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

Proteínas de fase aguda em exsudatos:
acesso da HDL ao foco inflamatório

Alessandra Miyuki Okino

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ana Campa

São Paulo
2003

Alessandra Miyuki Okino

Proteínas de fase aguda em exsudatos: acesso da HDL ao
foco inflamatório

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dr^a Ana Campa
Orientadora/Presidente

Prof^a Dr^a Leila Antonangelo
1^a. examinadora

Prof^a Dr^a Rosário Dominguez Crespo Hirata
2^a. examinadora

São Paulo, 17 de setembro de 2003.

*Pois Deus amou tanto o mundo, que deu
Seu Filho Único, para que todo o que crer
nele não morra, mas tenha a vida eterna.
Porque Deus não mandou o seu Filho ao
mundo para condenar o mundo, mas para
que o mundo seja salvo por Ele.*

(João 3, 16-17)

À Deus,
Nosso Pai maior.

Aos meus pais Motomu e Julia,
Pelo constante apoio e incentivo,
inesgotáveis fonte de
amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Ana Campa pela brilhante orientação, confiança, paciência e exemplo de caráter, profissionalismo e dedicação em que me espelho, o meu mais profundo e sincero reconhecimento.

Aos meus irmãos Cláudio e Arnaldo, cunhadas Renata e Áurea e minha sobrinha Giovanna pela “força” e incentivo em todos os momentos.

Às Prof^{as} Primavera Borelli, Edna Maria Vissoci Reiche e Leda Mezzaroba que não pouparam esforços e viabilizaram o Mestrado Interinstitucional perante o convênio entre a Universidade de São Paulo e a Universidade Estadual de Londrina.

Aos colegas do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina que auxiliaram durante o meu período de ausência da universidade.

Aos docentes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP e os professores convidados Adhemar Longatto Filho e Roxane Maria Fontes Piazza, que se dispuseram a deslocar de suas residências para ministrarem as aulas em Londrina.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica da Universidade de São Paulo Alziana Pedrosa, Cristiani Bürger, Elaine Hatanaka, Maria Rita Rodrigues, Sabrina Okada , Sueli de Oliveira e Valdecir meu carinho muito especial.

Aos colegas Egídio, Emerson, Helena, Ingridt, Jair “Rancha”, Maria Emilia, Regina, Sandra e Sirlei, pelas lições de amizade demonstradas durante o curso.

Meu carinho especial aos amigos Rancheira, Emerson e Emília, companheiros do nosso “Big Brother”.

Ao Prof. Décio Sabbatini Barbosa pela amizade e auxílio prestado.

À secretária Ana Dantas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP; Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima, funcionários da Secretaria de Pós Graduação da FCF/USP e Marina Campos, do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia do CCS/UEL que muito nos ajudaram na parte administrativa do Mestrado Interinstitucional

Aos pacientes que concordaram em participar deste trabalho, compreendendo a importância da realização de pesquisas no nosso país.

Aos amigos Dalva C. Antunes, Luciano da Silveira, Elizabeth M. Hayashi e Valderi Dias, funcionários do Laboratório de Análise Clínicas do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, pelo auxílio técnico e amizade.

Às minhas estagiárias Aline Piacenti, Paula Mendes Silva e Denise Mayumi pelo auxílio prestado e dedicação que demonstraram durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Jefferson R. Cardoso e Edson L. Lavado, do Departamento de Fisioterapia, CCS/UEL, pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados apresentados neste trabalho.

Às amigas Luciana Meneghelli e Renata Soriani que me receberam de braços abertos durante as minhas estadas em São Paulo.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 PROCESSO DE FASE AGUDA	4
2.2 LIPOPROTEÍNAS	6
2.2.1 Quilomicrons	6
2.2.2 VLDL	7
2.2.3 LDL	7
2.2.4 HDL	8
2.3 AMILÓIDE SÉRICA A	9
2.4 PROTEÍNA C REATIVA	12
2.5 EFUSÃO PLEURAL E EFUSÃO ASCÍTICA	14
3. OBJETIVOS	18
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	
4.1 CASUÍSTICA	19
4.2 AMOSTRAS DE LÍQUIDO	19
4.3 AMOSTRAS DE SORO	20
4.4 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	20
4.5 ANÁLISES LABORATORIAIS	
4.5.1 Doseamento de Proteína C Reativa	20
4.5.2 Doseamento de Amilóide Sérica A	21
4.5.3 Doseamento de Colesterol Total	21

4.5.4 Doseamento de Triacilgliceróis	22
4.5.5 Doseamento de Proteínas Totais	22
4.5.6 Doseamento de Apo AI, Apo AII e Apo B.....	23
4.5.7 Atividade enzimática da Desidrogenase Láctica.....	25
4.5.8 Análise Citológica dos Líquidos	25
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	43
ANEXOS	44
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparações de duas metodologias, nefelometria e turbidimetria, utilizadas para as dosagens de apo AI e apo B em soro e exsudato	24
Figura 2	Relação entre a SAA e a PCR nas amostras de soro de pacientes com exsudatos	30
Figura 3	Relação entre a apo AI e a apo AII nas amostras de soro de pacientes com exsudatos	31
Figura 4	Relação entre apo AI e a apo AII nas amostras de exsudato de pacientes	32
Figura 5	Relação de SAA no soro <i>versus</i> exsudato	33
Figura 6	Relação de PT no soro <i>versus</i> exsudato	33
Figura 7	Relação de apo AI/apo B no soro <i>versus</i> exsudato de 30 pacientes	35
Figura 8	Relação de apo AII/apo B no soro <i>versus</i> exsudato de 30 pacientes	35

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Valores descritivos dos parâmetros laboratoriais determinados nas amostras de soro e exsudatos	28
Tabela II	Valores descritivos das relações exsudato/soro para os parâmetros medidos	28
Tabela III	Coeficiente de correlação de Spearman para as dosagens realizadas nas amostras de soro	30
Tabela IV	Coeficiente de correlação de Spearman entre as dosagens realizadas nas amostras de exsudato	31
Tabela V	Coeficiente de correlação de Spearman entre as dosagens realizadas no soro e no exsudato	32
Tabela VI	Análise descritiva das relações entre lipoproteínas no soro e exsudato	34
Tabela VII	Coeficiente de correlação das relações das apolipoproteínas no soro e exsudato	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Proteína amilóide A
AP-1	Proteína ativadora 1
Apo AI	Apolipoproteína AI
Apo AII	Apolipoproteína AII
Apo AIV	Apolipoproteína AIV
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C	Apolipoproteína C
Apo D	Apolipoproteína D
Apo E	Apolipoproteína E
Apo J	Apolipoproteína J
Ca ²⁺	Cálcio
CGP	Cocos gram positivos
CT	Colesterol total
DEA-HCl/AAP	N,N-dietilanilina-HCl/4-aminoantipirina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E	Exsudato
ECM	Matriz extracelular
EP	Erro padrão
fMLP	N-formil-metionina-leucina-fenilalanina
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HPO	Peroxidase de rábano
I-κB	Inibidor do fator nuclear κB
ICAM 1	Molécula de adesão intracelular 1
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-1Ra	Receptor antagonista da interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF- κ B	Fator nuclear κ B
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Proteína C reativa
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMA	Acetato de forbol miristato
PT	Proteínas totais
QL	Quilomicron
r _s	Coeficiente de correlação de Spearman
rSAA	Amilóide sérica A recombinante
S	Soro
SAA	Amilóide sérica A
sTNFr-II	Receptor solúvel tipo II para TNF- α
TG	Triacilgliceróis
TMB	Tetra metil benzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A fase aguda é caracterizada pela mudança significativa nos níveis de várias proteínas plasmáticas. As proteínas amilóide sérica A (SAA) e proteína C reativa (PCR), chamadas de proteínas de fase aguda positivas, têm sua concentração plasmática aumentada em até 1000 vezes durante a inflamação. Espera-se que estas proteínas exerçam um papel importante em algumas etapas do processo inflamatório. Para a PCR existem sólidas evidências de sua participação na ativação do sistema complemento, entretanto para a SAA, a função biológica ainda está para ser esclarecida. No plasma, a SAA encontra-se ligada à lipoproteína de densidade alta (HDL), especialmente a fração HDL₃. A SAA associa-se à HDL₃ através do deslocamento das apolipoproteínas, preferencialmente a AI e pouco a AII. Neste trabalho nos propusemos a avaliar a eficiência da passagem de SAA sérica para os focos inflamatórios. Para este fim doseamos, em 20 exsudatos pleurais e 10 exsudatos ascíticos, e respectivos soros, os seguintes parâmetros: proteínas totais (PT), SAA, PCR, apolipoproteína AI, AII, B, colesterol total (CT) e triacilgliceróis (TG). As relações exsudato/soro encontrados para estes parâmetros foram: SAA, $0,11 \pm 0,14$; PCR $0,31 \pm 0,20$; AI, $0,48 \pm 0,26$; AII, $0,63 \pm 0,29$; B, $0,46 \pm 0,19$; PT, $0,67 \pm 0,18$; CT, $0,34 \pm 0,21$; TG, $0,36 \pm 0,22$. Observamos uma forte correlação entre os níveis séricos de PCR *versus* SAA e entre AI *versus* AII. Para o exsudato foi mantida a correlação forte somente entre AI *versus* AII. Nas correlações entre exsudato e soro observamos correlações moderadas apenas para SAA, AII e PT. Em função dos nossos resultados, concluímos que a proteína de fase aguda SAA tem acesso ao foco inflamatório e que o conteúdo desta proteína em exsudatos é, pelo menos em sua maioria, originário do soro. A julgar pelos níveis de apo AII encontrados nos exsudatos, a permeabilidade das membranas que recobrem as cavidades pleurais e ascíticas é maior para HDL₃ do que para HDL₂ e LDL, fato este que garante uma passagem eficiente de SAA para as cavidades. A SAA que tem acesso à cavidade deve sofrer extensa proteólise e/ou associar-se eficientemente às células pois a relação de concentrações exsudato/soro encontrada para SAA é menor que para as demais proteínas analisadas.

ABSTRACT

Inflammation is characterized by profound changes in the serum levels of acute phase proteins. The huge increase (up to a 1000 fold) in protein serum amyloid A (SAA) and C reactive protein (CRP) suggests that both proteins exert an important role in the inflammatory process. Although it is known the participation of CRP in the activation of the complement complex, the biological role of SAA is not clear yet. In plasma, SAA is associated to the high density lipoprotein (HDL), especially the HDL₃ fraction. The association of SAA to HDL₃ causes the displacement of the apolipoproteins A-II and, especially, A-I. The goal of this study was to evaluate the efficiency of the SAA passage from serum to the inflammatory focus. With this purpose we determined total protein (TP), SAA, PCR, A-I, A-II, apolipoprotein B (B), total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in 20 samples of pleural exudates and 10 samples of ascitic exudates, and respective serum samples. The ratio exudate/serum found were: SAA, $0,11\pm0,14$; CRP $0,31\pm0,20$; A-I, $0,48\pm0,26$; A-II, $0,63\pm0,29$; B, $0,46\pm0,19$; TP, $0,67\pm0,18$; TC, $0,34\pm0,21$; TG, $0,36\pm0,22$. There was a high correlation of the serum levels of CRP versus SAA and AI versus A-II. A high correlation in the exudate was only found for AI versus A-II. The correlation between exudate and serum were moderate and were found only for SAA, A-II and TP. In conclusion we observed that SAA has access to the exudate and that the content of SAA in the exudate is mainly originated from serum. Considering the levels of A-II found in the exudates, we supposed that the permeability of the membranes that cover the pleural and ascitic cavities is higher for HDL₃ than for HDL₂ and LDL. SAA in the inflamed pleural cavity might suffer an extensive proteolysis and/or efficient association to cells because the ratio exudate/serum found for SAA was lower than for other proteins.

1. INTRODUÇÃO

Efusões são ultrafiltrados do soro em cavidades corpóreas presentes em diversas condições patológicas. A definição da composição da efusão é uma ferramenta importante para a distinção de transudatos e exsudatos e auxílio diagnóstico. A passagem de proteínas e outras macromoléculas para a cavidade dependerá da permeabilidade da membrana que recobre essa cavidade e, portanto, definirá diferentes composições para as mesmas (LIGHT, 1997). O transudato ocorre quando há um fator mecânico influenciando na formação e reabsorção do líquido, enquanto que o exsudato resulta de uma inflamação ou outra desordem. (LIGHT et al., 1972).

Durante a inflamação ou infecção ocorrem alterações no metabolismo, conhecidas como resposta de fase aguda. Esta resposta induz a mudanças nas concentrações de algumas proteínas plasmáticas específicas que poderiam proteger o hospedeiro de danos, facilitar o processo de reparo ou ainda, alimentar o processo inflamatório. Se as mudanças metabólicas presentes no processo agudo perdurarem por um tempo prolongado pode haver dano ao hospedeiro, como por exemplo o desenvolvimento de amiloidose secundária (GABAY, KUSHNER, 1999).

Nas infecções e inflamações podem ocorrer alterações no metabolismo de lipoproteínas e produzir uma variedade de mudanças nas concentrações plasmáticas de lipídeos e lipoproteínas (HARDARDÓTTIR, GRÜNFELD e FEINGOLD, 1994). Além da participação efetiva no metabolismo de lipídeos, as lipoproteínas plasmáticas e suas apolipoproteínas modulam diversos fenômenos importantes, especialmente na resposta imune. Como exemplo, podemos citar a supressão da imortalização de linfócitos B induzida por Epstein-Barr (CHISARI; CURTISS e JENSEN, 1981), a supressão e produção de interferon γ em monócitos (KASISCHE; KEANE, 1991), a inibição da lise celular iniciada pelo sistema complemento (ROSENFELD; PACKMAN e LEDDY, 1983), o aumento da

expressão da atividade pró-coagulante em células mononucleares (SCHAWRTZ et al., 1981), além de efeitos na quimiotaxia, migração celular e fagocitose de neutrófilos (JARSTRAND et al., 1990).

A relação entre lipoproteínas e processo inflamatório pode ser facilmente verificada pelas extensas modificações na concentração plasmática de colesterol, triacilgliceróis e apolipoproteínas durante os mais variados processos inflamatórios e infecciosos (ALVAREZ; RAMOS, 1986; SAMMALKORPI et al., 1988; CABANA; SIEGEL e SABESIN, 1989). Dentre as lipoproteínas, a lipoproteína de densidade alta (HDL) parece estar intimamente envolvida na inflamação. Assim que o processo inflamatório tem início, acontecem inúmeras alterações no perfil de síntese hepática, que passa a sintetizar e liberar grandes quantidades de proteínas de fase aguda. Destas, duas proteínas destacam-se, a amiloide sérica A (SAA) e a proteína C reativa (PCR) pois apresentam um aumento significativo. A SAA rapidamente associa-se à HDL e passa a circular na forma de uma apolipoproteína, a apo SAA. Esta associação causa o deslocamento da apo AI, que é rapidamente removida da circulação (COETZEE et al., 1986). Como resultado cria-se uma nova lipoproteína, bastante enriquecida de SAA e que recebe a denominação de HDL de fase aguda, que apresenta modificações estruturais e fisiológicas até o momento pouco elucidadas.

Na tentativa de se compreender o significado biológico da SAA, assim como a razão pelo qual associa-se à HDL, demonstrou-se que a SAA é capaz de induzir a migração de neutrófilos (BODOLATO et al., 1994), inibir a síntese de PGE_2 (SHANKIN-KESTENBAUM et al., 1991) e agir como indutora de collagenases (BRINCHERHOFF et al., 1989). Alguns dos efeitos atribuídos à SAA parece ser minimizados ou suprimidos quando esta encontra-se associada com a HDL. Curiosamente, também foi relatado que ambas as apolipoproteínas AI e SAA, quando livres da HDL, são capazes de se associarem aos neutrófilos (BLACKBURN et al., 1991; PRECIADO-PATT; PRAS e FRIDKIN, 1996).

A capacidade de neutrófilos produzirem citocinas só foi recentemente descrita e resultou numa nova compreensão do papel de

neutrófilos na resposta imune (KITA et al., 1991; LLOYD; OPPENHEM, 1992; FAVA et al., 1993; RE et al., 1993; MALYAK et al., 1994; CASSATELLA, 1995). Esta descoberta promoveu estes leucócitos a células chaves capazes de influenciar a direção e evolução do processo imune.

Nosso grupo descreveu que a SAA é um potente estímulo para a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-8 de neutrófilos humanos (FURLANETO; CAMPA, 2000). Este efeito não foi observado quando SAA estava associada à HDL. Esta descoberta acrescenta um dado de suma importância para o papel biológico da SAA assim como para a biologia do próprio neutrófilo. Outro trabalho desenvolvido pelo grupo relatou o efeito inibitório da apo AI e AII na liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-1Ra no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos (FURLANETO et al., 2002). Apesar da apo AI e apo AII não alterarem a liberação basal de citocinas, a apo AI inibe a liberação de IL-1 β por neutrófilos estimulados com LPS e a apo AII diminui a produção de IL-8 liberada por neutrófilos estimulados com apo-SAA. Com esses resultados, pode-se pensar que a função das lipoproteínas e apolipoproteínas humanas vão além do transporte e metabolismo lipídico (FURLANETO et al., 2002). A HDL pode ser uma classe de mediador que participa na regulação da atividade dos neutrófilos.

O papel das apolipoproteínas no processo inflamatório, dentre as quais a SAA é a de maior interesse, tem sido o foco principal de estudo do nosso grupo de pesquisa. Neste estudo verificamos a presença de apolipoproteínas em exsudatos pleurais e ascíticos com o intuito de determinarmos correlações entre PCR e SAA em exsudatos e avaliarmos o grau de contribuição da SAA sérica para o *pool* de SAA presente em exsudatos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO DE FASE AGUDA

A resposta de fase aguda representa uma reação complexa e inespecífica que pode ser desencadeada por uma variedade de agressões, como infecções bacterianas, virais ou parasitárias; trauma mecânico e crescimento maligno (KOJ, 1996). As seqüências de eventos envolvidos na resposta do organismo frente à fase aguda podem ser descrito como uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios que é caracterizada por efeito vascular local e sistêmico, sendo que as células comumente envolvidas nesta cascata são os macrófagos ou monócitos sanguíneos (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

A presença de uma material estranha ou lesão tecidual é estímulo para o início da resposta inflamatória pela ativação do sistema complemento, coagulação ou pela cascata de cininas. Múltiplos produtos dessas vias, incluindo C5a, trombina e bradicinina, alteram a permeabilidade vascular, atraem leucócitos e alteram a tonicidade vasomotora no local da lesão. Estes mediadores ativam a população local de macrófagos levando a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α e IL-1 β , assim como quimiocinas. Após a inicialização da resposta, um importante processo é a interação leucócito-célula endotelial (PARENT; EICHACKER, 1999; UHLAR; WHITEHEAD, 1999).

Célula endotelial e leucócitos são ativados por mediadores pró-inflamatórios. A ativação das células endoteliais leva a produção de quimiocinas assim como um aumento da adesão de moléculas na superfície endotelial. A resposta endotelial inicial é rápida e consiste na liberação da P-selectina e aumento da permeabilidade vascular. A resposta subsequente requer a transcrição de genes e resulta no aparecimento de E-selectina, molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e outras moléculas de adesão na superfície endotelial. O movimento de neutrófilos no interstício ocorre em 3 estágios: primeiro há a interação entre a P-selectina na célula endotelial e

da L-selectina nos leucócitos que deixam os leucócitos lentos e leva ao rolamento sobre a superfície endotelial. Isto é seguido por uma firme adesão entre neutrófilos e células mediadas por ICAM-1 na célula endotelial e por $\beta 2$ integrina CD11/CD18 nos leucócitos. A firme aderência é seguida de transmigração entre células endoteliais nos espaços intersticiais e alterações físicas nas junções celulares (CONE, 2001).

O processo intracelular com a participação de células é essencial para uma resposta efetiva. Para esta resposta celular é necessária a síntese de novas proteínas, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. A transcrição da seqüência de DNA das proteínas de fase aguda é regulada em vários estágios. Normalmente, fatores específicos controlam a taxa de transcrição do DNA através da ligação na região promotora do gene. Estes fatores regulam a taxa de transcrição e, portanto, a formação do mRNA e das proteínas (CONE, 2001). Um importante fator de transcrição na resposta inflamatória é o fator nuclear κB (NF- κB). Em células não ativadas o NF- κB é encontrado no citoplasma de células ligadas a um inibidor, o I- κB , que não permite a entrada do mesmo no núcleo. Em resposta a ativação, como por exemplo pelo TNF- α , o I- κB é fosforilado e degradado. Isto permite que o NF- κB entre no núcleo e faça a ligação com a região promotora do gene alvo, regulando a transcrição do número de genes importantes na resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997). Outra função do NF- κB seria em conjunto com outro fator de transcrição para genes inflamatórios, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear para IL-6 que podem amplificar a resposta inflamatória (BARNES; ADCOCK, 1993; SAATCIOGLU; CLARET e KARIN, 1994).

Além de citocinas e quimiocinas, outros mediadores inflamatórios são os glicocorticóides e fatores de crescimento. Glicocorticóides podem estimular a expressão de algumas proteínas de fase aguda, entretanto normalmente atuam aumentando a indução transcricional direcionado para citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (UHLAR; WHITEHEAD, 1999).

Durante a resposta de fase aguda há a síntese hepática de várias proteínas, denominadas de proteínas de fase aguda, as quais são

importantes para o sistema de defesa do organismo (JENSEN; WHITEHEAD, 1998). A proteína amilóide sérica A e a proteína C reativa são as proteínas que apresentam o aumento mais relevante durante o processo agudo, podendo elevar até 1000 vezes (STEEL; WHITEHEAD, 1994). Há a presença de outras proteínas envolvidas na fase aguda, porém possuem aumento menos significativo, que podem atingir até 3 vezes dos valores basais, como por exemplo o sistema complemento, fatores da coagulação, α_1 -antitripsina, α_1 -antiplasmina, α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina e ferritina. Albumina, pré-albumina, transferrina, apolipoproteína AI e AII são consideradas proteínas de fase aguda negativas, pois seus níveis séricos decaem durante o processo agudo (STEEL; WHITEHEAD, 1994).

2.2 LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídeos e de proteínas, como as apolipoproteínas. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas que podem ser identificadas com base nas características físicas e químicas. Os complexos de lipoproteínas possuem diferentes proporções de lipídeos e proteínas; sendo que podem ser separados por ultracentrifugação baseados na sua densidade e classificando-se em quilomicrons (QL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL).

2.2.1 QUILOMICRONS

Os quilomicrons (QL) são partículas grandes produzidas pelo intestino, sendo composta de 85 a 95 % de triacilgliceróis e é pobre em colesterol livre e fosfolipídeos (1 a 2%). As apolipoproteínas que fazem parte desta partícula são as apos B48, AI, AII, C e E. A interação dos QL com a

lipase lipoprotéica resulta em uma partícula menor, com menos triacilgliceróis e alguns elementos de superfície, chamada remanescente de QL (BACHORIK, LEVY e RIFKIND, 1995; COTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

2.2.2 VLDL

As partículas de VLDL são menores do que os QL e contém, aproximadamente, 52% de triacilgliceróis, 18% de fosfolípidos e 8% de proteínas. Quanto maior for o tamanho da VLDL, maior será a proporção de triacilgliceróis e de apo C e menor de fosfolípidos e apo B. A apo B, principalmente a B100, e apo C são as apolipoproteínas mais abundantes na partícula de VLDL (BACHORIK, LEVY e RIFKIND, 1995; COTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

2.2.3 LDL

A LDL é composta por um núcleo hidrofóbico de lípidos neutros, ésteres de colesterol e triacilgliceróis circundados por uma monocamada de fosfolípidos hidrofílicos, principalmente esfingomielina (25%) e fosfatidilcolina (66%). As partículas de LDL contêm, aproximadamente, 80% de lípidos e 20% de proteínas. Devido ao seu conteúdo de proteínas, as LDL são menores (21 a 25 nm) e mais densas (d 1.006 a 1.063 g/mL) em comparação com a VLDL e o QL (BACHORIK, LEVY e RIFKIND, 1995; COTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

A apo B100 é a principal apolipoproteína da partícula de LDL e representa 90 a 95% da apo B plasmática total. Esta proteína situa-se em aproximadamente 30% da superfície da partícula e pode estender-se até o núcleo. A função fisiológica normal da LDL de transportar o colesterol para as células periféricas via receptor é dependente do reconhecimento da apo B pelo receptor da LDL. Há evidências de que alterações na composição

lipídica e mobilidade da membrana celular podem influenciar na capacidade do receptor ligar-se à LDL (MURPHY et al., 2000).

2.2.4 HDL

HDL é a menor (diâmetro de 7,0 a 12 nm) e mais densa (d 1.063 a 1.25 g/mL) de todas as lipoproteínas plasmáticas. Consiste de um núcleo hidrofóbico, principalmente éster de colesterol e uma pequena quantidade de triacilgliceróis e colesterol não esterificado, circundado por uma camada de fosfolídeos (principalmente fosfatidilcolina), colesterol não esterificado e apolipoproteínas. As principais apolipoproteínas da HDL são a apo AI e apo AII, mas na superfície desta lipoproteína também existem outras apolipoproteínas tais como a apo AIV, apo V (PENNACCHIO et al., 2001), apo C, apo D, apo E e apo J (DUCHATEAU et al., 1997; RYE; CLAY e BARTER, 1999).

O tamanho e a densidade da HDL podem variar devido à composição de lipídeos e apolipoproteínas (RYE; CLAY e BARTER, 1999). O plasma humano possui duas importantes subpopulações de HDL em relação à presença das apolipoproteínas (CHEUNG; ALBERS, 1982). Uma subpopulação de HDL possui apo AI, mas não tem apo AII, chamada de AI HDL, enquanto que outra tem apo AI e apo AII e assim denominada AI/AII HDL (CHEUNG; ALBERS, 1982; CHEUNG; ALBERS, 1984). A apo AI é distribuída semelhantemente entre a AI HDL e AI/AII HDL, enquanto que 90% da apo AII encontra-se na AI/AII HDL (CHEUNG; ALBERS, 1982; BEKAERT et al., 1992). A HDL também pode ser subdividida pela sua densidade, caracterizando duas subclasses importantes: HDL₂ (d 1.063 a 1.125 g/mL), HDL₃ (d 1.125 a 1.210 g/mL) e uma subfração de menor importância, a VHDL (d 1.21 a 1.25 g/mL) (BARTER et al., 2003). HDL₂ tem massa molecular de 360 kDa e é composta de 60% de lipídeos e 40% de proteína e a massa molecular da HDL₃ é de 175 kDa, sendo que 55% é atribuída às apolipoproteínas (SHAEFER; EISENBERG e LEVY, 1978). A

maioria da AI/AII HDL são encontrados na HDL₃, enquanto que a AI HDL são componentes proeminentes tanto da HDL₂ quanto da HDL₃ (CHEUNG; ALBERS, 1982).

Durante o processo de fase aguda ocorrem mudanças na estrutura e metabolismo da HDL. A consequência biológica desta alteração ainda é desconhecida. A alteração mais significativa, a substituição da apo AI pela SAA, é verificada principalmente na partícula de HDL₃ e passa a ser denominado de HDL de fase aguda (SHEPARD et al., 1987). A partícula de HDL₃ possui aproximadamente 68% de apo AI e 32 % de apo AII, incluindo outras apolipoproteínas em menor quantidade. Durante o processo agudo, a proporção de proteínas é modificada para 56% de apo AI, 17% apo AII e 27% apo SAA (PRUZANSKI et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que a partícula de HDL₃ associada com SAA apresenta-se como uma partícula maior, porém não ocorre alteração na densidade na partícula (CLIFTON, MACKINNON e BARTER, 1985).

2.3 AMILÓIDE SÉRICA A (SAA)

As SAA são pequenas apolipoproteínas (12 kD) encontradas em baixas concentrações (1 a 10 μ g/mL) na circulação (JARSTRAND et al., 1990), mas que durante o processo agudo podem ter sua concentração aumentada em até 1000 vezes (ALVAREZ; RAMOS, 1986; STEEL; WHITEHEAD, 1994; URIELI-SHOVAL; LINKE e MATZNER, 2000). Em doenças inflamatórias crônicas, a SAA é um precursor circulante da proteína amilóide A (AA) que é um importante componente da amiloidose secundária, afetando baço, fígado e rins (CUNNANE; WHITEHEAD, 1999).

SAA é um termo genérico para uma família de proteínas polimórficas, codificadas por diferentes genes com alta variação alélica e alto grau de homologia entre as espécies (MALLE; STEINMETZ e RAYBES, 1993; UHLAR et al., 1994). Em humanos os genes relacionados a SAA estão situados no braço curto do cromossomo 11; este contém dois genes

homólogos, SAA_1 e SAA_2 e dois genes pouco relacionados, SAA_3 e SAA_4 (SELLAR et al., 1994; WATSON; SEE e WOO, 1994). Os genes SAA_1 e SAA_2 são predominantes no processo de fase aguda e são denominados de “genes da fase aguda” ou A-SAA. O gene SAA_3 aparentemente não é expresso, enquanto que o gene SAA_4 é pobremente induzido durante o processo de fase aguda (URIELI-SHOVAL; LINKE e MATZNER, 2000).

Apesar do fígado ser o principal órgão de síntese da SAA, recentemente tem sido demonstrada a produção desta proteína em diversos tecidos. O mRNA da SAA e a expressão da proteína foi demonstrada em tecidos extra-hepáticos de camundongos e *hamster*, principalmente por células epiteliais e macrófagos (RAMADORI et al., 1985; MEEK et al., 1989; HARDARDOTTIR et al., 1997). Estudos adicionais revelaram a expressão de SAA em células humanas presentes na lesão aterosclerótica (MEEK et al., 1994), células endoteliais, células do músculo liso (URIELI-SHOVAL; LINKE e MATZNER, 2000) e linhagem de células monocíticas (URIELI-SHOVAL et al., 1994).

Durante o processo de fase aguda, a SAA liga-se à HDL, principalmente a partícula HDL_3 , e passa a compor até 70% do total de proteínas desta lipoproteína. Desta forma a SAA passa a ser a apolipoproteína predominante, sendo que a interação entre SAA e HDL ocorre pelo deslocamento e substituição da apo A1. Esta alteração estrutural acarreta uma diminuição do transporte preferencial da HDL-SAA ao fígado (KISILEVSKY; SUBRAHMANYAN, 1992, CUNNANE e WHITEHEAD, 1999) e comprometimento do transporte reverso do colesterol que, indiretamente, pode contribuir para o processo de aterogênese (STEINMETZ et al., 1989; ARTL et al., 2000).

Citocinas inflamatórias como $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$ são potentes indutores para a síntese de SAA pelos hepatócitos, assim como pelos macrófagos e células epiteliais (SAMMALKORPI et al., 1988; JENSEN; WHITEHEAD, 1998; URIELI-SHOVAL; LINKE e MATZNER, 2000; HE; SANG e YE, 2003). Existem evidências de que a SAA possui atividade semelhante às citocinas e são capazes de induzir a produção de

metaloproteinases (MMPs), citocinas como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e receptores de citocinas como o receptor antagonista para interleucina-1 (IL-1ra) e receptor solúvel tipo II para $\text{TNF}\alpha$ (sTNFr-II) (PATEL et al., 1998; HE; SANG, YE, 2003).

Diversos efeitos biológicos têm sido definidos para apo SAA desde sua descoberta. Em camundongos, SAA inibe a febre induzida por $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$ e *in vitro* inibe a síntese de PGE_2 (SHAINKIN-KESTENBAUM et al., 1991). Em linfócitos humanos, SAA previamente incubada com a matriz extracelular (ECM) aumenta a liberação de $\text{TNF}\alpha$ de maneira dose dependente (PRECIADO-PATT et al., 1998). A SAA também age como um indutor das collagenases (BRINCHERHOFF et al., 1989).

Outros efeitos biológicos da SAA têm sido estudados através da utilização da proteína SAA recombinante (rSAA). Esta proteína possui homologia com a SAA_1 humana com a substituição de dois aminoácidos (ácido aspártico na posição 60 e arginina na 7). O aumento da afinidade da HDL por linfócitos humanos promovido por rSAA e alguns de seus peptídeos levou alguns autores a sugerirem que a apo SAA poderia afetar a adesão de neutrófilos à células do endotélio e desta forma interferir no processo inflamatório (PRECIADO-PATT et al., 1996). Além disso, a SAA parece inibir o *burst* oxidativo de neutrófilos ativados por N-formil-metionina-leucina-fenilalanina (fMLP) (LINKE et al., 1991) e não têm efeito no *burst* induzido por PMA ou altas concentrações de proteínas opsonizadas (HATANAKA; RIBEIRO e CAMPA, 2003). Outros efeitos testados incluem a indução da adesão e quimiotaxia de monócitos e neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro* (BADOLATO et al., 1994; PRECIADO-PATT; PRAS e FRIDKIN, 1996), assim como a migração de células T indicando o recrutamento dos linfócitos T por SAA. Nosso grupo verificou que a SAA é capaz de induzir o *priming* de neutrófilos em resposta a partículas opsonizadas (HATANAKA; RIBEIRO e CAMPA, 2003). Das análises estudadas, parece predominar uma ação pró-inflamatória que poderia *in vivo* influenciar na progressão do processo inflamatório (FURLANETO et al., 2002). Cabe ressaltar que enquanto a apo SAA mostra efeitos sobre a resposta imune o mesmo não é observado

quando associada à HDL (BADOLATO et al., 1994). Este achado pode ser claramente observado pelos diferentes efeitos entre SAA livre e SAA ligados à HDL sobre a liberação de citocinas.

SAA é um potente estímulo para a liberação de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-8 de neutrófilos humanos, entretanto, este efeito não é observado quando a SAA está associada à HDL (FURLANETO; CAMPA, 2000). Curiosamente, as apolipoproteínas AI e AII, presentes na HDL, quando livres inibem a liberação de citocinas induzidas por SAA em neutrófilos (FURLANETO et al., 2002). Estes resultados nos leva a pensar que a função das lipoproteínas e apolipoproteínas humanas vão muito além do transporte e metabolismo lipídico. A HDL pode ser uma classe de mediador que participaria, por exemplo, na regulação da atividade dos neutrófilos.

2.4 PROTEÍNA C REATIVA (PCR)

Em 1930, William S. Tillet e Thomas Francis (TILLET, FRANCIS, 1930) descobriram a PCR em sangue de pacientes com infecção aguda por pneumococos. Esta proteína reage com o polissacarídeo C do *Streptococcus pneumoniae* e foi detectado em altas concentrações no soro desde o início da infecção. Originalmente foi chamado de substância C reativa, e que, posteriormente, passou a ser denominada de proteína C reativa (TILLET, FRANCIS, 1930; DU, 1989; PEPYS et al., 1994).

Estruturalmente, a PCR é uma proteína com cinco subunidades idênticas agregadas numa forma pentamérica por ligações não covalentes entre as subunidades. Cada subunidade consiste de 206 aminoácidos em uma cadeia polipeptídica simples, possuindo peso molecular total de aproximadamente 23 kDa (VOLANAKIS, 2001; ABLIJ, MEINDERS, 2002). Cada subunidade é capaz de ligar-se a duas moléculas de íons cálcio sendo que a ligação mais forte é com a fosfatidilcolina (PC), um constituinte da membrana celular, também presente na parede bacteriana (THOMPSON, PEPYS e WOOD, 1999).

A PCR é sintetizada principalmente no fígado (TAYLOR, KU e MORTENSEN, 1981; VIRGUSHIN, PEPYS e HAWKINS, 1993), sendo que durante a fase aguda, a concentração plasmática pode aumentar até 1000 vezes em 24 a 48 horas, retornando a baixas concentrações quando não há mais o estímulo (VOLANAKIS, 2001). O gene da PCR humano encontra-se no braço longo do cromossomo 1. A IL-6 é a principal indutora do gene da PCR, enquanto que a IL-1 β , glicocorticóides, complemento e outros fatores atuam sinergicamente com a IL-6 para que haja o aumento da regulação transcricional (TONIATTI et al., 1990; SZALAI et al., 2000). Em condições fisiológicas a PCR é sintetizada em baixas concentrações e é armazenada no retículo endoplasmático (MACINTYRE, et al., 1994). O mecanismo pós-transcricional possui função importante para com os níveis séricos de PCR. Após estímulo, há uma maior secreção da proteína armazenada no retículo endoplasmático, explicando o rápido aumento de sua concentração (ABLIJ, MEINDERS, 2002).

A principal função biológica da PCR é determinada pela capacidade de reconhecer o patógeno e células danificadas do hospedeiro e mediar sua eliminação ativando o sistema complemento e células fagocíticas. A PC, o principal ligante da PCR, é amplamente distribuído no ácido teicóico, carboidrato capsular e lipopolissacarídeo de bactérias e outros microrganismos (VOLANAKIS, 2001).

A ligação cálcio dependente da PCR com a PC, resulta na formação do complexo PCR-Ca²⁺-PC. Este complexo é reconhecido pelo C1q que leva a formação do C3 convertase e assim a ativação da via clássica do sistema complemento (WOLBINK et al., 1996). A partir deste processo ocorre a opsonização e fagocitose do microrganismo que contem PC (ABLIJ, MEINDERS, 2002). As propriedades de opsonização da PCR é demonstrado tanto em monócitos como em neutrófilos. Recentemente foi demonstrado que a fagocitose de partículas de PCR opsonizadas por monócitos e neutrófilos ocorrem através do Fc γ RI (MOLD, GRESHAM e DUCLOS, 2001). Outra importante função biológica da PCR é a capacidade do complexo PCR ligante ligar-se aos receptores Fc para IgG (Fc γ RI e Fc γ RIIa).

Esta ligação ativa as células fagocíticas aumentando a fagocitose de microrganismos e de células mortas ou danificadas (GEWURZ, ZHANG e LINT, 1995).

A princípio foi demonstrado que a PCR ligava-se ao receptor da IgG, o Fc γ RI, com alta afinidade em células mononucleares e em células geneticamente modificadas que hiperexpressam esse receptor (CROWELL et al., 1991; MARNELL et al., 1995). Mais recentemente, experimentos utilizando cDNA do Fc γ RIIa e estudos paralelos em linhagem de monócitos que expressam este receptor demonstraram que este é o principal receptor para a PCR (BHARADWAJ et al., 1999). A PCR é uma das principais proteínas do sistema imune inata e eleva-se antes que haja o reconhecimento e liberação das imunoglobulinas. Conseqüentemente, a utilização dos receptores Fc γ R pelas pentraxinas (pentâmero da PCR) na imunidade adaptativa e inata pode ter conseqüências importantes no processo, apresentação e depuração de antígenos onde estas proteínas ligam-se (STEIN, MOLD e DU CLOS, 2000; MOLD, GRESHAM e DU CLOS, 2001).

2.5 EFUSÃO PLEURAL E EFUSÃO ASCÍTICO

As cavidades fechadas do organismo são revestidas por duas membranas conhecidas como serosas. Uma delas reveste a parede da cavidade (membrana parietal) e outra cobre os órgãos (membrana visceral). Tem o nome de seroso o líquido situado entre elas e que serve para lubrifica-las, já que as duas superfícies entram em contato durante o movimento. Normalmente sua quantidade é pequena, pois as velocidades de produção e de reabsorção são proporcionais (STRASINGER, 1998; KOBZIK, 1999).

A pleura consiste de uma camada de células mesoteliais de vários tamanhos e normalmente possui um aspecto brilhante e semitransparente. É mantida por uma rede de tecido conectivo e fibroelastina, linfáticos e vasos.

As células mesoteliais são ricas em microvilos que possuem a importante função de captar as glicoproteínas ricas em ácido hialurônico, cuja função é diminuir o atrito entre o pulmão e a parede torácica. A membrana parietal possui sistema circulatório, nervos sensoriais e células ricas em microvilos. Enquanto que na membrana visceral, a irrigação sanguínea se dá através da baixa pressão da circulação pulmonar, não há nervos sensoriais e as células apresentam um número reduzido de microvilos. As duas membranas são separadas por uma cavidade e são lubrificadas por 5 a 10 mL de fluido. Essa estrutura possibilita que o pulmão expanda, retraia e deforme com facilidade (CELLI, 1992; HASLETON, 1996).

O fluido pleural tem uma baixa concentração de proteínas e valores de pH e glicose similares aos valores sanguíneos; e primariamente é formado a partir da pleura parietal. A pleura parietal possui pressão hidrostática semelhante ao sistema circulatório, enquanto que a pleura visceral depende da circulação pulmonar e a pressão oncótica é semelhante para as duas (CELLI, 1992; STRASINGER, 1998). Efusão pleural é uma manifestação de agressão na pleura, que pode ser por uma infecção bacteriana ou presença de neoplasia na pleura, onde ocorrerá a alteração de pressão entre as pleuras (KOBZIK, 1999).

Classicamente as efusões são classificadas em transudato e exsudato. Por definição, o transudato ocorre devido a um distúrbio sistêmico que rompe o equilíbrio entre filtração e reabsorção, como as alterações na pressão hidrostática criadas pela insuficiência cardíaca congestiva ou pela síndrome nefrótica. A formação do exsudato é resultado de uma inflamação ou outra doença que altere a permeabilidade capilar da superfície pleural, como ocorre na tuberculose, pneumonia, pancreatite, infarto pulmonar e lupus eritematoso sistêmico (LIGHT et al., 1972; LIGHT, 1997). Portanto podemos dizer que transudatos são resultantes de um processo mecânico e que os exsudatos provêm de um processo inflamatório.

Os critérios estabelecidos por Light et al. (1972) para a diferenciação entre exsudato e transudato tem sido amplamente utilizado e são descritos como: [1] a relação dos valores de proteínas do líquido

pleural/soro deve ser maior que 0,5, [2] o valor de LDH no líquido pleural deve ser maior que 200 UI/L ou [3] a relação dos valores de LDH no líquido e plasmática maior que 0,6. Sendo que a presença de apenas um destes critérios caracteriza o líquido como exsudato.

O uso do critério de Light para a diferenciação de exsudato de transudato tem sido empregado como um primeiro passo para o estudo de efusão pleural de causa desconhecida. Entretanto uma definição mais precisa, rigorosa e inequívoca para exsudatos e transudatos ainda é necessária. Alguns autores citam outros parâmetros bioquímicos para a diferenciação entre exsudato e transudato, como por exemplo o nível de colesterol (HAMM et al., 1987; ROMERO, CANDELA e MARTÍN, 1993), ou como critério complementar o gradiente de albumina soro/efusão quando o paciente estiver recebendo diurético como terapia (ROTH, O'MEARA e CRAGUN, 1990; LIGHT, 1999) e que são de grande utilidade.

Muitos pesquisadores têm publicado outros parâmetros bioquímicos para a diferenciação de transudatos e exsudatos, com a justificativa de que o critério de Light possui alta sensibilidade, porém baixa especificidade (HAMM et al., 1987; ROTH, O'MEARA e CRAGUN, 1990; VALDÉS et al., 1991). Burgess, Maitz e Taljaardl (1995), Vives et al. (1996), Metintas et al. (1997), Romero et al. (2000) e Romero-Candeira et al. (2002) estudaram a sensibilidade e especificidade do critério de Light através de inclusão de novas análises bioquímicas como colesterol, gradiente de albumina soro/efusão, bilirrubina, fosfatase alcalina, creatina kinase, ácido úrico e prováveis mudanças de *cut off* dos testes, porém os autores concluíram que o critério proposto por Light et al. (1972) ainda é o melhor método para a distinção do exsudato de transudato.

O peritônio é uma membrana mesotelial contínua que recobre a cavidade abdominal e contém as vísceras. A superfície peritoneal, uma membrana semipermeável, permite a difusão passiva de água e solutos entre a cavidade abdominal e os canais vasculares subperitoneal. Em geral, água e solutos de moléculas com peso molecular menor que 2 kDa são absorvidos da cavidade peritoneal através do sistema sanguíneo, enquanto

que moléculas maiores e partículas passam via linfático. A passagem das partículas da cavidade peritoneal para os linfáticos subdiafragmáticos é facilitada pela existência de descontinuidade que existe entre as células mesoteliais do peritônio e células endoteliais dos vasos linfáticos. A troca de fluido transperitoneal é importante nas peritonites, na qual o movimento do fluido na cavidade ascítica causada pelo aumento da permeabilidade vascular pode ser rápida e massiva, podendo levar a hipotensão e choque (BENDER, 1992; CRAWFORD, 1999). Segundo Bender (1992) e Paramothayan e Barron (2002), os critérios para diferenciar transudato de exsudato em fluido peritoneal são os mesmos utilizados em fluido pleural.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar a passagem da proteína amilóide sérica A e das apolipoproteínas AI, AII e B do soro para exsudatos inflamatórios.
- Definir quais as correlações existentes entre SAA, PCR, apo AI, apo AII, apo B e proteínas totais no soro e no exsudato.
- Estimar a contribuição dos processos de produção local e proteólise para a SAA no foco inflamatório a partir da análise de SAA, PCR, PT, CT, TG, AI, AII e B no soro e em exsudatos de pacientes.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em concordância com as normas éticas constantes na resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (HURNP) da Universidade Estadual de Londrina e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras somente foram utilizadas perante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou responsável.

4.1 CASUÍSTICA

Para o presente trabalho utilizamos pacientes hospitalizados no HURNP, com diagnóstico clínico indicativo de processo inflamatório que tiveram exsudatos pleurais ou ascíticos coletados. Os parâmetros de inclusão foram adultos de ambos os sexos, que apresentaram celularidade e dosagem de proteína C reativa sérica acima do valor de referência; sendo que este último foi utilizado como marcador de fase aguda da doença.

A distribuição do sexo foi de 66,7% masculino e 33,3% feminino e a média da idade dos pacientes foi 54,6 com erro padrão de 3,16 e desvio padrão de 17,33.

4.2 AMOSTRAS DE LÍQUIDO

As amostras de exsudatos foram coletadas pelo médico responsável e depois encaminhadas ao setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP para a realização dos exames bioquímicos e citológicos de rotina. Para a realização desta pesquisa foram utilizados 20 exsudatos pleurais e 10 ascíticos.

4.3 AMOSTRAS DE SORO

As amostras de soro foram obtidas através de punção venosa de pacientes que apresentaram exsudato. Foram utilizados para a coleta tubo seco ou com gel separador.

4.4 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de soro e exsudatos foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do soro e das células, respectivamente, aliquotadas em amostras de 1 mL e armazenadas em freezer à -70°C .

4.5 ANÁLISES LABORATORIAIS

Nas amostras de soro e exsudato foram realizados os doseamentos de PCR, SAA, colesterol total (CT), triacilgliceróis (TG), proteínas totais (PT), apo AI, apo AII, apo B, LDH e análise citológica dos líquidos. Os valores de referências das análises laboratoriais realizadas neste trabalho apresentam-se listados no Anexo 10.

4.5.1 DOSEAMENTO DE PROTEÍNA C REATIVA

A metodologia utilizada para a PCR foi a nefelometria, utilizando o aparelho Beringher Nephelometer 100 *Analyzer*. O reagente utilizado para essa determinação foi o *High Sensitivity CRP* da marca Dade Beringher. O reagente é composto por partículas de poliestireno revestida com anticorpo monoclonal contra a PCR, que na presença da mesma formam imunocomplexos. A intensidade da luz difusa no nefelômetro é diretamente proporcional a concentração da PCR nas amostras. O nefelômetro realiza

uma diluição inicial de 1:20 das amostras. A sensibilidade do teste apresenta-se entre o intervalo de aproximadamente 0,175 a 1100 mg/L.

4.5.2 DOSEAMENTO DE AMILÓIDE SÉRICA A

A dosagem de SAA foi realizada pelo método de Enzima Imunoensaio (ELISA) utilizando o kit comercial da marca Tridelta Phase™ range. O procedimento utilizado segue a descrição feita pelo fabricante. Brevemente, a placa de ELISA é sensibilizada com anticorpo monoclonal específico para SAA. Para as amostras foram realizadas as seguintes diluições, soro 1:500 e líquido 1:50. Enquanto que o padrão foi diluído conforme descrito no kit para a realização da curva de calibração. Colocaram-se 50µL de anticorpo monoclonal anti-SAA biotinilado em cada poço e depois foi adicionado 50µL de cada amostra diluída e dos padrões. Foram incubados por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa 4 vezes com tampão diluído e acrescentaram-se 100µL de estraptavidina-peroxidase. Após decorridos 30 min protegida da luz, a placa novamente foi lavada com tampão diluído e colocou-se 100µL de substrato TMB, incubada por mais 30 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Decorrido esse tempo, foi adicionada 50µL de solução *stop*. A absorbância foi lida em leitora de ELISA modelo SLT – Spectra, nos comprimentos de onda de 450 e 630nm.

4.5.3 DOSEAMENTO DE COLESTEROL TOTAL

A dosagem de colesterol total foi realizada pelo método enzimático no aparelho automatizado Dimension® Clinical Chemistry System, utilizando reativos da marca Dade Behring. A colesterol esterase catalisa a hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol livre que juntamente o com colesterol livre pré-existente, é oxidado a colest-4-eno-3-ona e peróxido de hidrogênio devido a uma reação catalisada pela colesterol oxidase. Na

presença de peroxidase de rábano (HPO), o peróxido de hidrogênio é utilizado para oxidar a N,N-dietilanilina-HCl/4-aminoantipirina (DEA-HCl/AAP) e produzir uma substância cromogênica que absorve luz em 540 nm. A absorbância da oxidação da DEA-HCl/AAP é diretamente proporcional à concentração de colesterol total.

4.5.4 DOSEAMENTO DE TRIACILGLICERÓIS

A metodologia utilizada para a determinação de triglicérides foi por reação enzimática no aparelho automatizado Dimension® Clinical Chemistry System, utilizando reativos da marca Dade Behring. A reação enzimática baseia-se na pré-incubação da amostra com o reagente enzimático lipase que converte os triacilgliceróis em glicerol livre e ácidos graxos. O glicerol liberado é determinado enzimaticamente pela ação do glicerol desidrogenase e formação de NADH. A mudança na absorção em 340 nm, devido a formação do NADH é diretamente proporcional à concentração de glicerol e seus precursores na amostra. A leitura é realizada em dois comprimentos de onda (340, 380 nm).

4.5.5 DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS TOTAIS

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

4.5.6 DOSEAMENTO DE APO AI, APO AII E APO B

As quantificações de apo AI, apo AII e apo B nas amostras foram realizadas por nefelometria. As apolipoproteínas contidas no soro humano formam imunocomplexos com anticorpos específicos que podem dispersar a luz incidente. A intensidade da luz dispersa é dependente da concentração da apolipoproteína correspondente na amostra. O anti-soro contra a apo AI foi produzido através da imunização de coelhos com apo AI humana purificada. O anti-soro contra a apo AII foi produzido através da imunização de coelhos com apo AII humana purificada e o anti-soro contra a apo B foi produzido através da imunização de coelhos com LDL de soro humano. O aparelho utilizado foi o Beringher Nephelometer 100 Analyzer, com os reativos N Antiserum to Human-Apolipoprotein A-I, N Antiserum to Human-Apolipoprotein A-II e N Antiserum to Human-Apolipoprotein B da marca Dade Behring para apo AI, apo AII e apo B, respectivamente. A sensibilidade apresentada nos testes realizados foram $> 19,9$ para apo AI, $> 24,6$ para apo AII e $> 4,5$ para apo B.

Também foram realizados os doseamentos de apo AI e apo B por turbidimetria. A apo AI e a apo B foram realizadas utilizando-se o kit comercial Turbiquant da marca Dade Behring para o aparelho Behringer Turbitimer; os reativos utilizados foram específicos para a proteína pesquisada. A reação de turbidimetria baseia-se na formação de imunocomplexos entre as proteínas contidas nas amostras com anticorpos específicos presentes nos reagentes. A turbidez que se forma na sequência da mistura é medida fotometricamente e é proporcional à concentração de apolipoproteína.

Foi realizada a correlação entre as metodologias de nefelometria e turbidimetria para apo AI e B, verificando que ambos os métodos apresentaram resultados semelhantes, conforme podemos observar na Figura 1. Escolhemos então os resultados de turbidimetria para as análises, por apresentarem valores exatos.

A

B

C

D

Figura 1: Comparações de duas metodologias, nefelometria e turbidimetria, utilizadas para as dosagens de apo AI e apo B em soro e exsudato. A) Relação das dosagens de apo AI nas amostras de soro. B) Relação das dosagens de apo AI nas amostras de exsudato. C) Relação das dosagens de apo B nas amostras de soro. D) Relação das dosagens de apo B nas amostras de exsudato. Para a realização das correlações, foram descartados os resultados de nefelometria que não apresentaram valores exatos.

4.5.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH)

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

4.5.8 ANÁLISE CITOLÓGICA DOS LÍQUIDOS

A contagem de células (leucócitos e hemácias), foi realizada manualmente, utilizando-se a câmara de Fuchs-Rosenthal. A câmara foi carregada com o líquido *in natura* para a realização da contagem, diferenciando leucócito de hemácias. O fator de correção utilizado foi 3, fornecendo assim a quantidade real de células /mm³. Nos líquidos que apresentaram leucócitos com valores maior ou igual a 100, foram realizados a contagem diferencial. O líquido foi centrifugado em baixa rotação (500 rpm) por 10 minutos. O sedimento, em lâmina, foi corado por May-Grünwald-Giemsa. Com a lâmina corada foi realizada a contagem diferencial, contando 100 leucócitos e anotando o resultado em porcentagem.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido a natureza das variáveis, as mesmas foram resumidas por meio de tabelas, gráficos, média e erro padrão. Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para a verificação da distribuição de normalidade e utilizado o teste de Correlação de Spearman para verificar a existência ou não de correlação entre as variáveis. O coeficiente de correlação foi considerado forte quando o seu valor (r) foi $\geq 0,70$ (ROSNER, 1995). A relação utilizada para a classificação das correlações foi:

$$\begin{aligned} 0 \leq r < 0,30 &\rightarrow \text{não há relação} \\ 0,30 \leq r < 0,50 &\rightarrow \text{relação fraca} \\ 0,50 \leq r < 0,70 &\rightarrow \text{relação moderada} \\ r \geq 0,70 &\rightarrow \text{relação forte} \end{aligned}$$

5. RESULTADOS

SAA, PCR, apo A1, apo AII, apo B, PT, CT e TG foram determinados em 30 amostras de exsudatos (20 pleurais e 10 ascíticos), e correspondentes amostras de soro, de pacientes com diferentes hipóteses diagnósticas, como tuberculose, pneumonia, carcinomas, peritonites e cirrose. Os valores individuais das dosagens estão listados nos Anexos 5 a 7 e mostram amplos intervalos em alguns dos parâmetros doseados.

Foram realizadas as análises estatísticas separadamente do líquido pleural e do líquido ascítico, também foi analisada as correlações entre estes líquidos e, estaticamente, não apresentaram diferenças significativas. Outra análise realizada foi quanto às hipóteses diagnósticas dos pacientes desta pesquisa. Comparamos as diferentes hipóteses diagnósticas e verificamos que também não houve diferenças significativas entre elas. Como não existiu distinção na distribuição de valores quanto à doença ou origem do exsudato, analisamos os dados de forma conjunta.

A análise descritiva das dosagens realizadas, tanto para as amostras de soro como para as amostras de exsudato, estão apresentados na Tabela I. Nesta incluímos também os valores de LDH e celularidade do exsudato. Enquanto que a análise descritiva das relações exsudato/soro (E/S) encontradas para os parâmetros analisados estão listados na Tabela II e os valores das relações individuais estão listados no anexo 8. Das 30 amostras somente 4 não tiveram $PT(E/S) \geq 0,5$, mas apresentaram valores de LDH superiores a 200 U/L. Desta forma todas as amostras atenderam ao critério de Light para a definição de exsudato (LIGHT et al., 1972).

Tabela I: Valores descritivos dos parâmetros laboratoriais determinados nas amostras de soro e exsudatos (n = 30)

	Soro		Exsudato	
	Intervalo	Media $\pm$ DP	Intervalo	Media $\pm$ DP
SAA ($\mu\text{g/mL}$)	26,1 - 1567,1	314,3 $\pm$ 296,2	1,4 - 360,5	34,6 $\pm$ 76,4
PCR (mg/L)	37,1 - 426,1	148,7 $\pm$ 132,9	3,0 - 123,5	34,0 $\pm$ 31,5
apo AI (mg/dL)	16,9 - 157,0	69,8 $\pm$ 34,6	7,7 - 74,3	29,3 $\pm$ 16,5
apo AII (mg/dL)	4,5 - 28,9	12,2 $\pm$ 7,1	4,5 - 16,1	7,5 $\pm$ 3,4
apo B (mg/dL)	30,6 - 175,4	74,1 $\pm$ 29,2	9,3 - 67,4	33,7 $\pm$ 16,3
PT (g/dL)	4,3 - 9,4	6,2 $\pm$ 1,1	1,8 - 8,1	4,2 $\pm$ 1,4
CT (mg/dL)	65 - 362	130,0 $\pm$ 62,3	2 - 109	41,1 $\pm$ 26,3
TG (mg/dL)	26 - 383	92,9 $\pm$ 72,0	8 - 99	29,3 $\pm$ 21,7
LDH (U/L)	-	-	54 - 4339	530 $\pm$ 784,9
Leucócitos. $10^3/\text{mL}$	-	-	0,1 - 525	20 $\pm$ 95,5

SAA: amilóide sérica A; PCR: proteína C reativa; apo AI: apolipoproteína AI; apo AII: apolipoproteína AII; apo B: apolipoproteína B; PT: proteínas totais; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis e LDH: lactato desidrogenase

Tabela II: Valores descritivos das relações exsudato/soro para os parâmetros medidos (n = 30)

Parâmetros	E/S		
	Intervalo	Média $\pm$ DP	EP
SAA	0,004 - 0,711	0,11 $\pm$ 0,14	0,02
PCR	0,015 - 0,723	0,31 $\pm$ 0,20	0,03
apo AI	0,056 - 1,420	0,48 $\pm$ 0,26	0,048
apo AII	0,155 - 1,229	0,63 $\pm$ 0,29*	0,054
apo B	0,089 - 0,975	0,46 $\pm$ 0,19	0,035
PT	0,425 - 0,977	0,67 $\pm$ 0,18	0,03
CT	0,009 - 0,930	0,34 $\pm$ 0,21	0,04
TG	0,081 - 0,845	0,36 $\pm$ 0,22	0,04

* O valor desta relação excluindo-se os as medidas de AII que foram $\leq 4,5$ mg/dL foi de 0,59 $\pm$ 0,2

Utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov encontramos distribuição normal nas amostras de soro apenas para as variáveis apo AI, apo AII e PT; e nas amostras de líquido as variáveis apo AI, apo AII, apo B, PCR e PT apresentaram distribuição normal. Com a finalidade de verificar a correlação entre todos os parâmetros, aplicamos o teste de Correlação de Spearman.

Para os parâmetros séricos, os coeficientes de correlação estão apresentados na Tabela III. Nas amostras de soro encontramos uma forte correlação ($r_s \geq 0,70$) entre SAA *versus* PCR e apo AI *versus* apo AII (Figura 2 e 3). As comparações SAA *versus* apo AI e SAA *versus* apo AII resultaram em correlações negativas, as demais não apresentaram correlações. Observa-se que a correlação entre apo AI e apo AII era esperada uma vez que ambas estão presentes na mesma lipoproteína e as correlações negativas para SAA com apo AI e apo AII justifica-se pelo deslocamento das apos A pela SAA (COETZEE et al., 1986; MALLE, STEINMETZ e RAYNES, 1993; STEEL et al., 1993). Quanto à correlação SAA *versus* PCR, estas são proteínas de fase aguda que tem um aumento expressivo no processo inflamatório. A dispersão dos valores nesta correlação deve ser decorrente dos diferentes tipos e fases da doença entre os pacientes da nossa população de estudo. Sabemos que a SAA é um marcador mais precoce e com maiores aumentos de sua concentração sérica do que a PCR para muitas doenças infecciosas (RAU et al., 2000).

Tabela III: Coeficiente de correlação de Spearman para as dosagens realizadas nas amostras de soro (n = 30)

Correlação	Coeficiente de Correlação (r_s)
SAA x apo AI	-0,289
SAA x apo B	-0,041
SAA x apo AII	-0,134
SAA x PCR	0,750 *
SAA x PT	0,102
apo AI x apo AII	0,931 *
apo AI x apo B	0,159
apo AII x apo B	0,412
PT x PCR	0,164
PT x apo AI	0,104
PT x apo AII	0,212
PT x apo B	0,172

* Correlação forte entre as variáveis

Figura 2: Relação entre a SAA e a PCR nas amostras de soro de pacientes com exsudatos. A linha indica regressão linear.

Figura 3: Relação entre a apo AI e a apo AII nas amostras de soro de pacientes com exsudatos. A linha indica regressão linear.

Nas amostras de exsudato encontramos correlações moderadas para SAA *versus* PCR, apo B *versus* apo AI e apo B *versus* apo AII (Tabela IV), sendo que apenas a relação apo AI *versus* apo AII apresentou correlação forte (Figura 4). Houve a manutenção da correlação negativa entre SAA e apo AI.

Tabela IV: Coeficiente de correlação de Spearman entre as dosagens realizadas nas amostras de exsudato (n = 30)

Correlação	Coeficiente de Correlação (r_s)
SAA x apo AI	- 0,207
SAA x apo B	0,385
SAA x apo AII	0,124
SAA x PCR	0,521
SAA x LDH	0,014
SAA x PT	0,027
apo AI x apo AII	0,785*
apo AI x apo B	0,455
apo AII x apo B	0,537

* Correlação forte entre as variáveis

Figura 4: Relação entre apo AI e a apo AII nas amostras de exsudato de pacientes. A linha indica regressão linear.

Quando comparamos os valores das dosagens bioquímicas entre soro e exsudato, verificamos a existência de correlações moderadas para os parâmetros SAA e proteínas totais (Tabela V). Nas Figuras 5 e 6 apresentamos as correlações com coeficiente de correlação moderada e que correspondem respectivamente a SAA e PT.

Tabela V: Coeficiente de correlação de Spearman entre as dosagens realizadas no soro e no exsudato (n = 30)

Correlação líquido e soro	Coeficiente de Correlação (r_s)
SAA	0,584
PCR	0,486
Apo AI	0,380
Apo AII	0,511
Apo B	0,309
Proteínas Totais	0,653
Colesterol	0,381
Triacilgliceróis	0,495

Figura 5: Relação de SAA no soro *versus* exsudato de 30 pacientes

Figura 6: Relação de PT no soro *versus* exsudato de 30 pacientes

Alguns dos parâmetros que julgamos interessantes para a análise da eficiência na passagem do soro para a cavidade foram as comparações das relações SAA/AII, AI/AII, AI/B e AII/B entre exsudato e soro. Com esta análise pudemos averiguar as diferentes passagens das lipoproteínas ao foco inflamatório.

Apresentamos a análise descritiva destes parâmetros de relações na Tabela VI. Também foram analisadas as relações entre as apolipoproteínas AI e AII com a apo B no soro e no exsudato, os valores do r_s estão demonstrados na tabela VII. As Figuras 7 e 8 são as relações de apo AI/apo B e de apo AII/ apo B, respectivamente.

Tabela VI. Análise descritiva das relações entre as apolipoproteínas no soro e exsudato. Na tabela abaixo foram retirados os valores de AII $\leq$ 4,5 mg/dL

	SAA/AII		AI/AII		AI/B		AII/B	
	S	E	S	E	S	E	S	E
Média	15,84	8,8	5,04	4,25	1,02	0,95	0,23	0,25
DP	5,56	3,26	0,94	1,28	0,52	0,45	0,07	0,08
EP	1,18	0,71	0,20	0,28	0,09	0,08	0,01	0,02
Mínimo	9,4	4,8	3,77	1,16	0,13	0,23	0,09	0,14
Máximo	32,8	16,1	6,51	5,99	2,21	2,01	0,34	0,47

Tabela VII: Coeficiente de correlação das relações das apolipoproteínas no soro e exsudato.

Relação entre soro e exsudato	Coeficiente de Correlação (r_s)
Apo AI / Apo B	0,603
Apo AII / Apo B	0,688

Figura 7: Relação de apo AI/apo B no soro *versus* exsudato de 30 pacientes

Figura 8: Relação de apo AII/apo B no soro *versus* exsudato de 30 pacientes

As correlações entre exsudato e soro para as relações apo AI/apo B e apo AII/apo B reforçam os diferentes graus de permeabilidade para as lipoproteínas.

6. DISCUSSÃO

A fase aguda é caracterizada pela mudança significativa nos níveis plasmáticos de várias proteínas que são predominantemente sintetizadas no fígado. Algumas têm sua síntese aumentada durante o processo inflamatório e são chamadas de proteínas de fase aguda positivas. Destas, a PCR e a SAA se sobressaem por apresentarem um aumento significativo (KUSNER, 1988; MOSHAGE, 1997). É de se esperar que estas proteínas exerçam um importante papel nas etapas do processo inflamatório, atuando como moduladores da resposta inflamatória, ou ainda participando na resolução deste processo. Para a PCR existem sólidas evidências de sua participação na resposta inata frente a um patógeno através da ativação do sistema complemento (GEWURZ, ZHANG e LINT, 1995), entretanto para a SAA, a função biológica ainda está para ser esclarecida. Trabalhos do grupo mostram que, quando livre, a SAA ativa funções celulares de neutrófilos, tais como a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (FURLANETO, CAMPA, 2000), além de atuar como um *priming* na resposta à partículas opsonizadas (HATANAKA, RIBEIRO e CAMPA, 2003). A partir destes achados trabalhamos com a hipótese de que a SAA seja um importante ativador celular na inflamação. Evidentemente a ação sistêmica de uma proteína com tal atividade deve ser prevenida e é provável que existam mecanismos que lhe permitam uma ação localizada. A partícula de HDL, lipoproteína na qual a SAA associa-se logo após ser liberada do fígado (CUNNANE, WHITEHEAD, 1999), pode garantir o controle dos efeitos da SAA uma vez que a ação pró-inflamatória da SAA está ausente quando a proteína encontra-se associada com a HDL. A HDL carrega também outras duas apolipoproteínas, AI e AII que são reativos de fase aguda negativos (STEEL, WHITEHEAD, 1994), ou seja, enquanto a SAA aumenta as AI e AII diminuem. A diminuição na concentração sérica destas proteínas, especialmente AI, na inflamação deve-se a seu deslocamento da HDL pela SAA.

Para avaliarmos a possibilidade da SAA alcançar o foco inflamatório, associada ou não às lipoproteínas, determinamos o perfil de proteínas, lipídeos e apolipoproteínas em 20 exsudatos pleurais e 10 exsudatos ascíticos. As efusões foram definidas como exsudatos utilizando-se o critério descrito por Light et al. (1972), especialmente a relação entre os níveis de proteínas exsudato/soro maiores que 0,5. A relação dos valores de proteínas no exsudato com o soro é utilizado como um bom marcador de permeabilidade capilar, pois acredita-se que estas não sejam metabolizadas localmente (WIENER-KRONISH et al., 1984). Todos os analitos ensaiados estavam presentes no exsudato inflamatório. Observamos nestes pacientes, como esperado, uma forte correlação entre SAA e PCR. Os aumentos séricos destas proteínas quando comparados aos valores de referência de uma população sadia mostram incrementos de aproximadamente 10 a 150 vezes. Os valores séricos médios destas proteínas são comuns a várias descrições de fase aguda decorrentes de infecções bacterianas e virais (NAKAYAMA et al., 1993) e também de condições não infecciosas onde se observam sinais do processo inflamatório tal como durante o parto (CICARELLI, 2003). Nos pacientes deste trabalho também foram observados valores da apo AI e apo AII séricos abaixo dos valores de referência, mas não da apo B. Os valores de apo AI e apo AII no soro de nossos pacientes, apesar de abaixo dos valores de referência, mantiveram a proporcionalidade (AI é em média 4 vezes mais elevada que AII). É descrito que SAA desloca preferencialmente AI do que AII (COETZEE et al., 1986), assim sendo, a manutenção da proporcionalidade AI/AII no soro dos pacientes indica que os mecanismos de distribuição de apolipoproteínas da HDL na inflamação é mais complexo do que pode conhecer no momento.

A redução nos níveis séricos de proteínas totais observadas em alguns pacientes pode refletir uma condição catabólica comum nos quadros inflamatórios. O amplo intervalo nos níveis séricos de colesterol e triacilgliceróis (anexo5) devem ser fruto da heterogeneidade da população estudada, principalmente em relação a idade (RIFAI, BACHORIK e ALBERS, 1999). Os amplos intervalos observados nas determinações de SAA e PCR

no soro e de todos os parâmetros nos exsudatos são esperados face a heterogeneidade de tipos e fases das doenças.

É razoável supor que a permeabilidade das diferentes lipoproteínas ao foco inflamatório mantenha alguma relação com seu tamanho médio. Assim espera-se que haja uma passagem crescente para as lipoproteínas VLDL (diâmetro de 25 a 70 nm), LDL (diâmetro de 19 a 23 nm), HDL (diâmetro de 4 a 10 nm) (RIFAI, BACHORIK e ALBERS, 1999), ou seja, a permeabilidade da membrana deve ser maior para partículas menores de lipoproteínas. É evidente que existem diversas subclasses destas lipoproteínas, mas nosso interesse neste estudo limita-se à HDL. No caso da HDL, existem duas subclasses importantes, a HDL₂ e a HDL₃ (SHAEFER, EISENBERG e LEVY, 1978) e sabe-se que a primeira é significativamente maior que a segunda (CHAPMAN, 1986). A apolipoproteína B está presente nas LDL e VLDL mas ausente na HDL, assim foi utilizada como proteína marcadora da passagem de lipoproteínas que não a HDL. As apolipoproteínas AI e AII estão presentes majoritariamente na HDL e definem as duas subclasses descritas acima, ou seja, a HDL₂ é composta quase que exclusivamente por apo AI, enquanto que a HDL₃ é composta por ambas, apo AI e apo AII, respectivamente 70 e 20% (SHAH et al., 2001; de BEER et al., 2001; HEDRICK et al., 2001). Ao analisarmos as concentrações e razões entre diferentes analitos nos compartimentos soro e cavidade objetivamos avaliar a passagem destes pelas membranas vizinhas ao foco inflamatório. É evidente que as concentrações medidas nos exsudatos estão correlacionadas com a concentração destas no soro e de suas permeabilidades às membranas em contato com a cavidade (pleural ou ascítica).

Outro fator que pode contribuir para a elevação da concentração no exsudato é a síntese local. Esta última contribuição é esperada para a SAA, uma vez que monócitos ativados expressam e liberam esta proteína (AKIRA et al., 1990). Fatores que devem contribuir para a redução da concentração no exsudato incluem a proteólise e ligação ou internalização das proteínas às células e tecidos. O grau de proteólise a que estas

proteínas estão sujeitas dependerá de enzimas liberadas por células inflamatórias e pode-se esperar que diferentes proteínas apresentem diversos graus de sensibilidade às condições líticas ou desnaturantes (SILVERMAN et al., 1982). Em relação à associação de proteínas presentes no exsudato com células, existem receptores descritos para apolipoproteínas em diversos tipos celulares (SHEPARD et al., 1987). Adicionalmente, sabe-se que a apo A1 é passível de oxidação e posterior fragmentação na presença de neutrófilos (COGNY et al., 1994), o mesmo poderia ocorrer para apo AII. Assim, de uma forma geral poderíamos visualizar estes processos como:

Pe= permeabilidade
 SL= síntese local
 PL= proteólise
 A= associação com células

Onde:

$$[\text{proteína}]_{\text{exsudato}} \propto ([\text{proteína}]_{\text{soro}} \times \text{Pe}/100) + \text{SL} - (\text{PL} + \text{A})$$

Como partimos do pressuposto de que a passagem das apolipoproteínas ocorre através da lipoproteína íntegra, a passagem de SAA deve ser concomitante à passagem de apo AII, uma vez que ambas estão situadas na HDL₃ durante o processo inflamatório. Se nossa premissa estiver correta, conclui-se que parâmetros como proteólise e associação às células devem ser bastante relevantes. Ambas possibilidades são bem amparadas por estudos que mostram: (i) a presença de fragmentos de SAA em líquido sinovial de indivíduos com artrite (YAVIN et al., 2000), (ii) proteólise de SAA na presença de enzimas lisossômicas liberadas por neutrófilos ativados (SILVERMAN et al., 1982) e (iii) receptor específico para SAA em macrófagos (HAYAT, RAYNES, 2000) e neutrófilos (PRECIADO-PATT, PRAS e FRIDKIN, 1996). É grande a possibilidade da SAA estar ativa no exsudato inflamatório uma vez que não há a manutenção da integridade da lipoproteína neste meio e os níveis de SAA no exsudato se correlacionam com os níveis de IL-8 (Cristiani Bürger, comunicação pessoal).

Pelas correlações encontradas entre a PCR e a SAA (correlação forte no soro e moderada no exsudato) podemos supor que estas proteínas atravessem a membrana com diferentes intensidades e/ou sofram diferentes graus de proteólise. A PCR/SAA no soro distribuiu-se no intervalo de 0,2 a 4,2 com média de $1,03 \pm 1,13$, enquanto que a mesma relação no exsudato distribuiu-se no intervalo de 0,3 a 13,0, com média de $4,4 \pm 3,6$. Na comparação entre estes grupos foi apontada uma diferença estatística com $p < 0,0001$.

As correlações exsudato/soro para as relações apo AI/apo B e apo AII/apo B são importantes para indicar diferentes graus de passagem das lipoproteínas entre os compartimentos vasculares e cavidade serosa, além de diferentes graus de proteólise ou associação com células presentes. Se imaginarmos que a SAA está presente juntamente com a apo AII na

HDL₃ concluiremos que esta partícula é mais facilmente transferida para a cavidade, entretanto a SAA deve sofrer maior proteólise. Não conseguimos nenhuma correlação para os valores desta proteína (SAA) no exsudato, assim como para as relações E/S com a celularidade observada nos exsudatos. Novamente a diversidade de contribuições entre degradação e síntese local deve tornar o quadro bastante complexo não permitindo uma análise compartimental completamente segura.

Resumidamente podemos dizer que a PT apresenta uma grande passagem pela membrana que recobre a cavidade pleural ou ascítica, enquanto que a menor permeabilidade apresentada foi da PCR, se considerarmos que a SAA sofra proteólise e/ou associação com receptores celulares no foco inflamatório. A apo B e apo AI apresentaram passagem semelhantes, apesar da diferença de tamanho das partículas das lipoproteínas onde estas apolipoproteínas estão presentes. O quadro abaixo esquematiza de forma sumária os achados deste trabalho e os coloca no contexto da formação do exsudato.

**Homeostasia
(soro)**

Proteína

**Inflamação
(soro)**

Proteína

PCR

**Foco inflamatório
(exsudato)**Proteínas
(E/S = $0,67 \pm 0,18$)PCR
(E/S = $0,31 \pm 0,03$)Apo B
(E/S = $0,46 \pm 0,19$)Apo AI
(E/S = $0,48 \pm 0,26$)

Apo AI

Apo AII
(E/S = $0,63 \pm 0,29$)**SAA** (E/S = $0,11 \pm 0,14$)

Proteólise e/ou
associação com
células

7. CONCLUSÃO

Como conclusão vimos que a proteína de fase aguda SAA tem acesso ao foco inflamatório e que o conteúdo desta proteína em exsudatos é, pelo menos em sua maioria, originário do soro. Assim sendo estima-se que a síntese localizada de SAA deve contribuir minimamente para sua concentração em exsudatos. A julgar pelos níveis de apo AII encontrados nos exsudatos, a permeabilidade das membranas que recobrem as cavidades pleurais e ascíticas é maior para HDL₃ do que para HDL₂ e LDL, fato este que garante uma passagem eficiente de SAA para as cavidades. A SAA que tem acesso à cavidade deve sofrer extensa proteólise e/ou associar-se eficientemente às células pois a relação de concentrações exsudato/soro encontrada para SAA é menor que para as demais proteínas analisadas. Este trabalho complementa trabalhos anteriores do grupo nos quais verificou-se que *in vitro* SAA é um modulador positivo para neutrófilos e monócitos. Este trabalho também dá suporte a trabalhos em andamento onde se busca uma correlação entre os níveis de SAA presente em exsudatos com marcadores pró-inflamatórios. Desta forma reforçamos a idéia de que a proteína SAA tem todas as condições para exercer uma importante função na manutenção e progressão do processo inflamatório.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA

Lípídeos e apolipoproteínas em fluídos extravasculares: acesso da HDL ao foco inflamatório, dissociação da Amilóide Sérica A (SAA), correlação entre seus níveis de SAA e migração de neutrófilos

I. Justificativa e Objetivo

Este projeto tem o objetivo de avaliar o excesso de uma proteína indicadora de inflamação.

Nossa hipótese de trabalho é a de que *in vivo* a HDL tem seu acesso ao foco inflamatório facilitado frente ao aumento da permeabilidade vascular e a seu relativo pequeno tamanho quando comparado a outras lipoproteínas.

II. Procedimentos a serem utilizados

Serão incluídos neste estudo 30 pacientes internados e que tenham colhido qualquer tipo de líquido extravascular e que tenham sido encaminhados ao Setor de Bioquímica ou de Urgências do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP.

Após anamnese será realizada a coleta de sangue destes pacientes para a realização dos seguintes exames: dosagem de colesterol, triacilgliceróis, proteínas totais apo AI, apo AII e SAA no Laboratório de Bioquímica.

III. Desconforto e riscos

Os materiais de coleta não oferecem nenhum risco de contaminação aos pacientes, uma vez que todo material utilizado é estéril e de uso único.

IV. Confiabilidade

A participação neste estudo é voluntária, tendo o (a) paciente liberdade para recusar ou retirar seu consentimento para fazer parte da mesma no momento que desejar, sem que haja prejuízo ao seu atendimento.

Os pacientes que participarem do projeto, em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas que não façam parte da pesquisa. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade dos pacientes.

V. Acesso às informações

Os pesquisadores e a Comissão de Ética que aprovou este estudo, comprometem-se a fornecer todas as informações que venham a obter durante a pesquisa.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Lipídeos e apolipoproteínas em fluídos extravasculares: acesso da HDL ao foco inflamatório, dissociação da Amilóide Sérica A (SAA), correlação entre seus níveis de SAA e migração de neutrófilos

Responsável pelo projeto: Alessandra Miyuki Okino

Eu, _____ RG _____, internado no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, declaro que em ____ / ____ / ____ concordei em participar como grupo de estudo do projeto acima nomeado.

O responsável pelo projeto explicou-me o seguinte:

1. O estudo implica em colher amostra de sangue e/ou de líquido corporal para análises bioquímicas.
2. A minha participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade para recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo ao meu atendimento.
3. O sigilo da minha participação, assim como todas as informações obtidas serão preservadas.

Londrina, ____ de _____ de 200 ____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável

Obs: Telefone para contato → 371-2313 (Alessandra M. Okino)

ANEXO 3

Informações sobre os pacientes utilizados neste estudo

Exsudatos pleurais			
Amostra	Sexo	Idade	Hipótese – Diagnóstica
1	M	27	Tuberculose pulmonar
2	M	42	Pneumonia
3	M	43	Tuberculose pulmonar
4	M	34	Tuberculose pulmonar
5	M	78	Pneumonia
6	M	77	Pneumonia
7	M	25	Pneumonia
8	M	34	Pneumonia
9	M	39	Tuberculose pulmonar
10	F	89	Pneumonia
11	M	59	Pneumonia
12	M	82	Pneumonia
13	M	78	Pneumonia
14	M	48	Pneumonia
15	F	59	Tuberculose neopleural
16	M	61	Tuberculose pulmonar
17	M	48	Tuberculose pulmonar
18	M	69	Ca esofágico com metástase pulmonar
19	M	45	Pneumonia
20	F	61	Carcinoma hepático difuso
Exsudatos ascíticos			
Amostra	Sexo	Idade	Hipótese – Diagnóstica
21	M	66	Peritonite regredida, hepatopatia, ICC descompensada
22	F	73	Peritonite em tratamento
23	F	45	Tuberculose peritoneal
24	M	33	ICC descompensada, hipertensão pulmonar, cirrose hepática
25	M	56	Tuberculose peritoneal
26	F	40	Hepatopatia crônica, anemia megaloblástica
27	F	42	Tuberculose peritoneal
28	F	64	Pneumonia, pós operatório de laparotomia exploradora
29	F	67	Cirrose hepática descompensada com ascite, Ca de ovário, carcinoma peritoneal
30	F	54	Síndrome consuptiva, metástase de câncer em colo uterino

ANEXO 4

Medicamentos utilizados pelos pacientes

Amostra	Medicamentos
1	Vancomicina, rifampicina, isoniazida, pirazinamida, haloperidol, clindamicina, dipirona
2	Clindamicina, amicacina, ranitidina, nifedipina cloranfenicol, dipirona, plasil
3	Vancomicina, rifampicina, isoniazida, pirazinamida, bactrim, tazocin, dipirona, domonid
4	Bactrin, rifampicina, amicacina, ranitidina, isoniazida, pirazinamida
5	Amicacina, gentamicina, tazocin, meronem, dipirona, plasil
6	Rocefin, clindamicina, aminofilina, dipirona
7	Cloranfenicol, rocefin, clindamicina
8	Clindamicina, amicacina, ranitidina, fenitoína, fenobarbital, dipirona, plasil
9	Amicacina, gentamicina, vancomicina, meronem, dipirona, plasil
10	Norfloxacina, levofloxacina, ranitidina, furosemida, flebocortid, antak
11	Ciprofloxacina, amiodarona, furosemida, neomicina, dipirona, plasil, omeprazol
12	Vancomicina, antak, amiodarona, dipirona, plasil, tienam
13	Prednisona, furosemida, norfloxacina, rocefin, amicacina, clindamicina
14	Clindamicina, oxacilina, ceftriaxona, dipirona
15	Captopril, amitriptilina, digoxina, furosemida
16	Amiodarona, propranolol
17	Rifampicina, pirazenamida, isoniazida
18	Tazocin, vancomicina, metronidazol, tramal, dramim, aminofilina
19	Omeprazol, pancreatina, dipirona, plasil
20	Rocefin, clindamicina, ranitidina, tramal
21	Oxacilina, lasix, aldactone, omeprazol, captopril, dipirona, plasil
22	Tazocin, rocefin, dipirona, omeprazol, lasix, plasil
23	Furosemida, aldactone, ranitidina, dipirona, plasil
24	Furosemida, aldactone, vancomicina
25	Amicacina, furosemida, vancomicina, omeprazol, dipirona, plasil
26	Keflin, omeprazol, dipirona, dramim, lasix, aldactone, alopurinol, furosemida
27	Rifampicina, isoniazida, pirazinamida, aldactone, omeprazol, tramal, dipirona, plasil
28	Vancomicina, amicacina, losec, dipirona, plasil, tramal, clexane, diazepam
29	Vancomicina, omeprazol, morfina, dipirona, dramim, plasil, aldactone
30	Antak, plasil, dramim, dipirona, buscopan

ANEXO 5

Análise bioquímica das amostras de soro colhidas dos pacientes que colheram exsudato

Amostra	PT (g/dL)	PCR (mg/L)	SAA (µg/mL)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	Apo AI (mg/dL)	Apo AII (mg/dL)	Apo B (mg/dL)
1	6,63	187,7	363,48	128	61	50,0	10,9	76,72
2	9,38	37,1	55,95	213	88	136,0	28,9	104,87
3	7,26	106,2	364,11	128	74	70,3	18,0	81,72
4	6,25	176,9	466,97	80	159	22,4	<4,5	70,71
5	5,13	180,0	286,07	137	61	58,7	12,1	59,80
6	6,22	255,5	337,82	362	136	58,1	14,1	157,53
7	8,12	74,7	342,86	158	40	75,0	19,8	63,88
8	7,06	426,1	1567,10	226	383	57,4	13,1	146,87
9	4,99	123,0	29,02	106	67	29,6	<4,5	65,18
10	5,81	60,6	156,08	170	83	79,4	17,3	68,04
11	5,09	87,5	57,84	117	89	21,3	<4,5	71,83
12	5,44	168,3	965,50	90	91	61,9	10,3	54,03
13	6,45	135,4	286,07	87	43	47,6	12,3	54,96
14	5,92	130,3	71,93	67	118	32,2	<4,5	66,82
15	6,05	41,7	26,92	187	93	135,0	23,9	102,82
16	7,28	93,8	247,16	115	41	97,3	15,1	49,34
17	5,97	108,4	152,08	91	54	50,6	10,2	61,83
18	5,02	288,1	225,07	148	34	36,1	6,3	74,09
19	7,03	102,3	26,08	82	37	51,9	9,4	37,18
20	5,75	191,0	257,86	65	216	16,9	<4,5	125,93
21	5,02	135,1	193,1	96	26	91,8	14,1	41,46
22	6,24	29,7	20,4	126	200	86,5	22,9	77,87
23	8,30	70,6	326,88	213	57	115,0	18,9	69,15
24	5,06	61,6	69,41	140	64	78,5	13,0	57,05
25	4,98	9,7	24,82	76	53	78,8	14,0	48,94
26	6,65	7,3	19,98	123	145	95,4	19,3	93,52
27	5,32	62,1	123,47	76	74	77,6	12,0	55,17
28	4,30	405,3	1074,88	86	71	52,3	11,0	62,79
29	7,30	46,9	77,89	101	54	157,0	32,8	109,95
30	5,84	186,3	669,69	101	74	75,2	16,1	51,88

ANEXO 6

Celularidade e cultura das amostras de exsudato

Amostra	Hemácias	Leucócitos	Diferencial				Cultura e/ou Gram
	/mm ³	/mm ³	Neu	Linfo	Mono	Eosi	
1	26500	350	90	10			Neg
2	683	3371	86	13	1		<i>Acinetobacter baumannii</i>
3	1800	450	3	96	1		Neg
4	597	853	64	36			Neg
5	9813	170	57	43			Neg
6	282	128	3	96	1		Neg
7	512	5291	87	13			Neg
8	2560	2390	73	23	4		Neg
9	362	213	57	40	3		Neg
10	2043	18773	97	3			Neg
11	1380	1300	83	14	3		Neg
12	210000	16000	70	25	5		Neg
13	512	2389	86	13	1		Neg
14	30000	525600	98	2			Gram: CGP (++) Cultura neg
15	5720	368	6	92	2		Neg
16	2645	853	3	97			Neg
17	1109	1451	4	96			Neg
18	10000	200	71	24	2	3	Neg
19	60000	9900	80	19	01		Neg
20	512	5291	87	13			Neg
21	7420	2130	91	8	1		<i>S. aureus</i> Gram negativo
22	20000	800	18	77	3	2	Gram: CGP isolados e aos pares Cultura negativa
23	490	144	51	46	1	2	Neg
24	200	198	50	48	2		Neg
25	350	368	40	58	2		Neg
26	1706	500	33	66	1		Neg
27	5888	255	44	56			Neg
28	750	1056	90	10			Neg
29	1000	1800	17	78	5		Neg
30	50000	190	62	32	6		Neg

ANEXO 7

Análise bioquímica das amostras de exsudatos

Amostra	PT (g/dL)	PCR (mg/L)	SAA (µg/mL)	LDH (U/L)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	Apo AI (mg/dL)	Apo AII (mg/dL)	Apo B (mg/dL)
1	5,94	123,5	14,28	886	109	45	27,5	6,9	47,24
2	6,25	3,0	2,52	1074	2	10	7,7	<4,5	9,33
3	6,32	28,3	2,71	288	66	32	39,2	8,9	43,40
4	4,49	65,4	13,54	481	25	31	16,9	<4,5	39,45
5	2,18	22,9	5,49	80	19	10	19,3	<4,5	21,20
6	3,11	8,8	4,16	276	34	11	18,8	6,4	37,74
7	5,38	6,8	4,88	200	69	19	39,7	14,7	54,34
8	5,08	66,3	233,28	451	66	44	18,7	16,1	67,37
9	2,74	20,9	1,61	301	35	10	8,0	<4,5	23,39
10	2,98	27,3	15,33	550	51	10	23,8	4,8	28,07
11	3,72	63,3	12,30	365	52	58	16,6	<4,5	45,16
12	3,45	115,6	360,54	264	48	43	41,1	7,4	43,30
13	3,32	39,4	7,84	165	15	11	41,6	12,0	53,62
14	5,71	23,7	2,71	4339	20	18	14,5	<4,5	23,05
15	4,82	15,1	1,85	379	67	19	38,6	9,5	44,86
16	4,43	23,9	4,31	293	59	13	38,2	6,9	21,28
17	5,00	56,8	31,42	511	43	22	29,9	5,5	26,06
18	3,05	15,2	11,84	319	20	8	16,1	<4,5	12,78
19	4,81	5,4	1,72	1001	9	8	20,5	9,0	18,97
20	3,52	49,6	45,26	501	21	70	12,5	<4,5	54,14
21	2,51	57,2	15,79	94	3	20	27,6	5,8	15,03
22	3,22	16,7	4,83	179	18	99	61,5	11,9	30,57
23	8,11	45,3	1,43	1391	71	22	21,8	7,7	19,71
24	2,64	15,7	1,89	182	67	28	25,3	6,0	29,94
25	3,85	3,0	1,70	54	11	29	13,7	<4,5	13,32
26	5,03	3,0	2,25	127	58	40	50,6	8,8	43,79
27	3,12	15,8	17,73	89	20	52	28,6	6,0	25,28
28	4,10	6,0	91,29	401	80	60	74,3	12,4	43,88
29	5,70	10,2	55,38	258	35	21	61,2	12,5	54,03
30	5,55	67,5	68,21	412	41	18	25,3	5,7	20,70

ANEXO 8

Relações exsudato/soro das amostras analisadas

Amostra	RELAÇÕES E/S							
	PT	PCR	SAA	CT	TG	Apo AI	Apo AII	Apo B
1	0,896	0,658	0,039	0,852	0,738	0,550	0,633	0,616
2	0,666	0,081	0,045	0,009	0,114	0,057	0,156	0,089
3	0,871	0,266	0,007	0,516	0,432	0,558	0,494	0,531
4	0,718	0,370	0,029	0,313	0,195	0,754	1,000	0,558
5	0,425	0,127	0,019	0,139	0,164	0,329	0,372	0,355
6	0,500	0,034	0,012	0,094	0,081	0,324	0,454	0,240
7	0,663	0,091	0,014	0,437	0,475	0,529	0,742	0,851
8	0,720	0,156	0,149	0,292	0,115	0,326	1,229	0,459
9	0,549	0,170	0,055	0,330	0,149	0,270	1,000	0,359
10	0,513	0,451	0,098	0,300	0,120	0,300	0,277	0,413
11	0,731	0,723	0,213	0,444	0,652	0,779	1,000	0,629
12	0,634	0,687	0,373	0,533	0,473	0,664	0,718	0,801
13	0,515	0,291	0,027	0,172	0,256	0,874	0,976	0,976
14	0,965	0,182	0,038	0,299	0,153	0,450	1,000	0,345
15	0,797	0,362	0,069	0,358	0,204	0,286	0,397	0,436
16	0,609	0,255	0,017	0,513	0,317	0,393	0,457	0,431
17	0,838	0,524	0,207	0,473	0,407	0,591	0,539	0,421
18	0,608	0,053	0,053	0,135	0,235	0,446	0,714	0,172
19	0,683	0,053	0,066	0,110	0,216	0,393	0,957	0,510
20	0,612	0,260	0,176	0,323	0,324	0,740	1,000	0,430
21	0,500	0,423	0,082	0,031	0,769	0,301	0,411	0,363
22	0,516	0,562	0,237	0,143	0,495	0,711	0,520	0,393
23	0,977	0,642	0,004	0,333	0,386	0,190	0,407	0,285
24	0,523	0,255	0,027	0,479	0,438	0,322	0,462	0,525
25	0,773	0,309	0,068	0,145	0,547	0,174	0,321	0,272
26	0,756	0,411	0,113	0,472	0,276	0,534	0,456	0,468
27	0,586	0,254	0,144	0,263	0,703	0,369	0,500	0,458
28	0,953	0,015	0,085	0,930	0,845	1,421	1,127	0,699
29	0,781	0,217	0,711	0,347	0,389	0,390	0,381	0,491
30	0,950	0,362	0,102	0,406	0,243	0,336	0,354	0,399

ANEXO 9

Relações entre as apolipoproteínas presentes no soro e no exsudato.

Amostra	SAA/AII		AI/AII		AI/B		AII/B	
	S	E	S	E	S	E	S	E
1	33,35	2,07	4,59	3,99	0,65	0,58	0,14	0,15
2	1,94	0,56	4,71	1,71	1,30	0,83	0,28	0,48
3	20,23	0,30	3,91	4,40	0,86	0,90	0,22	0,21
4	103,77	3,01	4,98	3,76	0,32	0,43	0,06	0,11
5	23,64	1,22	4,85	4,29	0,98	0,91	0,20	0,21
6	23,96	0,65	4,12	2,94	0,37	0,50	0,09	0,17
7	17,32	0,33	3,79	2,70	1,17	0,73	0,31	0,27
8	119,63	14,49	4,38	1,16	0,39	0,28	0,09	0,24
9	6,45	0,36	6,58	1,78	0,45	0,34	0,07	0,19
10	9,02	3,19	4,59	4,96	1,17	0,85	0,25	0,17
11	12,85	2,73	4,73	3,69	0,30	0,37	0,06	0,10
12	93,74	48,72	6,01	5,55	1,15	0,95	0,19	0,17
13	23,26	0,65	3,87	3,47	0,87	0,78	0,22	0,22
14	15,98	0,60	7,16	3,22	0,48	0,63	0,07	0,20
15	1,13	0,19	5,65	4,06	1,31	0,86	0,23	0,21
16	16,37	0,62	6,44	5,54	1,97	1,80	0,31	0,32
17	14,91	5,71	4,96	5,44	0,82	1,15	0,16	0,21
18	35,73	2,63	5,73	3,58	0,49	1,26	0,09	0,35
19	2,77	0,19	5,52	2,27	1,40	1,08	0,25	0,47
20	57,30	10,06	3,76	2,78	0,13	0,23	0,04	0,08
21	13,70	2,72	6,51	4,76	2,21	1,84	0,34	0,39
22	0,89	0,41	3,78	5,17	1,11	2,01	0,29	0,39
23	17,30	0,19	6,08	2,83	1,66	1,11	0,27	0,39
24	5,34	0,32	6,04	4,22	1,38	0,85	0,23	0,20
25	1,77	0,38	5,63	3,04	1,61	1,03	0,29	0,34
26	1,04	0,26	4,94	5,78	1,02	1,16	0,21	0,20
27	10,29	2,96	6,47	4,77	1,41	1,13	0,22	0,24
28	97,72	7,36	4,75	5,99	0,83	1,69	0,18	0,28
29	2,37	4,43	4,79	4,90	1,43	1,13	0,30	0,23
30	41,60	11,97	4,67	4,44	1,45	1,22	0,31	0,28

ANEXO 10

VALORES DE REFERÊNCIA (EM SORO)

TESTE	VALOR DE REFERÊNCIA
Amilóide sérica A (SAA)	1 – 10 µg/mL
Apo AI (Imunoturbidimetria)	M: 125 – 215 mg/dL H: 110 – 205 mg/dL
Apo AI (Nefelometria)	M: 125 – 215 mg/dL H: 110 – 205 mg/dL
Apo AII	26 – 51 mg/dL
Apo B (Imunoturbidimetria)	60 – 150 mg/dL
Apo B (Nefelometria)	M: 55 – 125 mg/dL H: 55 – 140 mg/dL
Colesterol Total	< 200 mg/dL → desejável 200 - 240 mg/dL → limite de risco > 240 mg/dL → alto risco
Lactato desidrogenase (37°C)	100 – 190 U/L
PCR	≤ 3,0 mg/L
Proteínas Totais	6,4 - 8,2 g/dL
Triacilgliceróis	30-200 mg/dL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABLIJ, H.C.; MEINDERS, A.E. C-reactive protein: history and revival. **European Journal of Internal Medicine**. v. 13, p. 412-422, 2002.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). **FASEB J**. v.4, p. 2860-2867, 1990.

ALVAREZ, C., RAMOS, A. - Lipids, lipoproteins and apoproteins during infection. **Clin Chem**. Winston-Selem, v.32, n.1, p.142-145, 1986.

ARTL, A.; MARSCHE, G.; LESTAVEL, S.; SATTLER, W.; MALLE, E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 20, p. 763-772, 2000.

BACHORIK, P.S.; LEVY, R.I.; RIFKIND, B.M. Lipídios e dislipoproteinemia. in: HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais**. 18ª edição, Editora Manole Ltda, São Paulo, 1678, 1995.

BADOLATO, R., WANG, J.M., MURPHY, W.J., LIOID, A.R., MICHEL, D.F., BAUSSERMAN, L.L., KEVIN, D.J., OPPENHEIM, J.J. - Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med**. New York, v.180, p.203-209, 1994.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trend Pharmacol Sci**. v.14, p. 436-441, 1993.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Mechanisms of disease: Nuclear factor κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**. v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.

BARTER, P.; KASTELEIN, J.; NUNN, A.; HOBBS, R.; FUTURE FORUM EDITORIAL BOARD. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atheroscl**. v.168, p. 196-211, 2003.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol Today**. Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BEKAERT, E.D.; ALAUPOVIC, P. KNIGHT-GIBSON, C. et al. Isolation and partial characterization of lipoprotein A-II (LP A-II) particles of human plasma. **Biochim Biophys Acta**. v. 1126, p. 105-113, 1992.

BENDER, M.D. in: WYNGAARDEN, J.B; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**, 19th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 737-742, 1992.

BHARADWAJ, D.; STEIN, M.-P.; VOLZER, M.; MOLD, S.; DU CLOS, T.W. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II. **J Exp Med.** v.190, p. 585-590, 1999.

BLACKBURN JR, W.D., DOHLMAN J.G., VENKATACHALAPATHI, Y.V., PILLION, D.J., KOOPMANN, W.J., SEGREST, J.P., ANANTHARAMAIAH, G.M.- Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production. **J Lipid Res.** New York, v. 32 : 1911-1918, 1991.

BRINCHERHOFF, C.E., MITCHELL, T.I., KARMILOWICZ, M.J., KLUVE-BECKERMAN, B., BENSON, M.D.- Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A – like and β 2-microglobulin-like proteins. **Science.** Washington, v.243, p.655-657, 1989.

BURGESS, L. MAITZ, F.J.; TALJAARD, J.J. Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates. **Chest.** v. 107, p. 1604-1609, 1995.

CABANA, V.G.; SIEGEL, J.N.; SABESIN, S.N. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. **J Lipid Res.** New York, v. 30, p. 39-49, 1989.

CASSATELLA, M. A.- The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today.** Amsterdam, v.16, p. 21-26, 1995.

CELLI, B.R. in: WYNGAARDEN, J.B; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**, 19th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 443-452, 1992.

CHAPMAN, M.J. Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. **Methods in Enzymology.** New York, v.128, p 70-143, 1986.

CHEUNG, M.C.; ALBERS, J.J. Distribution of high density lipoprotein particles with different apolipoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but not A-II. **J Lipid Res.** New York, v.23, p. 747-753, 1982.

CHEUNG, M.C.; ALBERS, J.J. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. **J Biol Chem.** v.259, p. 12201-12209, 1984.

CHISARI, F.V., CURTISS, L.K., JENSEN, F.C.- Physiologic concentrations of normal human plasma lipoproteins inhibits the immortalization of peripheral B lymphocytes by Epstein-Barr-Virus. **J Clin Invest.** New York, v.68, p.329-336, 1981.

CICARELLI, L.M. **Proteínas de fase aguda (proteína C reativa e amilóide sérica A) e citocinas (fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta e interleucina 8) no cordão umbilical e soro materno no momento do parto e puerpério.** São Paulo: USP, 2003. 72f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CLIFTON, P.M.; MACKINNON, A.M.; BARTER, P.J. Effects of serum Amyloid A protein (SAA) on composition, size, and density of high density lipoproteins in subjects with myocardial infection. **J Lip Res.** New York, v.26, p. 1389-1398, 1985.

COETZEE, G.A.; STRACHAN, A.F.; van der WESTHUYZEN, D.R.; HOPPE, H.C.; JEENAH, M.S.; de BEER, F.C. Serum Amyloid A – containing human high density lipoprotein 3. Density, size and apolipoprotein composition. **J Biol Chem.** Baltimore, v.261, p. 9644-9651, 1986.

COGNY, A.; PAUL, J.L.; ATGER, V.; SONI, T.; MOATTI, N. Structural changes of high-density-lipoprotein apolipoproteins following incubation with human polymorphonuclear cells. **Eur J Biochem.** Amsterdam, v.222, p. 965-973, 1994.

CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery.** v. 182, p. 558-562, 2001.

COTRAN, R.S., KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease.** Genetic Disorders, 6th edition, W.B. Saunders Company, United States of America, 1425p, 1999.

CRAWFORD, J.M. The gastrointestinal tract. in: COTRAN, R.S., KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**, 6th edition, W.B. Saunders Company, United States of America, 1425p, 1999.

CROWELL, R.E.; DU CLOS, T.W.; MONTOYA, G.; HEAPHY, E.; MOLD, C. C-reactive protein receptors on the human monocytic cell line U-937. evidence for additional binding to FcγRI. **J Immunol.** v.147, p. 3445-3451, 1991

de BEER, M.C.; DURBIN, D.M.; CAI, L.; MIROCHA, N.; JONES, A.; WEBB, N.R.; de BEER, F.C.; van DER WESTHUYZEN, D.R. Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high-density lipoprotein by scavenger receptor BI. **J Biol Chem.** v.276, p.15832-15839, 2001.

DU CLOS, T.W. C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. **J Immunol.** v.143, p. 2553-2559, 1989.

DUCHATEAU, P.N.; PULLINGER, C.R.; ORELLANA, R.E.; KUNITAKE, S.T.; NAYA-VIGNE, J.; O'CONNOR, P.M.; et al. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. **J Biol Chem.** Baltimore, v.272, p. 25576-25582, 1997.

FAVA, R.A., OLSEN, N.J., POSTLTHWAITE, A.E. BROADLEY, K.N., DAVIDSON, J.M., NANNEY, L.B., LUCAS, C., TOWNES, A.S.- Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) induced neutrophil recruitment to sinovial tissues: implications for TGF- β -driven synovial inflammation and hiperplasia. **J Exp Med.** New York, v.173, p.1121-1132, 1993.

FURLANETO C.J., CAMPA, A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β e interleukin-8 by human blood neutrophil. **Biochem Biophys Res Comm.** v. 268, p. 405-408, 2000.

FURLANETO, C.A.; RIBEIRO, F.P.; HATANAKA, E.; SOUZA, G.M.; CASSATELLA, M.A.; CAMPA, A. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. **Lipids.** v. 37, n. 9, p. 925-928, 2002.

GABAY, C.; KUSNHER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N Engl J Med.** v.340, p. 448-454, 1999.

GEWURZ, H.; ZHANG, X.H.; LINT, T.F. Structure and function of the pentraxins. **Curr Opin Immunol.** v.7, p. 54-64, 1995.

HAMM, H.; BROHAN, U.; BOHMER, R.; MISSMAHL, H.P. Cholesterol in pleural effusions: the diagnostic aid. **Chest.** v. 92, p. 296-302, 1987.

HARDARDÓTTIR, I.; GRÜNFELD, C.; FEINGOLD, K.R. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol.** v.5, p. 207-215, 1994.

HASLETON, P.S. **Spencer's Pathology of the Lung.** 5th edition, McGraw-Hill, New York, 1283p, 1996.

HATANAKA, E.; RIBEIRO, F.P.; CAMPA, A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. **FEMS Immunol Medic Microbiol.** v.1560, p. 1-4, 2003.

HAYAT, S.; RAYNES, J.G. Acute phase serum amyloid A protein increases high density lipoprotein binding to human peripheral blood mononuclear cells and an endothelial cell line. **Sand J Immunol.** Oxford, v. 51, p. 141-146, 2000.

HE, R.; SANG, H.; YE, R.D. Serum Amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. **Blood.** v.101, p.1572-1581, 2003.

HEDRICK, C.C.; CASTELLANI, L.W.; WONG, H.; LUSIS, A.J. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. **J Lipid Res.** New York, v.142, p.563-570, 2001.

JARSTRAND, C.; HOLMQUIST, L.; WIERNIK, A.; AKERLUND, B.; CARLSON, L.A. Influence of human plasma high density lipoproteins from septic patients on different functions of normal human neutrophil. **J Clin Lab Immunol.** Edinburgh, v. 33, p. 69-73, 1990.

JENSEN, L.E.; WHITEHEAD, A.S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. **Biochem J.** v. 334, p. 489-503, 1998.

KASISCHE, B.L., KEANE, W.F.-with the technical assistance of DANIELS, F.X. and OLSON, M.D.- Role of lipid peroxidation in inhibition of mononuclear cell proliferation by normal lipoproteins. **J Lipid Res.** New York, v.32, p.775-781, 1991.

KISILEVSKY, R; SUBRAHMANYAN, L. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. **Laboratory Investigation.** v.66, p. 778-785, 1992.

KITA, H., OHNISHI, T., OKUBO, Y., WEILER, D., ABRAMS, J.S., GLEICH, G.J.- Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. **J Exp Med.** New York, v.174, p.745-748, 1991.

KOBZIK, L. The lung. in: COTRAN, R.S., KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**, 6th edition, W.B. Saunders Company, United States of America, 1425p, 1999.

KOJ, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. **Bioch Bioph Acta.** v. 1317, p. 84-94, 1996.

KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. **Methods Enzymol.** New York, v.163, p. 373-383, 1988.

LIGHT, R.W. Diagnostic principles in pleural disease. **Eur Resp J.** UK, v.10, p. 476-481, 1997.

LIGHT, R.W. Useful tests on the pleural fluid in the management of patients with pleural effusions. **Curr Opin Pulm Med.** v. 5, p. 245-249, 1999.

LIGHT, R.W.; MACGREGOR, M.I.; LUCHSINGER, P.C.; BELL, W.C. Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudate and Exudate. **Ann Intern Med.** v.77; p. 507-513, 1972.

LINKE, R.P.; BOCK, V.; VALET, G.; ROTHE, G. Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophil by serum Amyloid-A protein. **Biochem Biophys Res Commun** v.176, p. 1100-1105, 1991.

LLOYD A.R., OPPENHEIM, J.J.- Poli's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunological Today**. Amsterdam, v.13, p.169-172, 1992.

MACINTYRE, S.; SAMOLS, D.; DAILEY, P. Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. **J Biol Chem**. v.269, p.24496-24503, 1994.

MALLE, E.; STEINMETZ, A.; RAYNES, J.G. Serum Amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. **Atherosclerosis**. v.102, p. 131-146., 1993.

MALYAK, M., SMITH, M.F., ABEL, A.A., ATEND, W.P.- Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. **J Clin Immunol**. v.14, p.20-30, 1994.

MARNELL, L.L.; MOLD, C.; VOLZER, M.A., BURLINGAME, R.W.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein binds to FcγRI in transfected COS cells. **J Immunol**. Baltimore, v.155, p. 2185-2193, 1995

MEEK, R.L.; ERIKSEN, N.; BENDITT, E.P. Serum amyloid A in the mouse: sites of uptake and mRNA expression. **Am J Pathol**. v.135, p. 411-419, 1989.

MEEK, R.L.; URIELI-SHOVAL, S; BENEDITT, E.P. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerosis lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. **Proc Nat Acad Sci USA**. v.91, p. 3186-3190, 1994.

METINTAS, M.; ALATAS, Ö.; ALATAS, F.; ÇOLAK, Ö.; ÖZDEMİR, N.; ERGINEL, S. Comparative analysis of biochemical parameters for differentiation of pleural exudates from transudates Light's criteria, cholesterol, bilirubin, albumin gradient, alkaline phosphatase, creatine kinase, and uric acid. **Clin Chim Acta**. v.264, p. 149-162, 1997.

MOLD, C.; GRESHAM, H.D.; DU CLOS, T.W. Serum Amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine FcγRs. **J Immunol**. Baltimore, v.166, p. 1200-1205, 2001.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **J Pathol**. v.181, p. 257-266, 1997.

MURPHY, H.C.; BURNS, S.P.; WHITE, J.J.; BELL, J.D.; ILES, R.A. Investigation of human low-density lipoprotein by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Mobility of phosphatidylcholine and sphingomyelin headgroups characterizes the surface layer. **Biochemistry**. v.39, p. 9763-9770, 2000.

NAKAYAMA, T.; SONODA, S.; URANO, T.; OKADA, M. Monitoring both serum amyloid A and C-reactive protein in inflammatory markers in infectious diseases. **Clin Chem**. Winston-Salem, v.39, n.2, p. 293-297, 1993.

PARAMOTHAYAN, N.S.; BARRON, J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. **J Clin Pathol**. v. 55, p. 69-71, 2002.

PARENT, C.; EICHACKER, P.Q. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. **Infect Dis Clinic North Am**. v.2, p. 427-447, 1999.

PATEL, H.; FELLOWES, R.; COADE, S.; WOO, P. Human serum Amyloid A has cytokine like properties. **Scand J Immunol**. Oxford, v.48, p. 410-418, 1998.

PENNACCHIO, L.A.; OLIVER, M.; HUBACK, J.A.; COHEN, J.C.; COX, D.R.; FRUCHART, J.C. et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**. Washington, v.294, p. 169-173, 2001.

PEPYS, M.B.; BALTZ, M.L. Acute phase proteins. **Adv Immunol**. v. 34, p. 141-212, 1983.

PEPYS, M.B.; BOOTH, S.E.; TENENT, G.A.; et al. Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. **Clin Exp Immunol**. v.97, p. 152-157, 1994.

PRECIADO-PATT, L.; PRAS, M.; FRIDKIN, M.- Binding of serum amyloid A (hSAA) and its high-density lipoprotein 3 complex (hSAA-HDL3) to human neutrophils. **Int J Peptide Protein Res**. v.48, p. 503-513, 1996.

PRECIADO-PATT, L.; CAHALON, L.; HERSKOVIZ, R.; LIDER, O.; PRAS, M.; FRIDKIN, M. Serum amyloid A complexed with extracellular matrix induces the secretion of tumor necrosis factor- α by human T-lymphocytes. **Letters in Peptide Science**. Leaden, v.5, p. 349-355, 1998.

PRECIADO-PATT, L.; HERSKOVIZ, FRIDKIN, M.; LIDER, O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4^+ T cells. **J Immunol**. Baltimore, v.156, p. 1189-1195, 1996.

PRECIADO-PATT, L.; LEVARTOWSKY, D.; PRASS, M.; HERSKOVIZ, R. LIDER, O.; FRIDKIN, M. Inhibition of cell to glycoproteins of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. **Eur J Biochem.** Berlin, v.223, p. 35-42, 1994.

PRECIADO-PATT, L.; PRAS, M.; FRIDKIN, M. Binding of human serum amyloid A (hSAA) and its high-density lipoprotein₃ complex (hSAA-HDL₃) to human neutrophils. Possible implication to the function of a protein of an unknown physiological role. **Int J Peptide Protein Res.** v.48, p. 503-513, 1996.

PRUZANSKI, E.; STEFANSKI, E.; de BEER, F.C.; de BEER, M.C.; RAVANDI, A.; KUKSIS, A. Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins. **Journal of Lipid Research.** v.41, p. 1035-1047, 2000.

RAMADORI, G.; SIPE, J.D.; COLTEN, H.R. Expression and regulation of murine serum amyloid A (SAA) gene in extrahepatic sites. **J Immunol.** Baltimore, v.135, p. 3645-3647, 1985.

RAU, B.; STEINBACH, G.; BAUMGART, K.; GANSAUGE, F.; GRÜNERT, A.; BEGER, H. Serum Amyloid A versus C-reactive protein in acute pancreatitis: Clinical value of an alternative acute-phase reactant. **Clinical Care Medicine.** v.28, n.3, p. 736-742, March, 2000.

RE, F., MENGOZZI, M., MUZIO, M. DINARELLO, C. A., MANTOVANI, A., COLOTTA, A. – Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells. **Eur J Immunol.** Berlin. v.23, p.570-573, 1993.

RIFAI, N.; BACHORIK, P.S.; ALBERS, J.J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. in: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz textbook of Clinical Chemistry.** 3rd edition, W.B Saunders Company, United States of America, 1917, 1999.

ROMERO, S.; CANDELA, A.; MARTÍN, C. Evaluation of different criteria for the separation of pleural transudates from exudates. **Chest.** v. 104, p. 300-404, 1993.

ROMERO, S.; MARTINEZ, A.; HERNANDEZ, L.; FERNANDEZ, C.; ESPASA, A.; CANDELA, A.; MARTIN, C. Light's criteria revisited: Consistency and comparison with new proposed alternative criteria for separating pleural transudates form exudates. **Respiration.** v. 67, p. 18-23, 2000.

ROMERO-CANDEIRA, S.; HERNÁNDEZ, L.; ROMERO-BRUFÃO, S.; ORTOS, D.; FERNÁNDEZ, C.; MARTÍN, C. Is it meaningful to use biochemical parameters to discriminate between transudative and exudative pleural effusions? **Chest**. v. 122, p. 1524-1529, 2002.

ROSENFELD, S.I.; PACKMAN, C.H.; LEDDY, J.P. Inhibition of the lytic action of cell-bound terminal complement components by high density lipoprotein and apolipoproteins. **J Clin Invest**. New York, v. 71, p. 795-808, 1983.

ROSNER, B.A. **Fundamentals of Biostatistics**. Belmont, London: Duxbury Press, 1995.

ROTH, B.J., O'MEARA, T.F.; CRAGUN, W.H. The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions. **Chest**. v. 98, p. 546-549, 1990.

RYE, K.A.; CLAY, M.A.; BARTER, P.J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. **Atherosclerosis**. v. 145, p. 227-238, 1999.

SAATCIOGLU, F.; CLARET, F.X.; KARIN, M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. **Semin Cancer Biol**. v.5, p. 347-359, 1994.

SAMMALKORPI, K.; VALTONEN, V.; KERTTULA, Y.; NIKKILA, E.; TASKINEN, M.R. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute phase infections. **Metabolism**. Altman, v. 37, p. 859-865, 1988.

SCHAWRTZ, B.S.; LEVY, G.A.; CURTISS, L.K.; FAIR, D.S.; EDGINTON, T.S. Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. **J Clin Invest**. New York, v.67, p. 1650-1658, 1981.

SELLAR, G.C.; JORDAN, S.A.; BICKMORE, W.A.; FANTES, J.A.; van HEYNINGEN, V.; WHITEHEAD, A.S. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: Mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. **Genomics**. v.19, p. 221-227, 1994.

SHAEFER, E.J.; EISENBERG, S. LEVY, R.I. Lipoprotein apoprotein metabolism. **J Lipid Res**. New York, v.19, p. 667-687, 1978.

SHAH, P.K.; KAUL, S.; NILSSON, J.; CERCEK, B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming. **Circulation**. New York, v.104, p. 2376-2383, 2001.

SHANKIN-KESTENBAUM, R., BERLYNE, G., ZIMLICHMAN, S., SORIN, H.R., NYSKA, M., DANON, A.- Acute-Phase Protein, Serum Amyloid A, Inhibits IL-1 and TNF induced Fever And Hypothalamic PGE2 in mice. **Scandi J Immunol**. Oxford, v.34, p.179-183, 1991.

SHEPARD, E.G.; de BEER, F.C.; de BEER, M.C.; JEENAH, M.S.; COETZEE, G.A.; van der WESTHUYZEN, D.R. Neutrophil association and degradation of normal and acute-phase high density lipoprotein 3. **Biochem J.** Great Britain, v.248, p. 919-926, 1987.

SILVERMAN, S.L.; CATHCART, E.S.; SKINNER, M.; COHEN, A.S. The degradation of serum amyloid A protein by activated polymorphonuclear leucocytes: participation of granulocytic elastase. **Immunology.** v.46, 737-744, 1982.

STEEL, D.M.; ROGERS, J.T.; de BEER, M.C.; de BEER, F.C.; WHITEHEAD, A.S. Biosynthesis of human acute-phase serum Amyloid A protein (A-SAA) in vitro: the roles of mRNA accumulation, poly(A) tail shortening and translational efficiency. **Biochem J.** v.291, p. 701-707, 1993.

STEEL, D.M.; WHITEHEAD, A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today.** Amsterdam, v.15, n. 2, p. 81-88, 1994.

STEIN, M.P.; MOLD, C.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fc gamma receptors. **J Immunol.** Baltimore, v.164, p. 1514-1520, 2000.

STEINMETZ, A.; HOCKE, G.; SAILE, R.; PUCHOIS, P.; FRUCHART, J.C. Influence of serum Amyloid-A on cholesterol esterification in human plasma. **Biochim Biophys Acta.** v.1006, p. 173-178, 1989.

STRASINGER, S.K. **Uroanálise e Fluídos Biológicos.** 3º edição, Editorial Premier, São Paulo, 233p, 1998

SZALAI, A.J.; van GINKEL, F.W.; WANG, Y.; McGHEE, J.R.; VOLANAKIS, J.E. Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. **Journal of Immunology.** Baltimore, v.165, p. 1030-1035, 2000.

TAYLOR, W.A.; KU, N.O.; MORTENSEN, R.F. Both human IL-1 and IL-6 induce synthesis of C-reactive protein (CRP) by the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. II Modulatory effects of calcium and phosphocoline. **J Immunol.** Baltimore, v.127, n.4, p. 1509-1514, 1981.

THOMPSON, D.; PEPYS, M.B.; WOOD, S.P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. **Structure.** v.7, n.2, p. 169-177, 1999.

TILLET, W.S.; FRANCIS, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the Pneumococcus. **J Exp Med.** v.52, p. 561-571, 1930.

TONIATTI, C.; ARCONI, R.; MAJELLO, B.; GANTER, U.; ARPAIA, G.; CILIBERTO, G. Regulation of the human C-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer. **Mol Biol Med.** v.7, p. 199-212, 1990.

UHLAR, C.M.; BURGESS, C.J.; SHARP, P.M.; WHITEHEAD, A.S. Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. **Genomics.** v.19, p. 228-235, 1994.

UHLAR, C.M.; WHITEHEAD, A.S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. **Eur J Biochem.** v.265, p. 501-523, 1999.

URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R.P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease state. **Curr Opin Hematol.** v.7, p. 64-69, 2000.

URIELI-SHOVAL, S.; MEEK, R.L.; HANSON, R.H.; et al. Human serum amyloid A genes are expressed in monocyte/macrophage cell lines. **American Journal of Pathology.** v.145, p. 650-660, 1994.

VALDÉS, L.; POSE, A.; SUAREZ, J.; GONZALES-JUANATEY, J.R. et al. Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. **Chest.** v.99, p. 1097-1102, 1991.

VAZ, M.A.C.; TEIXEIRA, L.R.; VARGAS, F.S.; CARMO, A.O.; ANTONANGELO, L.; ONISHI, R.; LIGHT, R.W. Relationship between pleural fluid and serum cholesterol levels. **Chest.** v. 119, p. 204-210, 2001.

VIRGUSHIN, D.M.; PEPYS, M.B.; HAWKINS, P.N. Metabolic and scintigraphic studies of radioionated human C-reactive protein in health and disease. **J Clin Invest.** New York, v.90, p. 1351-1357, 1993.

VIVES, M.; PORCEL, J.M.; VICENTE DE VERA, M.C.; RIBELLES, E.; RUBIO, M. A Study of Light's criteria and possible modifications for distinguishing exudative from transudative pleural effusions. **Chest.** v. 109, p. 1503-1507, 1996.

VOLANAKIS, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Molecular Immunology.** v.38, p. 189-197, 2001.

WATSON, G.; SEE, C.G.; WOO, P. Use of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization to localize the functional serum amyloid A (SAA) genes to chromosome 11p15.4-p15.1 and the entire SAA superfamily to chromosome 11p15. **Genomics.** v. 23, p. 694-696, 1994.

WIENER-KRONISH, J.P.; ALBERTINE, K.H.; LICKO, V. et al. Protein egress and entry rates in pleural fluid and plasma in sheep. **J Appl Physiol.** v.56, p. 459-463, 1984.

WOLBINK, G.J.; BROUWER, M.C.; BUYSMANN, S.; ten BERGE, I.J.; HACK, C.E. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. **J Immunol.** Baltimore, v.157, p. 473-479, 1996.

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**, 19th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1146p, 1992.

YAVIN, E.J.; PRECIADO-PATT, L.; ROSEN, O.; YARON, .; SUESSMUTH, R.D.; LEVARTOWSKY, D.; JUNG, G.; LIDER, O.; FRIDKIN, M. Serum Amyloid A-derived peptides, present in human rheumatic synovial fluids, induce the secretion of interferon- γ by human CD₄⁺ T-lymphocytes. **FEBS Letters**. v.472, p. 259-262, 2000.