA sobre a proliferação das THP-1 (figura 17). Não se pode excluir uma ação antioxidante direta da β_2 GPI além do efeito sobre a sinalização celular. Antes da diferenciação celular, o PMA

induz um bloqueio do crescimento das células THP-1, por um complexo mecanismo de modulação da expressão de reguladores do ciclo celular, iniciado pela produção intracelular de ERO (Traore et al. 2005).

O perfil de expressão gênica das células THP-1 é diferente daquele dos monócitos primários, contendo como produtos de genes mais abundantes, a catepsina G, a elastase-2 e proteinase-3, que são tipicamente expressas por neutrófilos primários (Kohro et al., 2004). A expressão desses genes diminui com a diferenciação dessas células estimuladas com PMA (Steinberg, 1987; Hara et al., 1987; Tajima et al., 1985; Kohro et al., 2004). Foi demonstrado que a β_2 GPI pode ser clivada pela elastase *in vitro* (Guerin et al., 2002). A clivagem da proteína modifica sua interação com seus ligantes, bem como suas funções (Yasuda et al., 2004; Miyakis et al., 2004b; Nakagawa et al., 2009). É possível que a elastase seja um regulador da interação dessas células com a β_2 GPI íntegra e oxidada.

O amadurecimento fenotípico das células THP-1 pode ser induzido por várias moléculas imunomodulatórias e tem sido monitorado pela expressão de antígenos de superfície, como CD14 e CD54 (ICAM-1, Molécula de Adesão Intercelular -1). A expressão dos diferentes antígenos de superfície, associadas à maturação, depende de diversas moléculas indutoras de diferenciação (Tsuchiya et al., 1980; Howard et al., 1991). O tratamento das células THP-1 com TPA (acetato de forbol-tetradecanoil) resulta em um fenótipo mais diferenciado em termos de aderência, mas não de proliferação ou expressão de marcadores de superfície (Hoff et al., 1992; Shwende et al., 1996). Fleit e colaboradores (1991) demonstraram que PMA induz a maturação das células THP-1 e aderência ao substrato, mas não estimula a expressão de CD14 como ocorre quando essas células são tratadas com 1,25-dihidroxi-vitamina D3. Kohro e colaboradores (2004) observaram que o fenótipo induzido pelo PMA está associado com o aumento de CD14 e IL-1 β nas THP-1. A perda da diferenciação celular em culturas prolongadas revelou a instabilidade desse fenótipo (Tsuchiya et al., 1980).

Na presença da β_2 GPI, as THP-1 foram estimuladas à adesão e maturação fenotípica, caracterizada pelo aumento da expressão dos antígenos de superfície CD54 e CD14 (figura 18 e tabela 2). O aumento da expressão de CD54 na

superfície das células THP-1 tratadas com β_2 GPI confirma os resultados do efeito da proteína de aumentar a capacidade de adesão dessas células. O CD54 ou ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular-1) faz parte da superfamília das imunoglobulinas, e ao contrário de outras moléculas de adesão, é expressa em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (fibroblastos, leucócitos, queratinócitos, células endoteliais e células epiteliais). Essa proteína medeia interações adesivas célula-célula ou célula-matriz, através da ligação com as integrinas CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) ou fibrinogênio. Essas interações são importantes nos processos de transmigração celular (diapedese) e ativação de células T. CD54 tem sido proposta como co-ativadora de sinalização intracelular. Sua expressão na superfície das células é estimulada em resposta a vários mediadores inflamatórios, que incluem ácido retinóico, infecção viral, estresse oxidativo (H_2O_2) e citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . O efeito estimulador desses mediadores pode ser moderado por citocinas antiinflamatórias como TGF β , IL-4, IL-10 e por hormônios esteróides glicocorticóides. Os níveis de expressão de CD54 na superfície das células dependem do tipo celular e da concentração dos mediadores anti e proinflamatórios (Roebuck & Finnegan, 1999).

A β_2 GPI já foi mostrada anteriormente como um fator de sobrevivência para células hepáticas e identificada como um fator de crescimento em HUVEC (Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana) (Cai et al., 1995, 1997; Aversa et al., 2004). O efeito da β_2 GPI sobre a sobrevivência das células THP-1, na ausência de soro, pode estar associado ao aumento da expressão de CD14 estimulado pela proteína. Monócitos humanos em cultura *in vitro* sofrem apoptose constitutiva. A falta de soro ou baixa suplementação de soro promovem envelhecimento celular e induzem morte celular programada. A adição de soro ou fatores de crescimento como M-CSF (Fator Estimulador de Colônia – Macrófagos), GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia – Granulócitos/Macrófagos), ou citocinas proinflamatórias como IL-1 (Interleucina-1) ou TNF α (Fator de Necrose Tumoral α) previnem a apoptose espontânea dos monócitos (Mangan et al., 1991). O CD14 é um antígeno de superfície marcador de células de linhagem mielóide, característico de

fagócitos mononucleares maduros (Heindenreich, 1999). Moléculas estimuladoras da expressão de CD14 previnem a apoptose de monócitos, enquanto moléculas inibidoras da expressão desse antígeno favorecem a morte celular. O CD14 pode atuar como um co-receptor mediando respostas celulares tais como a fosforilação de tirosinas, ativação de NF κ B, e mobilização de cálcio. Em monócitos, a regulação da morte celular programada dependente de CD14 ocorre via mobilização de cálcio, que resulta na ativação das enzimas inibidoras da apoptose (Heindenreich, 1999).

A expressão de TLR-4 e de seu co-receptor, CD14, foi recentemente mostrada por He e colaboradores (2010) em células progenitoras endoteliais. Nessas células, a expressão de TLR-4 está associada com a manutenção do fenótipo de células-tronco e com a proliferação celular. TLR-4 tem sido proposto como ligante para β_2 GPI (Raschi et al.2003). Logo, não podemos excluir a possibilidade de que nossos resultados com as células THP-1, de proliferação e aumento da expressão de CD14, sejam resultado de interação agonista entre β_2 GPI e TLR-4.

Embora seja considerada uma proteína de fase aguda, a β_2 GPI não está incluída entre os biomarcadores utilizados na prática clínica para o diagnóstico de infecções bacterianas, prognóstico e/ou estratificação da doença, provavelmente por ser uma proteína de fase aguda negativa (Lannergard et al., 2009; Silvestre et al., 2009). No nosso trabalho, não foram observadas correlações entre as concentrações plasmáticas da β_2 GPI e outros indicadores da resposta inflamatória aguda na sepse. Reitera-se que a aplicação diagnóstica da β_2 GPI para estudo da evolução da síndrome clínica parece inadequada. Entretanto, aspectos relacionados aos fenômenos vasculares e da hemostasia permanecem em aberto e merecem investigação adicional. A concentração da β_2 GPI observada entre os indivíduos saudáveis e aqueles com quadro clínico de sepse, sepse grave e choque séptico não foi diferente. Ocorreu uma grande variação da β_2 GPI plasmática intragrupo, que não permitiu identificar eventuais diferenças relacionadas à gravidade do quadro (tabela 3). Esta variação interindividual pode ser exercida por controle genético, mas suas bases moleculares ainda não são

conhecidas (Mehdi et al., 1999; Sanguera et al., 1997b). A análise dos casos por foco infeccioso sugeriu que o grupo de pacientes com foco infeccioso abdominal apresente concentrações plasmáticas menores, em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (tabela 4).

Com um comportamento diferente do observado para a β_2 GPI, PCR, SAA e IL-8 apresentaram-se aumentadas no plasma dos pacientes com sepse, embora suas concentrações não tenham correlacionado com os estádios clínicos da doença (tabela 3). Os resultados obtidos nesse trabalho foram equivalentes aos mostrados por outros estudos sobre os biomarcadores da sepse, que apontam controvérsias com relação à sensibilidade dessas proteínas para avaliação do prognóstico e/ou estadiamento da sepse. (Lannergard et al., 2009; Silvestre et al., 2009). A PCR é comumente usada como biomarcador de estado inflamatório agudo. Produzida pelo fígado em resposta à infecção ou lesão tecidual, sua concentração plasmática mostra-se clinicamente paralela ao curso da infecção e a diminuição indica resolução do quadro infeccioso (Luzzani et al., 2003). A SAA também é considerada uma das principais proteínas de fase aguda em humanos, com velocidade de aumento maior e mais precoce em relação às outras (Gabay et al., 1999; Arnon et al., 2002). SAA e PCR de alta sensibilidade (hsPCR) têm sido muito utilizadas na identificação e monitoramento de infecções bacterianas em recém-nascidos (Pizzini et al., 2000). IL-8 é uma citocina proinflamatória que promove ativação e quimiotaxia de neutrófilos. É produzida por uma ampla variedade de tipos celulares em resposta a um estímulo inflamatório como LPS, IL-1 β ou TNF α (Oppenheim et al., 1991). Estudos recentes têm identificado o estresse oxidativo como um mecanismo de indução de IL-8 (Filep et al., 1998). A presença dessa citocina tem sido detectada em vários estados de doença como choque por endotoxemia e artrite inflamatória (Van Zee et al., 1991; Martich et al., 1991; Brennan et al., 1990). Uma das possibilidades para a falta de correlação entre a concentração de proteínas de fase aguda e o prognóstico da sepse, além da variação fisiológica interindividual, é a presença de comorbidades (Oberhoffer et al., 1999; Marshall et al., 2000; Gogos et al., 2001; Pettila et al., 2002; Simon et al., 2004; Sierra et al., 2004). Independente da justificativa, este fenômeno limita a

aplicabilidade clínica do exame dessas proteínas, no acompanhamento e avaliação de prognóstico de pacientes sépticos.

A alteração na expressão hepática de β_2 GPI em modelos experimentais de sepse e translocação bacteriana foi mostrada anteriormente, em um trabalho do nosso grupo, por imuno-histoquímica com anticorpos policlonais (Cruz, 2005). Com a melhor qualidade dos insumos e o aperfeiçoamento dos métodos analíticos, pudemos refinar este resultado e verificar como variavam as concentrações plasmáticas e linfáticas da β_2 GPI. Uma informação importante sobre o comportamento das concentrações da β_2 GPI que pode ser obtida deste modelo, mas não do estudo das amostras clínicas, é a evolução temporal precoce dos efeitos, desde o evento deflagrador da sepse. O modelo utilizado tem comportamento bastante reprodutível quanto à evolução clínica, o que permite estudar parâmetros associados à gravidade do quadro. Os animais foram submetidos a condições com evoluções bastante distintas. Uma sepse não letal (S10⁷), que leva a uma bacteremia transiente com resolução espontânea da infecção, e uma sepse semi-letal (S10⁹), que tipicamente promove 50% de morte. Embora a TB seja considerada como um dos principais fatores de gênese da sepse primária, com um evento único de TB nas condições do ensaio, o microrganismo utilizado não é capaz de promover infecção sistêmica grave e provocar mortes nesse grupo de animais (Menchaca-Diaz, 2002; Koh et al., 2006).

O modelo experimental sugere que a variação da concentração de β_2 GPI circulante na sepse é bastante precoce. Nas primeiras três horas da indução da sepse endovenosa, a concentração plasmática de β_2 GPI diminuiu de forma dependente da intensidade de infecção (tabela 5). Entretanto, as concentrações de β_2 GPI foram ainda menores nos animais submetidos à translocação bacteriana, revelando que a via de infecção é importante e que a variação plasmática da proteína não depende somente da gravidade do quadro clínico (tabela 6). Esses dados corroboram o efeito inicialmente sugerido, de diminuição da concentração plasmática da β_2 GPI em pacientes com foco infeccioso abdominal. No caso dos humanos com sepse, a obtenção das amostras em até 72 horas do diagnóstico clínico de sepse ou até 48 h após manifestação da primeira disfunção orgânica

nos pacientes com sepse grave ou choque séptico, não necessariamente refletiu o período em que existem correlações entre a β_2 GPI circulante e o estadió da doença. Talvez, a proteína possa ser utilizada como um biomarcador para discriminar entre foco abdominal de infecção e focos em outras localizações.

Em 1999, foi proposto que a remoção da β_2 GPI circulante em pacientes com sepse ocorre através da ligação da proteína a corpos apoptóticos que são abundantes nesses pacientes (Horbach et al., 1999). A β_2 GPI interage com fosfolípidos aniônicos na superfície de corpos apoptóticos e sinaliza apoptose para macrófagos (Chonn et al., 1995; Balasubramanian et al., 2005). Foi demonstrado em um modelo animal que a capacidade de interação de lipossomos com proteínas sanguíneas está altamente relacionada com a velocidade de depuração de lipossomos da circulação e que existe uma predominância da β_2 GPI nas membranas que são rapidamente removidas da circulação (Chonn et al., 1995).

Em ratos submetidos à translocação bacteriana, nossos resultados mostraram que a via de infecção correlacionou com a concentração plasmática, mas não linfática de β_2 GPI. Porém, a derivação da linfa preveniu a diminuição da concentração plasmática de β_2 GPI nesses animais (tabela 6).

Estudos recentes têm mostrado que no processo de TB a resposta imune local é promovida pela via linfática, através da ativação de GALT (Magnotti et al., 1998; Sánchez-Garcia et al., 1997; Koh et al., 2006). Na TB, a linfa mesentérica eferente apresenta concentrações elevadas de TNF- α e aumento da celularidade (Silva et al., 1996). Lesões na microcirculação mesentérica são evidentes, com alterações dos processos de “rolamento” e adesão leucocitária, redução na velocidade de fluxo sanguíneo dos capilares e vênulas, e nas regiões de baixo fluxo, trombose de vênulas e capilares associada a múltiplos focos hemorrágicos. A cateterização dos ductos linfáticos eferentes em ratos previne as lesões da microcirculação mesentérica produzidas durante esse processo (Ruiz-Silva et al., 2002; Menchaca-Díaz, 2008). Menchaca-Díaz (2008) mostrou que independente da presença de bactérias nos compartimentos sistêmicos, a invasão microbiana pela via intestinal é um fator determinante de hipoperfusão sistêmica, uma vez que

a perfusão tecidual de animais submetidos à sepse é preservada. A indução de hipoperfusão na TB pode ser inibida pela interrupção do fluxo da linfa intestinal para a circulação sistêmica, denotando que a ativação do GALT está associada a essa alteração hemodinâmica sistêmica (Menchaca-Díaz et al., 2007). Nossos dados não permitem identificar um papel para a β_2 GPI na fisiopatologia das lesões da microcirculação mesentérica. Entretanto, as alterações microcirculatórias promovidas durante a TB e prevenidas pela dissociação da linfa, somadas à observação dos efeitos da linfa sobre a regulação da concentração plasmática da β_2 GPI sugerem um papel hemodinâmico da β_2 GPI na fisiopatologia da TB. A β_2 GPI é capaz de ligar-se ao endotélio através da Anexina A2 e intermediar a ativação das células endoteliais através da interação com Ac anti-fosfolipídios/Ac anti- β_2 GPI (Ma et al., 2000; Zhang & MacCrae, 2005). Essa ativação resulta em aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas inflamatórias e aumento da atividade pró-coagulante (Branch & Rodgers, 1993; Del Papa et al., 1995; Del Papa et al., 1997; George et al., 1998; Pierangeli et al., 1999; Gharavi et al., 1999). Também foram descritos efeitos da β_2 GPI nos processos de coagulação e fibrinólise (Nimpf et al., 1986; Ieko et al., 1999; Miyakis et al., 2004; Bu et al., 2009). Não é possível excluir o consumo associado ao seqüestro endotelial da proteína circulante, ou ainda aos processos de coagulação e fibrinólise, entre as causas prováveis para a diminuição da β_2 GPI acentuada na TB.

Através da imuno-histoquímica, pudemos verificar no modelo experimental que a infecção induz a uma mudança no perfil de expressão da β_2 GPI no fígado e no intestino (figuras 22 e 23). Uma marcação para a β_2 GPI sugestiva de aumento da expressão ou diminuição da secreção da proteína foi observada no tecido hepático dos animais com sepse, em regiões distintas daquelas observadas nos controles. A marcação difusa da β_2 GPI observada no citoplasma dos hepatócitos foi substituída por uma reatividade mais pronunciada nas regiões periportais e dos limites lobulares, com reação intracelular focal e grosseiramente granular (figura 22). Esses efeitos são compatíveis com uma regulação da concentração de β_2 GPI pela circulação porta. A relação bile/plasma de concentração da β_2 GPI foi

anteriormente mostrada e reflete uma condição de transporte ativo da proteína (Mullock et al., 1985). A endocitose de β_2 GPI mediada por megalina, uma proteína da família de receptores de LDL, foi demonstrada por Moestrup e colaboradores (1998) em células epiteliais de saco vitelino, e em células tubulares renais. Existe a teoria de que a maioria das proteínas produzidas no fígado é liberada diretamente na bile e retorna através de mecanismos endocíticos (Mullock et al., 1985).

Foi sugerido por Ragusa e colaboradores (2006) que a localização específica do mRNA da β_2 GPI, nos ductos biliares do sistema porta e no epitélio de revestimento dos túbulos proximais nos rins, é consistente com um papel pré-eminente da β_2 GPI nos processos em que colangiócitos e células tubulares reabsorvem partículas lipídicas. Componentes orgânicos e inorgânicos da bile podem ser significativamente modificados por um conjunto de mecanismos de absorção na membrana apical dos colangiócitos. Do mesmo modo, o filtrado glomerular é continuamente reabsorvido pelas células tubulares proximais, onde se faz presente a megalina (Verroust et al., 2002; Moestrup et al., 1998).

Em fígados de ratos, uma acentuada expressão de mRNA de β_2 GPI foi demonstrada, através de hibridização *in situ*, no epitélio de revestimento dos ductos biliares do sistema porta, bem como nos hepatócitos (especialmente nos núcleos) e nas células de Kupffer, além de uma baixa expressão no parênquima hepático. A expressão de mRNA de β_2 GPI não foi observada no endotélio da veia porta, nem da artéria hepática (Ragusa et al., 2006). Tem sido proposto que os sítios de síntese de β_2 GPI são diferentes dos sítios de armazenamento da proteína. Para o metabolismo e/ou transporte lipídico, células como endoteliócitos e enterócitos podem absorver e acumular a β_2 GPI vinda do sangue ou das células vizinhas. O gene da β_2 GPI é expresso nas células em que a proteína tem papel direto; por exemplo, em colangiócitos, células tubulares e macrófagos, que fazem endocitose de lipossomos mediada por receptor; ou em cardiomiócitos ou hepatócitos, onde os lipídios são necessários aos processos metabólicos ou proliferativos, respectivamente (Ragusa et al., 2006). É provável que, nos ratos

submetidos a sepse, a marcação imuno-histoquímica nas regiões hepáticas periportais seja um reflexo do congestionamento dos vasos e ductos nessas regiões, conseqüente da diminuição do fluxo hepático que ocorre nesses animais (figura 22, S). Nos animais submetidos à TB a marcação apresentou um padrão difuso e mais fraco, com distribuição principalmente centrolobular (figura 22, TB). Este achado é compatível com a manutenção do padrão de produção e exportação da β_2 GPI para a bile, nos animais submetidos à TB. Confirmando a hipótese de que, nestes animais, a diminuição da concentração plasmática não pode ser explicada por modificação na produção da proteína, mas sim pelo seu consumo (figura 22).

Nos intestinos (íleo) dos ratos, a β_2 GPI foi evidenciada no estroma das regiões apicais dos vilos, e nos revestimentos endoteliais dos vasos. Esse perfil foi observado nos animais submetidos à TB, porém com uma reatividade mais fraca; enquanto os animais submetidos à sepse não mostraram reatividade. Não observamos nenhuma marcação na mucosa intestinal (figura 25). A expressão de mRNA da β_2 GPI no jejuno de ratos foi descrita nas vilosidades, em células que constituem o estroma, e naquelas que envolvem as glândulas intestinais sob a mucosa muscular. Nenhuma marcação foi observada na mucosa intestinal, nem em endoteliócitos desses animais (Ragusa et al., 2006). Nesse trabalho, a marcação imuno-histoquímica observada no revestimento dos vasos pela β_2 GPI indica uma interação da proteína vinda do sangue com o endotélio, provavelmente através da Anexina 2.

Suspeitava-se que uma contribuição intestinal para os níveis plasmáticos de β_2 GPI seria associada à ingestão de alimentos. A secreção hepática levaria a um aumento da entrega de bile e posterior absorção do lúmen intestinal. No entanto, os níveis sanguíneos de β_2 GPI no sangue portal mostraram-se insensíveis ao estado prandial (Zahedi et al., 2004).

O sistema porta hepático é um circuito em que o fluxo hepático e a distribuição de sangue peritoneal são controlados por células de Kupffer, células endoteliais, células musculares e outras células sinusoidais hepáticas (McCuskey, 2000). Além disso, a expressão de receptores específicos determina fronteiras

funcionais, como é o caso de algumas células dendríticas (Kudo et al, 1997) e para a ativação, a indução de senescência e retirada de neutrófilos de circulação (Shi et al, 2001). Vasos linfáticos e sanguíneos comportaram-se de forma independente quanto à concentração de β_2 GPI no líquido circulante. No entanto, sinais bioquímicos gerados nos tecidos, que circulam dentro dos vasos linfáticos, provavelmente participam do controle das concentrações sanguíneas de β_2 GPI, como demonstrado pelos resultados na tabela 6. Os resultados obtidos no modelo experimental acrescentam evidências de que a β_2 GPI participa do controle inflamatório no sangue portal. Em conjunto, os resultados obtidos no estudo clínico com os pacientes de sepse e no modelo experimental permitem propor que o circuito porta-hepático seja um compartimento funcional para a β_2 GPI e suas ações sobre a resposta inflamatória de fase aguda.

6. CONCLUSÕES

- Em monócitos humanos a β_2 GPI não tem efeito sobre a produção de espécies reativas associada à fagocitose de zimosan opsonizado ou *S. aureus*;
- Em células precursoras de monócitos da linhagem THP-1, a β_2 GPI aumenta a expressão de CD54 (ICAM-1) e CD14 na superfície celular, estimula sua sobrevivência e maturação em cultura. A suplementação com β_2 GPI é suficiente para manter a proliferação das células THP-1 em meio sem a adição de soro fetal bovino.
- A correlação entre a concentração plasmática de β_2 GPI e a resposta inflamatória associada à sepse é dependente de via e tempo de infecção e, até o momento, não aplicável a pacientes humanos. A este respeito, podemos afirmar o que segue:
 - Durante a infecção sistêmica, a concentração plasmática de β_2 GPI diminui com a intensidade da infecção no modelo de sepse induzida por *Escherichia coli* R-6. A diminuição da concentração plasmática de β_2 GPI ocorre no início da resposta inflamatória, 3 h após inoculação do patógeno no modelo de sepse e translocação bacteriana induzidas por *Escherichia coli* R-6;
 - A translocação bacteriana pela mucosa intestinal, mesmo na ausência de infecção severa, induz diminuição nas concentrações plasmáticas de β_2 GPI equivalente à observada em sepse grave;
 - A concentração linfática de β_2 GPI não diminui durante a infecção sistêmica através da mucosa intestinal e a derivação da linfa mesentérica previne completamente a diminuição da concentração plasmática de β_2 GPI em ratos submetidos ao modelo da translocação bacteriana.

- Em humanos, a concentração plasmática de β_2 GPI não se correlaciona com a presença e nem com a gravidade da sepse no período de 48 a 72h após o diagnóstico clínico. Tampouco se correlaciona com a concentração plasmática de outras proteínas de fase aguda, estudadas em diferentes estadios da sepse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M., SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, v.383, p.787-793, 1996.
- ADACHI, Y., SUGIMOTO, K., SATO, A.K., MORI, K.J., Identification of negative regulator of interleukin-3 (NIL-3) in bone marrow. **Cell Structure and Function**, Okayama, v.27, p.81-89, 2002.
- ADEREM, A., ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v.406, p.782-787, 2000.
- ALEPOROU-MARINO, V., PAPPA, H., YALOURIS, P., PATARGIAS, T. Purification of apolipoprotein H (Beta2-glicoprotein I)-like protein from human follicular fluid. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v.128, p.537-542, 2001.
- ALLEN, R.C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. In: ADAM, W., CILENTO, G., eds. **Chemical and Biological Generation of Excited States**. New York: Academic Press, 1982. p. 309-344.
- ALVERDY, J.C., LAUGHLIN, R.S., WU, L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. **Critical Care Medicine**, New York, v.31, p.598-607, 2003.
- ANNANE, D., BELLISSANT, E., CAVAILLON, J.M. Septic shock. **Lancet**, London, v.365, p.63-78, 2005.
- AOYAMA, Y., YUEN-LING, C., WOOL, I.G. The primary structure of rat β_2 -glycoprotein I. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, 6401, 1989.

- ARNON, S., LITMANOVITZ, I., REGEV, R., LIS, M., SHAINKIN-KESTENBAUM, R., DOLFIN, T. Serum amyloid A protein in the early detection of late-onset bacterial sepsis in preterm infants. **Journal of Perinatal Medicine**, Berlin, v.30, n.4, p.329-332, 2002.
- ARVIEUX, J., DARNIGE, L., HACHULLA, E., ROUSSEL, B., BENZA, J.C., COLOMB, M.G. Species specificity of anti- β_2 -Glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.75, p.725-730, 1996.
- ASHIKAGA, T., YOSHIDA, Y., HIROTA, M., YONEYAMA, K., ITAGAKI, H., SAKAGUCHI, H., MIYAZAWA, M., ITO, Y., SUZUKI, H., TOYODA, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.20, p.767-773, 2006.
- ATSUMI, T., AMENGUAL, O., YASUDA, S., MATSUURA, E., KOIKE, T. Research around beta2-glycoprotein I: a major target for antiphospholipid antibodies. **Autoimmunity**, London, v.38, p.377-381, 2005.
- AUWERX, J., The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Experientia**, Basel v. 47, p. 22-31, 1991.
- AVERNA, M., PARAVIZZINI, G., MARINO, G., LANTERI, E., CAVERA, G., BARBAGALLO, C.M., PETRALIA, S., CAVALLARO, S., MAGRO, G., GRASSO, S., NOTABARTOLO, A., TRAVALI, S. Liver is not the unique site of synthesis of beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H): evidence for na intestinal localization. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, Berlin, v.27, p.207-212, 1997.

AVERNA, M., PARAVIZZINI, G., MARINO, G., EMMANUELE, G., CEFALU, A.B., MAGRO, G., BARTOLONI, G., RAGUSA, M., NOTO, D.E., BARBAGALLO, C. M., CALLARI, D., MAZZARINO, J.C., NOTARBARTOLO, A., TRAVALI, S. β_2 -glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v.36, p.1297-1305, 2004.

AVERY, V.M., ADRIAN, D.L., GORDON, D.L. Detection of mosaic protein mRNA in human astrocytes. **Immunology and Cell Biology**, London, v.71, p.215-219, 1993.

BABIOR, B.M., KIPNES, R.S., CURNUTTE, J.T. The production by leukocytes of superoxide: a potential bactericidal agent. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.52, p.741-744, 1973.

BALASUBRAMANIAN, K., CHANDRA, J., SCHROIT, A. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes: the role of β_2 -glycoprotein I in macrophage recognition. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.272, p.31113-31117, 1997.

BALASUBRAMANIAN, K., SCHROIT, A.J. Characterization of phosphatidylserine-dependent β_2 -glycoprotein I macrophage interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.29272-29277, 1998.

BALASUBRAMANIAN, K., Maiti, S.N., SCHROIT, A.J. Recruitment of beta-2-glycoprotein 1 to cell surface in extrinsic and intrinsic apoptosis. **Apoptosis**, London, v.10, p. 439-446, 2005.

BEECKEN, W-D.C., ENGL, T., RINGEL, E.M., CAMPHAUSEN, K., MICHAELIS, M., JONAS, D., FOLKMAN, J., SHING, Y., BLAHETA, R.A. An endogenous

inhibitor of angiogenesis derived from a transitional cell carcinoma: clipped β_2 -glycoprotein I. **Annals of Surgical Oncology**, New York, v. 13, p. 1241-1251, 2006.

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, p.30, 1976.

BENDIXEN, E., HALKIER, T., MAGNUSSON, S., SOTTRUP-JENSEN, L., KRISTENSEN, T. Complete primary structure of bovine beta 2-glycoprotein I: localization of the disulfide bridges. **Biochemistry**, Washington, v.31, p.3611-3617, 1992.

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. **Infection and Immunity**, Washington, v.23, p.403-411, 1979.

BIASIOLO, A., RAMPAZZO, P., BROCCO, T., BARBERO, F., ROSATO, A., PENGO, V. [Anti- β_2 -glycoprotein I - β_2 -glycoprotein I] immune complexes in patients with antiphospholipid syndrome and other autoimmune diseases. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.121-126, 1999.

BLANK, M., KRAUSE, I., FRIDKIN, M., KELLER, N., KOPOLOVID, J., GOLDBERG, I., TOBAR, A., SHOENFELD, Y. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.109, p.797-804, 2002.

- BONE, R.C. Sepsis, sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions (editorial). **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.115, p.457-469, 1991.
- BOCHUD, P.Y., CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **British Medical Journal**, London, v.326, p.262-266, 2003.
- BORENSZTAJN, J., KOTLAR, T.J., MEREDITH, S.C. Fractionation of chylomicrons by heparin-sepharose chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.260, p.13047-13052, 1985.
- BRANCH, D.W., RODGERS, G.M. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 168, p. 206-210, 1993.
- BRENNAN, F.M., ZACHARIAE, C.O.C., CHANTRY, D., LARSEN, C.G., TURNER, M., MAINI, K., MATSUSHIMA, K., FELDMAN, M. Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cel. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.20, p.2141-2144, 1990.
- BRIGHTON, T.A., CHESTERMAN, C.N. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. **Baillière's Clinical Haematology**, Philadelphia, v.7, p.541-547, 1994.
- BRIGHTON, T.A., HOGG, P.J., DAY, Y.-P., MURRAY, B., CHONG, B.H., CHESTERMAN, C.N. β_2 -Glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.93, p.185-194, 1996.

- BRIGHTON, T.A., DAI, Y.P., HOGG, P.J., CHESTERMAN, C.N. Microheterogeneity of beta-2 glycoprotein I: implications for binding to anionic phospholipids. **The Biochemical Journal**, London, v.340, p.59-67, 1999.
- BRUNIALTI, M.K.C., MARTINS, P.S., CARVALHO, H.B., MACHADO, R.F., BARBOSA, L.M., SALOMÃO, R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. **Shock**, Augusta, v.25, n.4, p.351-357, 2006.
- BU, C., GAO, L., XIE, W., ZHANG, J., HE, Y., CAI, G., McCRAE, K.R. β_2 -Glycoprotein I is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation, **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v.60, n.2, p.559-568, 2009.
- BUTARI, B., PROFUMO, E., MATTEI, V., SIRACUSANO, A., ORTONA, E., MARGUTTI, P., SALVATI, B., SORICE, M., RIGANO, R. Oxidized β_2 -Glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and promotes a T helper type 1 response. **Blood**, New York, v.106, n.12, p3880-3887, 2005.
- CABIE, A., FARKAS, J-C., FITTING, C., LAURIAN, C., CORMIER, J-M., CARLET J., CAVAILLON, J-M. High levels of portal TNF- α during abdominal aortic surgery in man. **Cytokine**, Philadelphia, v.5, p.448-453, 1993.
- CAI, G., SATOH, T., HOSHI, H. Purification and characterization of an endothelial cell-viability maintaining factor from fetal bovine serum. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1269, p13-18, 1995.

- CAI, G., GUO, Y., SHI, J. Purification of apolipoprotein H by polyethylene glycol precipitation. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v.8, p.341-346, 1996.
- CAI, G., SATOH, T., HOSHI, H. Isolation from fetal bovine serum of a fragment b of complement factor B-like protein improving a long-term survival of human endothelial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.345, p.150-155, 1997.
- CALDEFIE-CHÉZET, F., WALRAND, S., MOINARD, C., TRIDON, A., CHASSAGNE, J., VASSON, M-P. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.319, p.9-17, 2002.
- 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 anti-phospholipid syndrome-related tissue damage. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, v.115, p.214-219, 1999.
- CELLI, C.M. **Interação de anticorpos antifosfolipídios com seus epítomos e o papel da β_2 -glycoprotein I**. São Paulo, 1997. 135p. [Tese de Doutorado, Insituto de Química, Universidade de São Paulo].
- CHAMLEY, L.W., ALLEN, J.L., JOHNSON, P.M. Synthesis of beta2-glycoprotein 1 by the human placenta. **Placenta**, London, v.18, 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. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.

CLARK, J.A., COOPERSMITH, C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the motor of critical illness. **Shock**, Augusta, v.28, n.4, p.384-393, 2007.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v.420, p.885-891, 2002.

CONTI, F., SORICE, M., CIRCELLA, A., ALESSANDRI, C., PITTONI, V., CARONTI, B., CALDERARO, C., GRIGGI, T., MISASI, R., VALESINI, G. β_2 -glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with factor expression. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.132, p.509-516, 2003.

CRUZ, S.V. **Estabelecimento de um método Imuno-histoquímico para β_2 -glicoproteína I e sua aplicação a um modelo experimental de septicemia associada a translocação bacteriana pela mucosa intestinal.** São Paulo, 2005 [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]

DEL PAPA, N., GUIDALI, L., SPATOLA, L., BONARA, P., BORGHI, M.O., TINCANI A., BALESTRIERI G., MERONI, P.L. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2-glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. **Clinical & Experimental Rheumatology**, Italy, v. 13, n. 2, p179-185, 1995.

DEL PAPA, N., GUIDALI, L., SALA, A., BUCCELLATI, C., KHAMASHTA, M.A., ICHIKAWA, K., KOIKE T., BALESTRIERI, G., TINCANI A., HUGHES G.R., MERONI, P.L. Endothelial cells as targets for antiphospholipid antibodies: human polyclonal and monoclonal anti-beta2-glycoprotein I antibodies react in

vitro with endothelial cells through adherent beta 2-glycoprotein I and induce endothelial activation. **Arthritis & Rheumatism**, Hoboken, v. 40, n. 3, p. 551-561, 1997.

DIKSHIT, M., SHARMA, P. Nitric oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: a flowcytometric study. **Methods in Cell Science**, Dordrecht, v.24, p69-76, 2002.

DING, A.H., NATHAN, C.F., STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **American Journal of Immunology**, New York, v.141, p.2407-2412, 1988.

DOBADO-BERRIOS, P.M., LOPEZ-PEDRERA, C., VELASCO, F., CUADRADO, M.J. The role of tissue factor in the antiphospholipid syndrome. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 11, p. 2467-22476, 2001.

DUNOYER-GEINDRE, S., DE MOERLOOSE, P., GALVE-DE ROCHEMONTEIX, B., REBER, G., KRUTHOF, E.K. NFkappaB is na essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti-beta(2)-glycoprotein 1 antibodies. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.88, p.851-857, 2002.

EAVES-PYLES, T., ALEXANDER, J. Rapid and prolonged impairment of gut barrier function after thermal injury in mice. **Shock**, v.9, p.95-100, 1998.

EBNER, S., HOFER, S.; NGUYEN,V.A.; FÜRHPATER, C.; HEROLD, M, FRITSCH, P.; HEUFLER, C.; ROMANI, N. A Novel Role for IL-3: Human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern1 **J. Immunol.**, 168: 6199–6207, 2002.

- EL-BENNA, J., DANG, P.M-C., GOUGEROT-POCIDALO, M-A., ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v.53, p.199-206, 2005.
- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., ROSE, D.M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R.A., HENSON, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v.405, p. 85-90, 2000.
- FILEP, J.G., BEAUCHAMP, M., BARON, C., PAQUETTE, Y. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. **J. Immunology**, v.161, p.5656-5662, 1998.
- FLEIT, H.B., KOBASIUK, C.D. The human monocyte-like cell line THP-1 expresses Fc γ RI and Fc γ RII. **J. Leukocyte Biology**, v.49, p.556-565, 1991.
- FOGG, D.K., SIBON, C., MILED, C., JUNG, S., AUCOUTURIER, P., LITTMAN, D.R., CUMANO, A., GEISSMANN, F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 311, p. 83-87, 2006.
- GABAY, C., KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.340, n.6, p.448-454, 1999.
- GALAZKA, M., KEIL, L.B., KOHLES, J.D., LI, J., KELTY, S.P., PETERSHEIM, M., DEBARI, V.A. A stable, multi-subunit complex of β_2 -glycoprotein I. **Thrombosis Research**, Oxford, v.90, p.131-137, 1998.
- GARCIA-RAMIREZ, M., CANALS, F., HERNANDEZ, C., COLOME, N., FERRER, C., CARRASCO, E., GARCIA-ARUMI, J., SIMO, R. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis

(DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v.50, p.1294-1303, 2007.

GEORGE J., BLANK, M., LEVY, Y., MERONI, P., DAMIANOVICH, M., TINCANI, A., SHOENFELD, Y. Differential effects of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies on endothelial cells and on the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome. **Circulation**, v. 97, n. 9, p. 900-906, 1998.

GEORGE, J., HARATS, D., GILBURD B., AFEK, A., LEVY, Y., SCHNEIDERMAN, J., BARSHACK, I., KOPOLOVIC, J., SHOENFELD, Y. Immunolocalization of β_2 -glycoprotein I (Apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. **Circulation**, v.99, p.2227-2230, 1999.

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.16-122, 1999.

GHARAVI, A.E., PIERANGELI, S.S., COLDEN-STANFIELD, M., LIU X.W., ESPINOLA, R.G., HARRIS, E.N. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 5, p. 2922-2927, 1999.

GHARAVI, A.E., PIERANGELI, S.S., HARRIS, E.N. New developments in viral peptides and APL induction. **Journal of autoimmunity**, London, v.15, p.227-230, 2000.

GOGOS, C.A., GLIALI, S., PALIOGIANNI, F., DIMITRACOPOULOS, G., BASSARIS, H.P., VAGENAKIS, A.G. Interleukin-6 and C-reactive protein as early markers of sepsis in patients with diabetic ketoacidosis or hiperosmosis. **Diabetologia**, v.44, p.1011-1014, 2001.

GOLDSMITH, G.H. PIERANGELLI, L.S., BRANCH, D.W., GHARAVI, A.E., HARES, E.N., Inibition of protrombin activation by antiphospholipids antibodies and β_2 -glycoprotein I. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.87, p.548-554, 1994.

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 Kpffer cells. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.36, p.741-747, 2002.

GOMES, L.F., KNOX DE SOUZA, P.R., GIAVAROTTI, K.A.S., JUNQUEIRA, V.B.C., SANS, J., VIDELA, L.S. β_2 -glycoprotein I Inhibition of mouse Kupffer cells respiratory burst is dependent on liver architecture. **Comp. Hepatol.**, London, v.3, suppl I, p.S43, 2004a.

GOMES, L.F.; ALVES, A.L.F.L.; SEVANIAN, A.; PERES, C.A.; CENDOROGLO, M.S.; MELLO-ALMADA FILHO, C.; QUIRINO, L.M.; RAMOS, L.R.; JUNQUEIRA, V.B.C. Role of β_2 -Glycoprotein I, LDL-, and Antioxidant Levels in Hypercholesterolemic Elderly Subjects. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v.6, p.237-244, 2004b.

GRATTARD, F., POZZETTO, B., BERTHELOT, P., RAYET, I., ROS, A., LAURAS, B., GAUDIN, O.G. Arbitrarily primed PCR, ribotyping, and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, p596-602, 1994.

GREEN, D.R., BWEERE, H.M. Apoptosis: gone but not forgotten. **Nature**, London, v. 405, p. 28-29, 2000.

GUERIN, J., SHENG, U., REDDEL, S., IVERSON, M., CHAPMAN, M.G., KRILIS, S.A. Heparin inhibits the binding of β_2 -Glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, p.2644-2649, 2002.

HAMMEL, M., SCHWARZENBACHER, R., GRIES, A., KOSTNER, G.M., LAGGNER, P., PRASSL, R. Mechanism of the interaction of β_2 -glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.14173-14181, 2001.

HAMMEL, M., KRIECHBAUM, M., GRIES, A., KOSTNER, G.M., LAGGNER, P., PRASSL, R. Solution structure of human and bovine β_2 -glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 321, p.85-97, 2002.

HAMPTON, M.B., KETTLE A.J., WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, mieloperoxidase and bacterial killing. Review article. **Blood**, Philadelphia, v.92, p.3007-3017, 1998.

HARA, H., TANISHITA, H., YOKOYAMA, S., TAJIMA, S., YAMAMOTO, A. Induction of acetylated low density lipoprotein receptor and suppression of low density lipoprotein receptor on the cells of human monocytic leukemia cell line (THP-1 cell). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 146, p. 802-808, 1987.

HASSOUN, H.T., KONE, B.C., MERCER, K.W., MOODY, F.G., WEISBRODT, N.W., MOORE, F.A. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. **Shock**, v.15, p.1-10, 2001.

HASUNUMA, Y., MATSUURA, E., MAKITA Z., KATAHIRA, T., NISHI, S., KOIKE, T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in

oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.107, p.569-573, 1997.

HE, J., XIAO, Z., CHEN, X., CHEN, M., FANG, L., YANG, M., LV, Q., LI, Y., LI, G., HU, J., XIE, X. The expression of functional toll-like receptor 4 is associated with proliferation and maintenance of stem cell phenotype in endothelial progenitor cells (EPCs). **Journal of Cellular Biochemistry**, v.12, 2010. [Epub ahead of print]

HEINDENREICH, S. Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. **Journal of Leukocyte Biology**, v.65, p.737-743, 1999.

HERABAYASHI, Y., TANIUCHI, S., KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.82, p.253-259, 1985.

HEUMANN, D., GLAUSER, M.P., CALANDRA, T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.1, p.49-55, 1998.

HOEG, J.M., SEGAL, P., GREEG, R.E., CHANG, Y.W., LINDGREN, F.T., ADAMSON, G.L., FRANK, M., BRICKMAN, C., BREWER, H.B.JR. Characterization of plasma lipids and lipoproteins in patients with β_2 -Glycoprotein I (apolipoprotein H) deficiency. **Atherosclerosis**, v.55, p.25-34, 1985.

HORBACH, D.A., OORT, E., TEMPELMAN, J.M., DERKSEN, R.H.W.M., GROOT, P.G. The prevalence of a non-phospholipid-binding form of β_2 -glycoprotein I in human plasma. **Thrombosis & Haemostasis**, Stuttgart, v.80, p.791-797, 1998.

- 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. **Thrombosis & Haemostasis**, Stuttgart, v.81, p.87-95, 1999.
- HOTCHKISS, R.S., KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med**, v.348. p.138-150, 2003.
- ICHINOSE, A., BOTTENUS, R.E., DAVIE, E.W. Structure of transglutaminases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 13411-13414, 1990.
- IEKO, M., ICHIKAWA, K., TRIPLETT, D.A., MATSUURA, E., ATSUMI, T., SAWADA, E-I., KOIKE, T. β_2 -glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. **Arthritis & Rheumatism**, v.42, p.167-174, 1999.
- ITOH, Y., INUZUKA, K., KOHNO, I., WADA, H., SHIKU, H., OHKURA, N., KATO, H. Highly increased plasma concentrations of the nicked form of β_2 -glycoprotein I in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 128, p. 1017-1024, 2000.
- KAPLANSKI, G., CACOUB, P., FARNARIER, C., MARIN, V., GREGOIRE, R., GATEL, A., DURAND, J-M., HARLE, J-R., BONGRAND, P., PIETTE, J-C. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus – related antiphospholipid syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 55-64, 2000.
- KATO, H., ENJOJI, K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine β_2 Glycoprotein I: The presence of five sushi domains. **Biochemistry**, v.30, p. 11687-11694, 1991.

KEELING, D.M., WILSON, A.J., MACKIE, I.J., MACHIN, S.J., ISENBERG, D.A.
Some 'antiphospholipid antibodies' bind to beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.82, p.571-574, 1992.

KLAERKE, D.A., ROJKJAER, R., CHRISTENSEN, L., SCHOUSBOE, I.
Identificaton of β_2 -Glycoprotein I as a membrane-associated protein in kidney: purification by calmodulin affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1339, p.2203-216, 1997.

KNOX DE SOUSA, P., BARCINSKI, M.A., JUNQUEIRA, V.B.C., GOMES, L.F.
Modulation of macrophage functional activity by β_2 -glycoprotein I during phagocytosis of leishmania (L) amazonensis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., Caxambú, 2001. **Programa e Resumos**. São Paulo, SBBq, 2001. p.207, res.TO2.

KOBAYASHI, K., MATSUURA, E., LIU, Q., FURUKAWA, J., KAIHARA, K., INAGAKI, J., ATSUMI, T., SAKAIRI, N., YASUDA, T., VOELKER, D.R., KOIKE, T.
A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, v.697-709, 2001.

KOCH, S., DONARSKI, N., GOETZE, K., KRECKEL M., STUERENBURG, H.J., BUHMANN C., BEISIEGEL U.
Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, p.1143-51, 2001.

KOH, I.H.J., SILVA, R.M. Novel *in vitro* small intestinal graft model for study of bacterial translocation in the rat. **Transplantation Proceedings**, v.28, p.2667-2668, 1996a.

KOH, I.H.J., MONTERO, E.F.S., KELLER, R., ABREU, M.C.G., GOLDEMBERG, S., SILVA, R.M. Can the portal vein be a conduit for bacterial translocation? **Transplantation Proceedings**, v.28, p.2671, 1996b.

KOH, I.H.J., MONTERO, E.F.S., KELLER, R. Can bacterial translocation to the mesenteric lymph node be correlated with systemic infection? **Transplantation Proceedings**, v.28, p.2663, 1996c.

KOH, I.H.J., LIBERATORE, A.M.A., MENCHACA-DIAZ, J.L., RUIZ-SILVA, M., VILELA-OLIVEIRA, L., WATANABE, A.Y., SALOMÃO, R., FAGUNDES-NETO, U., SILVA, R.M. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. **Metab. Immune Disord Drug Targets**, v.6, p.7-16, 2006.

KOHRO, T., TANAKA, T., MURAKAMI, T., WADA, Y., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T., KODAMA, T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. Atheroscler. Thromb.*, v. 11, p. 88-97, 2004.

KRISTENSEN, T., SCHOUSBOE, I., BOEL, E., MULVIHILL, E.M., HANSEN, R.R., MOLLER, K.B., MOLLER, N.P.H., SOTTRUP-JENSEN, L. Molecular cloning and mammalian expression of human β_2 -glycoprotein I cDNA. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.289, p183-186, 1991.

LANNERGARD, A., VIBERG, A., CARL, O., KARLSSON, M.O., SANDSTROM, M., LARSSON, A. The time course of body temperature, serum amyloid A protein, C-reactive protein and interleukin-6 in patients with bacterial infection during the

initial 3 days of antibiotic therapy. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, p1-9, 2009.

LAPLAUD, P.M., BAUCHART, D., DURAND, D., BEAUBATIE, L., CHAPMAN, M.J. Intestinal lymph and plasma lipoproteins in the preruminant calf: partial resolution of particle heterogeneity in the 1.040-1.090 g/mL interval. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.32, p.1429-1439, 1991.

LEAPHART, C.L., TEPAS, J.J. The gut is a motor of organ system disfunction. **Surgery**, v.141, p.563-569, 2007.

LEDERER, J.A., RODRICK, M.L., MANNICK, J.A. The effects of injury on the adaptive immune response. **Shock**, v. 11, p. 153-159, 1999.

LEE, A.T., BALASUBRAMANIAN, K., SCHROIT, A.J. β_2 -glycoprotein I-dependent alterations in membrane properties. **Biochimica et Biophysic Acta**, v. 1509, p. 475-484, 2000.

LIEBERMAN, M.M., SACHANANDANI, D.M., PINNEY, C.A. Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. **Clin. Diagn. Lab. Immun.**, Washington, v.3, p.654-662, 1996.

LIM, Y-M., MOON, S-J., AN, S-S., LEE, S-J, KIM, S-Y, CHANG, I-S, PARK, K-L., KIM, A-H., HEO, Y. Suitability of macrophage inflammatory protein-1 β production by THP-1 cells in differentiating skin sensitizers from irritant chemicals. **Contact Dermatitis**, v.38, p.193-198, 2008.

LIN, K.Y., PAN, J.P., YANG, D.L., HUANG, K.T., CHANG, M.S., DING, P.Y.A., CHIANG, A.N. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Life Sci. Oxford**, v.69, p.707-719, 2001.

LOPEZ-LIRA, F., ROSALES-LEO, L., MARTINEZ, V.M., RUIZ ORDAZ, B.H. The role of Beta2-glycoprotein I (beta2GPI) in the activation of plasminogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, n.4, p.815-823, 2006.

LOSIER, J.A., 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.

LUTTERS, B.C., DE GROOT, P.G., DERKSEN, R.H. Beta 2 Glycoprotein I – a key player in the antiphospholipid syndrome. **Isr. Med. Assoc. J.** v.4, p.958-962, 2002.

LUTTERS, B.C.H., DERKSEN, R.H.W.M., TEKELENBURG, W.L., LENTING, P.J., ARNOUT, J., GROOT, P.G. Dimers of β_2 -glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the Apolipoprotein E Receptor 2'. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, p.33831-33838, 2003.

LUZZANI A., POLATI, E., DORIZZI, R., RUNGATSCHER A., PAVAN, R., MERLINI, A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. **Critical Care Medicine**, v.31, n.6, p.1737-1741, 2003.

LYONS, C.R., ORLOFF, G.J., CUNNINGHAM, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. **J.Biol. Chem.** v.268, p. 6370, 1991.

MA K., SIMANTOV, R., ZHANG, J-C., SILVERSTEIN, R., HAJJAR, K.A., MACCRAE, K.R. High affinity binding of β_2 -glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15541-15548, 2000.

MACCUSKEY, R.S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **Liver**, Copenhagen, v.20, p.3-7, 2000.

MAGNOTTI, L.J., UPPERMAN, J.S., XU, D.Z., LU, Q., DEITCH, E.A. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. **Ann. Surgery**, v.228, n.4, p.518-527, 1998.

MANGAN, D.F., WAHL, S.M. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.147, p.3408-3412, 1991.

MARSHALL, J.C., VINCENT, J.L., FINK, M.P., COOK, D.J., RUBENFELD, G., FOSTER, D., FISHER, C.J.JR., FAIST, E., REINHART, K. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canadá, October 25-26, 2000. **Critical Care Medicine**, v.31, p.1560-1567, 2001.

MARTICH, T.D., DANNER, R.L., CESKA, M., SUFFREDINI, A.F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of anti-inflammatory agents. **J. Exp. Medicine**, v.173, p.1021-1024, 1991.

MARTIN, G.S., MANNINO, D.M., EATON, S., MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Eng. J. Medicine**, v.348, p.1546-1554, 2003.

MARTINS, P.S., KALLAS, E.G., CENDOROGLO NETO, M., DALBONI, M.A., BLECHER, S., SALOMÃO, R. Upregulation of reactiv oxygen species

generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock**, v.20, p.208-212, 2003.

MARTINS, P.S., BRUNIALTI, M.K., DA LUZ FERNANDES, M., MARTOS, L.S.W., GOMES, N.E., RIGATO, O., SALOMÃO, R. Bacterial recognition and induced cell activation in sepsis. **Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets**, v.6, p.183-191, 2006.

MARTINS, P.S., BRUNIALTI, M.K., MARTOS, L.S.W., MACHADO, F.R., ASSUNÇÃO, M.S., BLECHER, S., SALOMÃO, R. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. **Critical Care**, v.12, R25, 2008.

MACCRAE, K.R., FEINSTEIN, D.I., CINES, D.B. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome. In: COLMAN, R.W., HIRSH, J., MARDER, V.J., CLOWES, A.W., GEORGE, J.N, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia,PA, p. 1339-1356, 2001.

MCCALL, T.B, BOUGHTON-SMITH, N.K, PALMER, R.M, WHITTLE, B.J., MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils: release and interaction with superoxide anion. **Biochemical Journal**, v.261, p.293, 1989.

MEHDI, H., NUNN, M., STEEL, D.M., WHITEHEAD, A.S., PEREZ, M., WALKER, L., PEEPLES, M.E. Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). **Gene**, Amsterdam, v.108, p.293-298, 1991.

MEHDI, H., ASTON, C.E., SANGUERA, D.K., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. **Human Genetics**, Berlin, v.105, p.63-71, 1999.

MEHDI, H., MANZI, S.M., DESAI, P., CHEN, Q., NESLERODE, C., BONTEMPO, F., STROM, S.C., ZARNEGA, R., KAMBO, M.I. A funcional polymorphism at the transcriptional initiation site in β_2 -Glycoprotein I (apolipoprotein H) associated with reduced gene expression and lower plasma levels of β_2 -Glycoprotein I. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n.2, p. 230-238, 2003.

MENCHACA-DIAZ, J.L., SILVA, R.M., SIQUEIRA, A.F., RUIZ-SILVA, M., BUZZUTTI, F.I., SILIANO, P.R., FAGUNDES-NETO, U., MORAIS, M.B., KOH, I.H. Changes in bacterial translocation profile induced by sepsis. **Transplantation Proceedings**, New York, v.34, n.3, p.1007-1008, 2002.

MENCHACA-DIAZ, J.L., LIBERATORE, A.M.A., SALOMÃO, R., TAKI, M.Y., VILELA-OLIVEIRA, L., FRANCISCO JR, J., FAGUNDES-NETO, U., MORAIS, M.B., KOH, I.H.J. Influence of bacterial translocation in the Genesis of the microcirculation hypoperfusion in sepsis. **Critical Care**, v. 11, n. 3, p.24, 2007.

MENCHACA-DIAZ, J.L. **Influência da resposta immune do intestine no estado inflamatório sistêmico e na evolução clínica em ratos submetidos a um desafio microbiano agudo de origem intestinal e ou sanguíneo**. São Paulo, 2008 [Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo].

MIYAKIS, S., ROBERTSON, S.A., KRILIS, S.A. Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome – lessons from knockout mice. **Clinical Immunology**, v.112, p.136-143, 2004a.

MIYAKIS, S., GIANNAKOPOULOS, B., KRILIS, S.A. Beta 2 glycoprotein I – function in health and disease. **Thromb. Research**, v.114, p.335-346, 2004b.

- MOESTRUP, S.K., SCHOUSBOE, I., JACOBSEN, C., LEHESTE, J-R, CHRISTENSEN, E.I. WILLNOW, T.E. Beta-2 glycoprotein I (Apolipoprotein H) and Beta-2 glycoprotein I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.902-909, 1998.
- MOSER, T.L., KENAN, D.J., ASHLEY, T.A., ROY, J.A., GOODMAN, M.D., MISRA, U.K., CHEEK, K.J., PIZZO, S.V. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.98, p.6656-6661, 2001.
- MULLOCK, B.M., SHAW, L.J., FITZHARRIS, B., PEPPARD, J., HAMILTON, M.J.R., SIMPSON, M.T., HUNT, T.M., HINTON, R.H. Sources of proteins in human bile. **Gut**, v.26, p.500-509, 1985.
- MYHRE, O., ANDERSEN, J.M., AARNES, H., FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicator of reactive species formation. **Biochem. Pharmacol.**, London, v.65, p.1575-1582, 2003.
- NAKAGAWA, H., YASUDA, S., MATSUURA, E., KOBAYASHI, K., IEKO, M., KATAOKA, H., HORITA, T., ATSUMI, T., KOIKE, T. Nicked β_2 -glycoprotein I binds antistatin e.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. **Blood**, v.114, p.2553-2559, 2009.
- NAKAYA, Y., SCHAEFER, J., BREWER, H.B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.95, p.1168-1174, 1980.

NIMPF, J., BEVERS, E.M., BOMANS, P.H., TILL, U., WURM, H., KOSTNER, G.M., ZWAAL, R.F. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by veta2-glycoprotein I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.884, n.1, p.142-149, 1986.

NISHIMURA N., HARADA-SHIBA, M., TAJIMA, S., SUGANO, R., YAMAMURA, T., QIANG, Q.Z., YAMAMOTO, A. Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.1562-1567, 1998.

NONAKA, M., MATSUDA, Y., SHIROISHI, T., MORIWAKI, K., NONAKA, M., NATSUUME-SAKAI, S. Molecular cloning of mouse beta 2-glycoprotein I and mapping of the gene to chromosome 11. **Genomics**, San Diego, v.13, p-1082-1087, 1992.

OBERHOLZER, A., OBERHOLZER, C., MODAWER, L.L. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. **Shock**, Augusta, v.16, n,2, p.83-96, 2001.

OHKURA, N., HAGIHARA, Y., YOSHIMURA, T., GOTO, Y., KATO, H. Plasmin can reduce the function of human beta2 glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form. **Blood**, v.91, p. 4173-4179, 1998.

OKKELS, H, RASMUSSEN, T.E., SANGUERA, D.K., KAMBOH, M.I., KRISTENSEN, T. Structure of the human β_2 -glicoproteína I (apolipoprotein H) gene. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.259, p.435-440, 1999.

OPAL, S.M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccaide strategies and the management of severe sepsis. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.297, p.365-377, 2007.

OPPENHEIM, J.J., ZACHARIAE, C.O.C., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K.
Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family.
Annu. Ver. Immunology, v.9, p.617, 1991.

PASCUAL, C., BREDLE, D., KARZAI, W., MEIER-HELLMANN, A.,
OBERHOFFER, M., REINHART, K. Effect of plasma and LPS on respiratory
burst of neutrophils in septic patients. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v.24,
p.1181-1186, 1998.

PEREIRA, E.M. **Modificação induzida por β_2 -glicoproteína I na resposta
oxidativa de polimorfonucleares humanos durante a fagocitose.** São Paulo,
2005. [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade
de São Paulo].

PETTILA, V., HYNINEN, M., TAKKUNEN O., KUUSELA, P., VALTONEN, M.
Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with
suspected sepsis. **Intensive Care Medicine**, v.28, p.1220-1225, 2002.

PIERANGELI, S.S., COLDEN-STANFIELD, M., LIU, X., BARKER, J.H.,
ANDERSON, G.L., HARRIS, E.N. Antiphospholipid antibodies from
antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo.
Circulation, v. 99, n. 15, p. 1997-2002, 1999.

PIZZINI, C., MUSSAP, M., PLEBANI, M., FANOS, V. C-reactive protein and serum
amyloid A protein in neonatal infections. **Scandinavian J. Infectious Diseases**,
v.32, p.229-235, 2000.

POLZ, E., WURM, H., KOSTNER, G.M. Investigations on β_2 -glycoprotein I in the
rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. **Int.
J. Biochem.**, Oxford, v.11, p.265-570, 1980.

- PROPERT, D.N. The relation of sex, smoking status, birth rank, and parental age to beta2-glycoprotein I levels and phenotypes in a sample Australian Caucasian adults. **Human Genetics**, v.43, p.281-288, 1978.
- RAGUSA, M.A., COSTA, S., CEFALU, A.B., NOTO, D., FAYER, F., TRAVALI, S., AVERNA, M.R., GIANGUZZA, F. RT-PCR and *in situ* hybridization analysis of apolipoprotein H expression in rat normal tissues. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v.18, p.449-455, 2006.
- RAMACHANDRAN, P., BOONTHEUNG, P., PANG, E., YAN, W., WONG, D.T., LOO, J.A. Comparison of N-linked glycoproteins in human whole saliva, parotid, submandibular, and sublingual glandular secretions identified using hydrazide chemistry and mass spectrometry. **Clinical Proteomics**, v.4, p. 80-104, 2008.
- RAND, J.H. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. **Circ. Res.**, v.90, p.29-37, 2002.
- RASCHI, E., TESTONI, C., BOSISIO, D., BORGHI, M.O, KOIKE, T., MANTOVANI, A., MERONI, P.L. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3495-3500, 2003.
- REYNOLDS, J.V., MURCHAN, P., LEONARD, N., GOUGH, D.B., CLARKE, P., KEANE, F.B.V., TANNER, W.A. High-dose interleukin 2 promotes bacterial translocation from the gut. **British Journal of Cancer**, London, v.72, p.634-636, 1995.
- RICHARDSON, M.R., PRICE, M.O., PRICE, F.W., PARDO, J.C., GRANDIN, J.C., YOU, J., WANG, M., YODER, M.C. Proteomic analysis of human aqueous humor using multidimensional protein identification technology. **Molecular vision**, v.15, p.2740-2750, 2009.

- RIGATO, O., SILVA, E., KALLAS, E.G., BRUNIALTI, M.K., MARTINS, P.S., SALOMÃO, R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. **Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.**, v.1, n.1, p.13-30, 2001.
- RIVOLDI, P., GEROSA, M., RASCHI, E., TESTONI, C., MERONI, P.L. Endothelium as a target for antiphospholipid antibodies. **Immunobiology**, v. 207, p. 29-36, 2003.
- ROEBUCK, K.A., FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. **J. Leukocyte Biology**, v.66, p.876-888, 1999.
- ROUBEY, R.A., EISENBERG, R.A., HARPER, M.F., WINFIELD, J.B. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize beta 2- glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 2, p. 954-960, 1995.
- RUIZ-SILVA, M., SILVA, R.M., MENCHACA-DIAZ, J.L., SIQUEIRA, A.F., BUZZUTTI, F.I., SILIANO, P.R., TAJIKI, M.H., SALOMÃO, R., FAGUNDES-NETO, U., MORAIS, M.B., KOH, I.H. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. **Transplantation Proceedings**, v.34, n.3, p.1001-1002, 2002.
- RURALT, K., HAZZALIN, C.A., MAHADEVAN, L.C. Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) mRNA induction. **J. Biology Chemistry**, v.276, n.9, p.6666-6674. 2001.
- RUSSEL, J.A. Management of sepsis. **N. Engl. J. Med.**, v.355, p.1699-1713, 2006.

- SAKAI, T., BALASUBRAMANIAN, K., MAITI, S., HALDER, J.B., SCHROIT, A. Plasmin-cleaved β_2 -glycoprotein I is an inhibitor of angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 171, p.1659-1669, 2007.
- SALOMÃO, R., RIGATO, O., PIGNATARI, A.C., FREUDENBERG, M.A., GALANOS, C. Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and therapeutic perspectives. **Infection**, v.27, n.1, p.1-11, 1999.
- SANCHEZ-GARCIA, M., PRIETO, A., TEJEDOR, A., MARTIN-DUCE, A., FERNANDEZ-SANCHEZ, F.J., GRANELL, J. ALVAREZ-MON, M. Characteristics of thoracic duct lymph in multiple organ dysfunction syndrome. **Archives of Surgery**, v132, n.1, p.8-13, 1997.
- SANGUERA, D.K., KRISTENSEN, T., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) protein polymorphism. **Human Genetics**, 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.
- SANGUERA, D.K., NESTLERODE, C.S., FERRELL, R.E., KAMBOH, M.I. Chimpanzee apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I): report on the gene structure, a common polymorphism, and a high prevalence of antiphospholipid antibodies. **Human Genetics**, Berlin, v.109, p63-72, 2001.
- SCHWARZENBACHER, R., ZETH, K., DIEDERICHS, K., GRIES, A., KOSTNER, G.M., LAGGNER, P., PRASSL, R. Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. **The EMBO Journal**, v.18, n.22, p.6228-6239, 1999.

- SCHWENDE, H., FITZKE, E., AMBS, P., DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, p. 555-561, 1996.
- SERBINA, N.V., JIA, T., HOHL, T.M., PAMER, E.G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.26, p.421-452, 2008.
- SHULTZE, H.E.; HEIDE, K.; HAUPT, H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares β_2 -globulin des Humanserums. **Naturwissenschaften** 23: 719, 1961.
- SIERRA, R., RELLO, J., BAILEN, M.A., BENITEZ, E., GORDILLO, A., LEON, C., PEDRAZA, S. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. **Intensive Care Medicine**, v.30, p.2038-2045, 2004.
- SILVA, R.M., KELLER, R., MONTERO, E.F., SILVA, M.H., GOLDENBERG, S., KOH, I.H. Role of Peyer's patch in bacterial translocation. **Transplantation Proceedings**, v.28, n.5, p.2672, 1996.
- SIMANTOV, R., LASALA, J.M., LO, S.K., GHARAVI, A.E., SAMMARITANO, L.R., SALMON, J.E., SILVERSTEIN, R.L. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 2211-2219, 1995.
- SIMON, L., GAUVIN, F., AMRE, D.K., SAINT-LOUIS, P., LACROIX, J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Infect. Disease**, v.39, p.206-217, 2004.

- SELLAR, G.C., KEANE, J., MEHDI, H., PEEPLES, M.E., BROWNE, N., WHITEHEAD, A.S. Characterization and acute phase modulation of canine apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). **Biochemical and Biophysical Research Commun**, New York, v.191, p.1288-1293, 1993.
- SHOUSBOE, I.; RASMUSSEN, MS. The effect of β_2 -glycoprotein I on the dextran sulfate and sulfatide activation of the contact system (Hageman factor system) in the blood coagulation. **Int. J. Biochem.**; 20: 787–792, 1988.
- SHENG, Y.; HERZOG, H.; KRILIS, S.A. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse β_2 -glycoprotein I. **Genomics**, San Diego, v. 41, p. 128-130, 1997.
- SHENG, Y., REDDEL, S.W., HERZOG, H., WANG, Y.X., BRIGHTON, P., FRANCE, M.P., ROBERTSON, S.A., KRILIS, S.A. Impairment thrombin generation in β_2 -glycoprotein I null mice. **J. Biolo. Chemistry**, v.276, p. 13817-13821, 2001a.
- SHENG, Y., HANLY, J.G., REDDEL, S.W., KOUTS, S., GUERIN, J., KOIKE, T., ICHIKAWA, K., STURGESS, A., KRILLIS, S.A. Detection of 'antiphospholipid' antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, plus antibodies binding β_2 -glycoprotein I and prothrombin. **Clinical and Experimental Immunology**, v.124, p. 502-508, 2001.
- SILVESTRE, J., PÓVOA, P., COELHO, L., ALMEIDA, E., MOREIRA, P., FERNANDES, A., MEALHA, R., SABINO, H. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? **Intensive Care Med.**, v.35, p.909-913, 2009.

- SODIN-SEMRL, S., ROZMAN, B. β_2 -glycoprotein I and its clinical significance: From gene sequence to protein levels. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, p. 547-552, 2007.
- STEINBERG, D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation**, v. 76, p. 508-514, 1987.
- STEINKASSERER, A., ESTALLER, C., WEISS, E.H., SIM, R.B., DAY, A.J. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human β_2 -glycoprotein I. **The Biochemical Journal**, v. 277, p. 387-391, 1991.
- STELLA, C.N. **Produção, caracterização e aplicação analítica de anticorpos monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I**. São Paulo, 2009 [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]
- TACKE, F., RANDOLPH, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v. 211, p. 609-618, 2006.
- TAJIMA, S., HAYASHI, R., TSUCHIYA, S., MIYAKE, Y., YAMAMOTO, A. Cells of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) synthesize and secrete apolipoprotein E and lipoprotein lipase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 126, p. 526-531, 1985.
- TAKEDA, K., AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, 17: 1-14, 2005.
- TRAORE, K., TRUSH, M.A., GEORGE, M.JR., SPANNHAKE, E.W., ANDERSON, W., ASSEFFA, A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. **Leukemia Research**, v.29, n.8, p863-879.

- TROYANOVSKY, B., LEVCHENKO, T., MANSSON, G., MATVIJENKO, O., HOLMGREN, L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.152, p.1247-1254, 2001.
- TRZECIAK, S., RIVERS, E.P. Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis. **Critical Care**, v.9, n.4, S20-S26, 2005.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T., TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia line (THP-1). **In. J. Cancer**, v.26, p.171-176, 1980.
- VAN LUMMEL, M., PENNING, M.T., DERKSEN, R.H., URBANUS, R.T., LUTTERS, B.C., KALDENHOVEN, N., DE GROOT, P.G. The binding site in β_2 -glycoprotein I for ApoEr2' on platelets is located in domain V. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, p.36729-36736, 2005.
- VAN ZEE, K.J., DEFORGE, L.E., FISCHER, E., MARANO, M.A., KENNEY, J.S., REMICK, D.G., LOWRY, S.F., MOLDAWER, L.L. IL-8 in shock, endotoxemia, and following IL-1 administration. **J. Immunology**, v. 146, p. 3478.
- VERROUST, P.J., BIRN, H., NIELSEN, R., KOZYRAKI, R., CHRISTENSEN, E.I. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. **Kidney International**, v.62, p.745-756, 2002.
- VOWELLS, S.J., SEKHSARIA, S., MALECH, H.L., SHALIT, M., FLEISHER, T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.178, p.89-97, 1995.

- WANG, F., WIA, X.F., SUI, S.F., Human apolipoprotein H may have various orientations when attached to lipid layer. **Biophysical Journal**, Missouri, v.83, p.985-993, 2002.
- WALRAND, S., VALEIX, S., RODRIGUEZ, C., LIGOT, P., CHASSAGME, J., VASSON, M.P. Flow cytometer study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.331, p.103-110, 2003.
- WANG, J-F., KOMAROV, P., GROOT, H. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: The role of NO, O_2^-/H_2O_2 e HclO. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.304, p.189-196, 1993.
- WANG, H-H. CHIANG, A-N. Cloning and characterization of human β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) gene promoter: roles of the atypical TATA box and hepatic nuclear factor-1 α in regulating β_2 -GPI promoter activity. **The Biochemical Journal**, v. 380, p. 455-463, 2004.
- YAN, L., VANDIVIER, R.W., SUFFREDINI, A.F., DANNER, R.L. Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide syntase activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.153, p.1825-1834, 1994.
- YAO, Y-M., BAHRAMI, S., LEICHTFRIED G., REDL, H., SCHLAG, G. Pathogenesis of hemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v.221, p398-405, 1995.
- YASUDA, S., TSUTSUMI, A., CHIBA, H., YANAI, H., MIYOSHI, Y., TAKEUCHI, R., HORITA, T., ATSUMI, T., ICHIKAWA, K., MATSUURA, E., KOIKE, T. β_2 -glicoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.152, p.337-346, 2000.

- YASUDA, S., ATSUMI, T., IEKO, M., MATSUURA, E., KOBAYASHI, K., INAGAKI, J., KATO, H., TANAKA, H., YAMAKADO, M., AKINO, M., SAITOU, H., AMASAKI, Y., JODO, S., AMENGUAL, O., KOIKE, T. Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. **Blood**, v. 104, p. 3766-3772, 2004.
- YU, P., PASSAM, F.H., YU, D.M, DENYER, G., KRILIS, S.A. β_2 -glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.6, p. 1215-1223, 2008.
- YUI, Y., HATTORI, R., KOSUGA, K., EIZAWA, W., HIKI, K., OHKAWA, S., TERAOKA, S., KAWAI, C. Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. **J. Biol. Chem.** v.266, p.3369, 1991.
- ZAHEDI, R.G., SUMMERS, L.K., LUMB, P., CHIK, G., CROOK, M.A. The response of serum apolipoprotein H to an oral fat load. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v.41, p.330-334, 2004.
- ZHANG, J., MACCRAE, K.R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β_2 -glycoprotein I antibodies. **Blood**, v. 105, p. 1964-1969, 2005.
- ZOBIACK, N., RESCHER, U., LAARMANN, S., MICHGEHL, S., SCHMIDT, M.A., GERKE, V. Cell surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic E coli induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin A2. **Journal of Cell Science**, v.115, p.91-98, 2002.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 85/2007

São Paulo, 02 de julho de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Elisângela Monteiro Pereira
Orientador: Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de junho de 2007, **APROVOU** o projeto "A beta 2-Glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de fase aguda" (Protocolo CEP nº 440) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas retirar o nome e o endereço do CEP/FCF da última frase do TCLE e colocar logo após as assinaturas.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 16/2008

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Produção de anticorpos monoclonais para beta 2-glicoproteína I” (Protocolo CEEA nº178), de responsabilidade da pesquisadora **Carolina Nigro Stella** sob a orientação da Profa. Dra. Ligia 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 14/04/2008.*

São Paulo, 14 de abril de 2008.

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Suplente da Presidente da CEEA

Anexo 3: Características clínicas e epidemiologia dos pacientes sépticos (1 de 2)

Paciente	Idade	Estádio	Foco infeccioso	Culturas	Número de disfunções	SOFA D1	Comorbidades	Morte / sobrevida 28 dias	Morte / sobrevida hospitalar
01	67	Sepse	Pele/sangue	Cocos G(+)	-	-	Hepatopatia	Morte	-
02	32	Sepse	Cateter	Cocos G(+)	-	-	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Sobrevida
03	20	Sepse	Amidalite	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
04	27	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
05	59	Sepse	Pulmão	-	-	-	ICC	Sobrevida	Sobrevida
06	53	Sepse	Pulmão	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
07	65	Sepse	ITU	-	-	-	IRC	Sobrevida	Sobrevida
08	67	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida
09	31	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
10	19	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
11	71	Sepse	ITU	-	-	-	HAS / AVC	Sobrevida	Sobrevida
12	66	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida
13	72	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida
14		Sepse Grave	-	-	-	-	-	-	-
15	79	Sepse Grave	Pulmão	-	1	1	Parkinson	Sobrevida	Sobrevida
16	49	Sepse Grave	Abdome agudo perfurativo	-	4	5	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte
17	57	Sepse Grave	Pulmão	-	2	4	HAS / IRC / Tx renal	Sobrevida	Sobrevida
18	85	Sepse Grave	ITU	-	2	-	Hepatopatia	Morte	-
19	66	Sepse Grave	Pulmão	-	3	6	-	Morte	-
20	59	Sepse Grave	Pulmão	Acinetobacter	2	5	-	Morte	-
21	78	Sepse Grave	Abdome	-	2	3	HAS / FA crônica	Sobrevida	Sobrevida
22	23	Sepse Grave	Pulmão	Acinetobacter Klebsiella	2	3	HAS / IRC / LES	Sobrevida	Sobrevida
23	79	Sepse Grave	Pulmão	Cocos G(+)	2	4	AVC / RM	Morte	-

AVC: Acidente Vascular Cerebral; DAC: Doença Arterial Crônica; DM: Diabetes Melito; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; ICC: Insuficiência Arterial crônica; ICO: Insuficiência Coronariana; IRC: Insuficiência Renal Crônica; ITU: Infecção do Trato Urinário; LES: Lupus Eritematoso Sistêmico; TX Renal: Transplante Renal.

Anexo 3 : Características clínicas e epidemiologia dos pacientes sépticos (2 de 2)

Paciente	Idade	Estádio	Foco infeccioso	Culturas	Número de disfunções	SOFA D1	Comorbidades	Morte / sobrevida 28 dias	Morte / sobrevida hospitalar
24	75	Choque	Abdome agudo obstrutivo	-	3	9	HAS / DM / ICC	Sobrevida	Morte
25	46	Choque	Abdome agudo perforativo	-	4	8	-	Sobrevida	Sobrevida
26	60	Choque	ITU / Empiema vesicular	-	4	6	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte
27	67	Choque	Sangue	Pseudomonas	3	4	HAS / DM / DAC	Sobrevida	Morte
28	30	Choque	Pulmão / ITU	Enterococo (urina)	2	6		Sobrevida	Sobrevida
29	72	Choque	Abdome	-	2	7	HAS / IRC	Morte	
30	20	Choque	Pulmão		2	4	-	Sobrevida	
31	40	Choque	Sangue / Pulmão	Pseudomonas (LBA/sangue)	4	9	AVC	Sobrevida	Sobrevida
32	82	Choque	Sangue / Pulmão	E.coli (urina) S. aureus (sangue) Providência (traqueal)	4	11	HAS / DM / ICO / ICC	Morte	
33	72	Choque	Sangue/Pele		5	12	Cirrose Hepática	Morte	
34	52	Choque	Pulmão	-	3	7	HAS / DM / IRC	Morte	
35	87	Choque	Pulmão	S.coagulase (sangue) Pseudomonas e Proteus (secretraqueal)	5	13	HAS / IRC	Morte	
36	48	Choque	Pulmão	-	6	16			
37	59	Choque							
38		Choque	Pulmão	Enterobacter Acinetobacter (secretraqueal)	5	13	HAS / DPOC	Morte	

ANEXO 4

Tabela: Concentração plasmática de β_2 GPI em indivíduos normocolesterolêmicos.

Fonte	Metodologia	β_2 GPI Sérica ($\mu\text{g/mL}$) *
Brighton et al., Br.J.Haematol., 1996	ELISA	186 $\pm$ 48
Arvieux et al., Thromb.Hemostasis,1996	ELISA	198 $\pm$ 55
Balasubramanian & Schroit Thromb., Res., 1998	ELISA	271 $\pm$ 122
Horbach, et al., Thromb.Hemostasis,1998	ELISA	142 $\pm$ 30
		164 $\pm$ 58
Biasiolo et al., Lupus, 1999	RID	210
Yasuda et al., Atherosclerosis, 2000	ELISA	236 $\pm$ 104
Gomes et al. Antiox. Redox Signaling, 2004	ELISA	243 $\pm$ 116

*média $\pm$ desvio padrão