



Endotoxinas bacterianas  
*versus*  
Resposta inflamatória e alérgica

Dissertação de Mestrado em Análises Aerobiológicas

Director do Curso: *Prof. Doutor Carlos Sinogas*  
Orientador: *Prof. Doutor Rui Brandão*  
Co-orientadora: *Dr.ª Maria Paula Pinheiro*

*Alzira Miguéns Lopes Louro*

Endotoxinas bacterianas  
*versus*  
Resposta inflamatória e alérgica

**Dissertação de Mestrado em Análises Aerobiológicas**

**Departamento de Biologia / Universidade de Évora**  
**Director do Curso: Prof. Doutor Carlos Sinogas**  
**Orientador: Prof. Doutor Rui Brandão**  
**Co-orientadora: Dr.ª Maria Paula Pinheiro**



172 828

Aluna N.º 4136

## Dedicatória

— À minha família, que soube compreender a minha ausência em muitos momentos, desde que ingressei no mestrado até à conclusão desta tese;

— Ao meu marido, por aguentar os meus momentos de ansiedade nos meses em que me dediquei ao mestrado;

— Em especial aos meus dois filhos, pela menor atenção no acompanhamento escolar e pela menor disponibilidade ao longo destes dois anos.

Bem hajam!

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Carlos Sinogas pelos ensinamentos ministrados e pela disponibilidade e incentivo sempre manifestados.

Ao Professor Doutor Rui Brandão pelo apoio como orientador e pelo conhecimento transmitido ao longo deste curso de mestrado.

À Dr.<sup>a</sup> Maria Paula Pinheiro pelo apoio incondicional como co-orientadora e pelo empenho na concretização desta tese de mestrado.

Ao Dr. Luís Ribeiro, Presidente do Conselho de Administração da Unidade Local de Saúde do Norte Alentejano, E.P.E., pela autorização para a realização de grande parte do estudo na Instituição.

À Dr.<sup>a</sup> Maria Antónia Ceia pela gentil cedência de equipamento fundamental para a elaboração deste estudo.

A todos os colaboradores do Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde do Norte Alentejano, familiares e amigos que participaram neste estudo, tornando possível a sua realização.

E, *last but not least*, aos colegas de curso e a todos os professores que comigo partilharam o seu saber.

A todos,  
O meu Muito Obrigada.

## Resumo

Endotoxinas bacterianas são lipopolissacáridos da membrana externa das bactérias Gram-negativas e são responsáveis pela libertação de citocinas no organismo humano. Estas citocinas podem exacerbar a sintomatologia de determinadas patologias, nomeadamente do foro pulmonar, agravando a sua situação clínica. A procura de melhor conforto habitacional, com a criação de micro ambientes “artificiais” dentro de casa, oferece bem-estar, mas por vezes arrasta consigo uma maior quantidade de poluentes aéreos *indoor*, nomeadamente bioaerossóis. A influência das bactérias Gram-negativas em suspensão *indoor* nos níveis basais dos marcadores analíticos sanguíneos de resposta inflamatória e alérgica, é um ponto importante a ter em consideração quando se pretende elevar o grau de conforto de uma habitação sem implicações negativas para a saúde humana. Este estudo demonstra que a presença das endotoxinas bacterianas *indoor*, na ausência de patologia aguda, não prejudica o ser humano e a melhoria das condições habitacionais não degrada o estado fisiológico dos indivíduos.

### **Bacterial endotoxins versus Inflammatory and allergic response**

#### *Summary*

*Bacterial endotoxins are lipopolysaccharides found in the outer membrane of Gram-negative bacteria and are responsible for the release of cytokines in the human body. These cytokines may exacerbate the symptoms of certain diseases, including pulmonary events, worsening their medical condition. The demand for better housing comfort with the creation of "artificial" micro-environments in the house, offers well-being, but often brings a greater quantity of indoor air pollutants, including bioaerosols. The influence of suspended indoor Gram-negative bacteria in basal levels of blood analytical markers of inflammatory and allergic rhinitis, is an important point to consider when attempting to raise the comfort level of a dwelling without negative implications for human health. This study proves that the presence of indoor bacterial endotoxin in the absence of acute pathology, do not affect humans and the improvement of living conditions does not degrade the physiological status of individuals.*

## Abreviaturas

$\alpha$ 1-AT – alfa 1-antitripsina	MASP – Serina proteases activadoras do complemento
ALB – Albumina	MBL – Lectina ligadora da manose
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico	MBP – Proteína ligadora da manose
APCs – Células apresentadoras de antígeno	MC – Célula mastocitária
CAMs – Moléculas de adesão celular	M-CSF – Factor estimulante de colónias de monócitos
CD – <i>Cluster</i> de diferenciação	MIP – Proteína inflamatória macrofágica
CRP – Proteína C reactiva	MN – Monócitos
CTLs – Células linfóides citotóxicas	MyD88 – Factor de diferenciação mielóide 88
ECF-A – Factor quimiotático eosinofílico de anafilaxia	NCF – Factor quimiotático neutrofilico
Fc $\epsilon$ RI – Receptor de alta afinidade para a IgE	NF-kB – Factor nuclear kB
Fe – Ferro	OSM – Oncostatina M
FIB – Fibrinogénio	PAF – Factor de activação plaquetar
G-CSF – Factor estimulante de colónias de granulócitos	PAI – Inibidor do activador do plasminogénio
GlyCAM – Molécula de adesão celular dos gânglios linfáticos	PC – Fosfocolina
GM-CSF – Factor estimulante de colónias de granulócitos/monócitos	PECAM – Molécula de adesão do endotélio da célula plaquetar
GRA – Granulócitos	PSGL – Glicoproteína de ligação específica da P-selectina
HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal	SLP76 – Domínio leucocitário com proteína específica de 76 kDa
ICAM – Molécula de adesão intercelular	SNC – Sistema nervoso central
IFN- $\gamma$ – Interferão-gama	SRS-A – Substância reactiva lenta de anafilaxia
IgE – Imunoglobulina E	Syk – Proteína cinase iniciadora de sinal
IgG – Imunoglobulina G	TIBC – Capacidade total de fixação do ferro
IgSF – Superfamília das imunoglobulinas	TLR – <i>Toll-like receptor</i>
IL – Interleucina	TNF – Factor de necrose tumoral
IRA – Insuficiência renal aguda	TRAM – Molécula adaptadora relacionada com o TRIF
IRF – Factor regulador do interferão	TRF – Transferrina
ITAM – Imunoreceptor activador de tirosina	TRIF – Domínio adaptador na resposta à activação dos TRLs
LAT – <i>Linker</i> de activação das células T	UIBC – Capacidade de fixação do ferro não saturado
LBP – Proteína ligadora do lipopolissacárido	VCAM – Molécula de adesão da célula vascular
LFA – Função linfocitária associada ao antígeno	VEMS – Volume expiratório máximo por segundo
LIF – Factor inibidor de leucemia	VSV – Vírus da estomatite vesicular
LPS – Lipopolissacárido	
MAC – Complexo de ataque da membrana	
MAdCAM – Molécula de adesão celular da mucosa adressina	

**Palavras-chave:** Adesão celular; Alergia; Amostragem de ar; Asma; Bioaerossóis *indoor*; Endotoxinas bacterianas; Imunoglobulina E; Inflamação; Lipopolissacárido; Sistema do complemento.

# Índice

1. Introdução .....	10
1.1. <i>Relevância do tema</i> .....	10
1.2. <i>Aspectos históricos</i> .....	11
1.3. <i>Organização do trabalho</i> .....	11
2. Objectivo .....	10
3. Expectativa .....	13
4. Revisão bibliográfica .....	14
4.1. <i>Endotoxinas bacterianas</i> .....	14
4.1.1. <u>Conceitos estruturais</u> .....	14
4.1.2. <u>Mecanismos de acção</u> .....	16
4.1.2.1. Receptores membranares .....	16
4.1.2.2. Activação do Sistema do Complemento .....	21
4.1.2.3. Formação do Complexo de Ataque da Membrana .....	23
4.1.3. <u>Migração de células para o local de inflamação</u> .....	25
4.1.3.1. Adesão celular .....	25
4.1.3.2. Extravasamento celular .....	29
4.1.4. <u>Mediadores da fagocitose e inflamação</u> .....	31
4.1.5. <u>Desgranulação celular e libertação de mediadores</u> .....	32
4.1.6. <u>Alterações na saúde humana</u> .....	37
4.1.7. <u>Marcadores analíticos</u> .....	41
4.2. <i>Utilização terapêutica</i> .....	42
5. Metodologia .....	44
5.1. <i>Análise microbiológica do ar</i> .....	44
5.1.1. <u>Técnica de amostragem</u> .....	44
5.2. <i>Testes analíticos em amostras sanguíneas</i> .....	45
5.2.1. <u>Métodos de ensaio</u> .....	45
5.2.1.1. Proteína C reactiva .....	46
5.2.1.2. $\alpha$ 1-antitripsina .....	46
5.2.1.3. Fibrinogénio .....	46
5.2.1.4. Granulócitos e Monócitos .....	46
5.2.1.5. Albumina .....	46
5.2.1.6. Transferrina .....	46
5.2.1.6.1. <u>Capacidade Total de Fixação do Ferro</u> .....	47
5.2.1.6.1.1. <i>Capacidade de Fixação do Ferro Não Saturado</i> .....	47
5.2.1.6.1.2. <i>Ferro sérico</i> .....	47
5.2.1.7. Imunoglobulina E .....	48
5.2.1.8. MultiRAST (Pó de casa e Ácaros) .....	48
6. Resultados .....	49
6.1. <i>Tratamento e análise de dados</i> .....	51
6.1.1. <u>Marcadores de resposta inflamatória</u> .....	51
6.1.1.1. Contagens celulares .....	51
6.1.1.2. Proteínas de fase aguda .....	52
6.1.1.3. Proteínas constitutivas .....	52
6.1.2. <u>Indicadores de alergia</u> .....	52
6.1.3. <u>Características das habitações</u> .....	54
6.1.4. <u>Patologias e sintomatologia associadas</u> .....	55
6.2. <i>Análise de interferências</i> .....	57
7. Conclusões .....	59
Bibliografia .....	60
Anexo .....	63

## Índice de Figuras

Figura 4-1 (Modelo molecular das membranas interna e externa da <i>E. coli</i> ) .....	14
Figura 4-2 (Estrutura do Kdo2-lípido A na <i>E. coli</i> K-12) .....	15
Figura 4-3 (Lipopolissacáridos bacterianos: constituição química) .....	15
Figura 4-4 (Estrutura química do LPS/Componentes do complexo receptor TLR4-MD2-CD14) 17	
Figura 4-5 (Sinalização do TLR4-MD2 dependente e independente do CD14) .....	17
Figura 4-6 (Detecção da endotoxina pelas células e função de sinalização do receptor TLR4) .	18
Figura 4-7 (Reconhecimento das superfícies bacterianas pela MBL) .....	19
Figura 4-8 (Funções da lectina ligadora da manose) .....	19
Figura 4-9 (CRP ligada às bactérias ou a superfícies celulares alteradas) .....	20
Figura 4-10 (Vias do sistema do complemento) .....	20
Figura 4-11 (Activação da cascata do complemento) .....	22
Figura 4-12 (Resultado final da activação do complemento) .....	23
Figura 4-13 (Estrutura da C5 convertase) .....	23
Figura 4-14 (Formação do complexo de ataque da membrana) .....	24
Figura 4-15 (Função facilitadora da fagocitose pelo complemento) .....	24
Figura 4-16 (Principais famílias de moléculas de adesão celular - CAMs) .....	26
Figura 4-17 (Tipos de selectinas) .....	27
Figura 4-18 (Estrutura das integrinas) .....	27
Figura 4-19 (Neutrófilos deixando o sangue e migrando para os locais de infecção) .....	28
Figura 4-20 (Adesão dos leucócitos ao endotélio/Representação das superfícies moleculares) .	30
Figura 4-21 (Importância das citocinas secretadas pelos macrófagos) .....	32
Figura 4-22 (Estrutura do receptor de alta afinidade da IgE - FcεRI) .....	33
Figura 4-23 (Ligação ao imunoreceptor FcεRI e fosforilação das tirosinas) .....	34
Figura 4-24 (Mecanismo de secreção dos mastócitos) .....	35
Figura 4-25 (Efeitos biológicos dos mediadores químicos libertados por mastócitos activados)	36
Figura 4-26 (Efeitos locais e sistémicos da libertação de TNF-α pelos macrófagos) .....	39
Figura 4-27 (Actividade biológica do TNF-α) .....	42
Figura 5-1 ( <i>Spin Air</i> – Dispositivo de amostragem de ar) .....	44
Figura 5-2 (Placas de Petri de Agar MacConkey com desenvolvimento de UFCs) .....	45



## Índice de Tabelas

Tabela 4.1 (Proteínas de fase aguda) .....	41
Tabela 6.1 (Resultados obtidos nos métodos analíticos) .....	49
Tabela 6.2 (Respostas obtidas nos questionários) .....	50

## Índice de Gráficos

Gráficos 6.1 (Correlação entre as percentagens celulares e as UFCs/L de ar) .....	51
Gráfico 6.2 (Correlação entre a proteína C reactiva e as UFCs/L de ar) .....	52
Gráficos 6.3 (Correlação das proteínas fibrinogénio e $\alpha$ 1-antitripsina com as UFCs/L de ar) ..	52
Gráficos 6.4 (Correlação entre as proteínas constitutivas e as UFCs/L de ar) .....	53
Gráfico 6.5 (Comparação entre os níveis de IgE e as UFCs/L de ar) .....	53
Gráfico 6.6 (Comparação dos resultados do teste MultiRAST com as UFCs/L de ar) .....	53
Gráficos 6.7 (Correlação entre a idade das habitações e as UFCs/L de ar) .....	54
Gráficos 6.8 (Comparação entre o piso e a ventilação das habitações com as UFCs/L de ar) ..	54
Gráficos 6.9 (Comparação entre a existência de doença crónica e as UFCs/L de ar) .....	55
Gráficos 6.10 (Comparação entre alergia ou espirros/irritação e as UFCs/L de ar) .....	56
Gráfico 6.11 (Comparação entre a toma de medicamentos e as UFCs/L de ar) .....	56
Gráficos 6.12 (Influência dos medicamentos nas contagens celulares) .....	57
Gráficos 6.13 (Influência dos medicamentos nos marcadores de resposta inflamatória) .....	57
Gráficos 6.14 (Influência dos medicamentos nas proteínas constitutivas) .....	58
Gráficos 6.15 (Influência dos medicamentos nos marcadores de alergia) .....	58

# 1. Introdução

## 1.1. Relevância do tema

As habitações têm sido adaptadas ao longo dos tempos, de modo a se tornarem mais eficientes em termos energéticos e de conforto, processo que parece estar associado ao aumento da concentração de certos contaminantes na atmosfera. O aumento da prevalência da asma e outras doenças respiratórias ao longo das últimas décadas, veio alertar para o papel importante dos microorganismos em suspensão na atmosfera (bioaerossóis) e outros alérgenos nessas alterações. As alergias e a asma estão entre as disfunções mais comuns, constituindo problemas sérios para a saúde pública. As reacções alérgicas são, de uma forma simplificada, respostas a um estímulo antigénico, resultando numa resposta imunológica baseada principalmente na produção de imunoglobulina da classe IgE. A exposição ao antigénio (ou alérgeno) desencadeia a libertação de moléculas mediadas pela IgE, causando sintomas que variam de espirros e dermatite até à inflamação dos pulmões no ataque asmático. A atopia e a exposição a alérgenos ambientais são exacerbantes conhecidos da asma, mas actualmente é atribuído um importante papel causal dos alérgenos *indoor* no desenvolvimento da doença.<sup>1,2,3</sup>

As endotoxinas são ubíquas no ambiente e representam um componente importante dos bioaerossóis, podendo a sua inalação induzir efeitos adversos na saúde humana. Como as bactérias podem ser encontradas em qualquer local da habitação, as hipóteses de libertação são elevadas. O lipopolissacárido (LPS), componente major da membrana exterior das bactérias Gram-negativas, é libertado quando a bactéria se rompe ou desintegra e é detectado pelas células dos mamíferos através de *Toll-like receptors* (TLR), resultando na activação de citocinas precursoras pró-inflamatórias. As endotoxinas, uma vez libertadas, interagem com vários sistemas celulares e humorais, podendo causar inflamação nas vias aéreas e conduzir aos sintomas da asma, visto induzirem uma resposta imunológica inata. A diversidade de respostas fisiológicas é direccionada à eliminação das endotoxinas, dos seus fragmentos, e até mesmo das bactérias Gram-negativas, e em seguida promover a reparação das lesões teciduais. Porém, devido a altas concentrações ou a maior sensibilidade a endotoxinas, as acções dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, em vez de contribuir, muitas destas respostas acabam por ser prejudiciais ao paciente.<sup>4,5,6,7,8</sup>

## 1.2. *Aspectos históricos*

Os estudos sobre a qualidade do ar interior evoluíram concomitantemente com a pesquisa científica sobre a qualidade do ar exterior. A importância da qualidade do ar e da sua relação com a saúde humana é secular, mas foi no século XIX que a atenção da população em geral despertou para este tema. No início do século XIV este tema era já discutido, sendo sugerida a ventilação adequada dos ambientes como solução para os problemas de qualidade do ar interior (*Roger W. Haines e Lewis Wilson*). Em 1942, *Neal e col.*, estabeleceram pela primeira vez a relação entre a presença de bactérias Gram-negativas e sintomas pulmonares. No entanto, até recentemente, os efeitos da poluição do ar interior na saúde humana tinham recebido pouca atenção da comunidade científica. O aumento do número de casos de indivíduos com sintomatologia inflamatória e doenças do foro alérgico, assim como o número crescente de reclamações relativas ao conforto humano dentro das habitações, vêm incentivando as pesquisas no âmbito da qualidade do ar interior.<sup>9,10</sup>

Nas últimas décadas ocorreram diversas modificações que poderão estar na origem do aumento da prevalência da asma. Mudou o estilo de vida, tornando-se mais sedentário e passando os indivíduos mais tempo dentro de edifícios, em interiores mais ricos em alérgenos e com maior poluição ambiental. A partir da década de setenta observou-se um aumento do uso de sistemas de ar condicionado nos edifícios. Esta tendência influenciou o projecto de edifícios onde a comunicação com o ar externo é minimizada, o que pode originar uma maior concentração de poluentes gerados no ambiente interior.<sup>9,11</sup>

## 1.3. *Organização do trabalho*

O trabalho está distribuído por sete capítulos. Neste primeiro capítulo pretendeu fazer-se uma abordagem geral sobre a temática a desenvolver e explicar o porquê da importância deste estudo. Nos segundo e terceiro capítulos faz-se referência ao objectivo e à expectativa esperada. O capítulo quatro é dedicado à revisão bibliográfica dos conceitos de endotoxina bacteriana e sua acção no organismo humano. Faz-se ainda a descrição dos mecanismos de resposta inflamatória e alérgica, assim como a interferência das endotoxinas nestes processos. Os capítulos cinco e seis dizem respeito ao “trabalho de campo”, informando sobre a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a respectiva análise. O sétimo capítulo dedica-se às conclusões finais, apresentando-se no final a bibliografia consultada.

### 3. Expectativa

Tendo os aparelhos de ar condicionado e humidificadores influência negativa na saúde humana, sendo as endotoxinas bacterianas prejudiciais em determinadas patologias e permanecendo os indivíduos progressivamente mais tempo em ambientes interiores, espera estabelecer-se uma relação directa entre a concentração das bactérias Gram-negativas em suspensão no ar interior das habitações e o nível basal de alguns marcadores analíticos da resposta inflamatória e alérgica dos seus habitantes. Espera-se ainda, que os níveis mais elevados de endotoxinas estejam associados a características particulares das habitações em causa, podendo assim fornecer-se alguma ajuda para a melhoria do estado de saúde dos indivíduos.

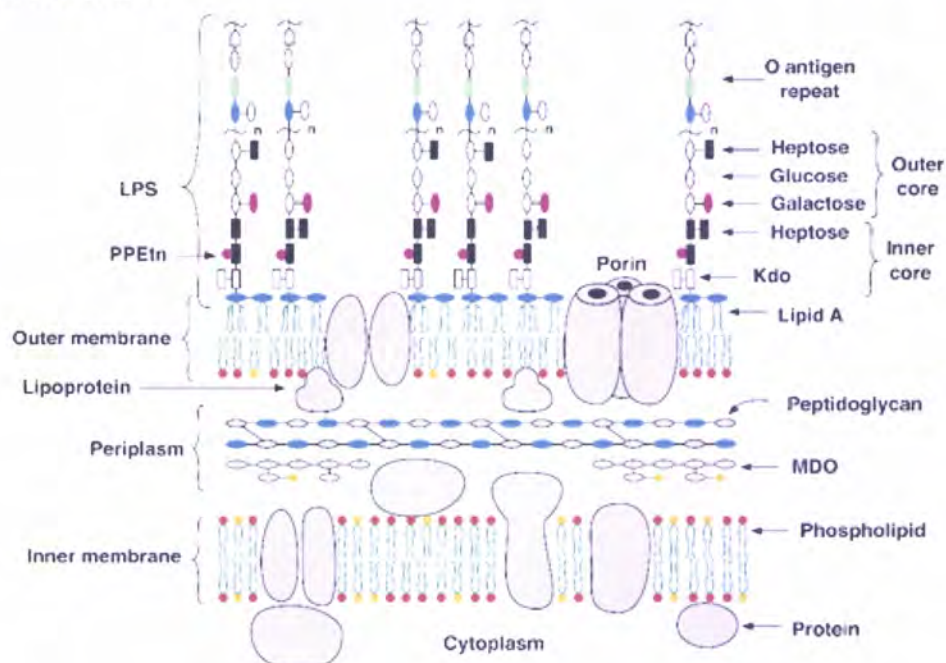
## 4. Revisão bibliográfica

### 4.1. Endotoxinas bacterianas

*Richard Pfeiffer* (1858-1945) foi o primeiro a usar o termo “endotoxina” quando descobriu que as propriedades tóxicas do *Vibrio cholerae* estavam presentes mesmo após as bactérias terem sido submetidas a lise. Ele propôs ainda que esta toxina termoestável era um componente da própria célula bacteriana. Posteriormente, o patologista italiano *Eugenio Centanni* (1863-1948) notou que as propriedades tóxica e de indução de febre da endotoxina eram inseparáveis, e intitulou esta toxina de “pirotoxina”.<sup>12</sup>

#### 4.1.1. Conceitos estruturais

Toxinas são substâncias, geralmente proteínas, sintetizadas por bactérias patogénicas que, directa ou indirectamente, alteram, inactivam ou destroem um ou mais componentes vitais das células do hospedeiro. As proteínas bacterianas com acção tóxica, secretadas em baixas concentrações, são denominadas exotoxinas. Outras substâncias tóxicas não-proteicas, como o lipopolissacárido ou LPS, componente estrutural da membrana externa das bactérias Gram-negativas e denominado de endotoxina, não utilizam um mecanismo enzimático para danificar as células do hospedeiro e são activas em concentrações muito menores. As endotoxinas apresentam-se como agregados macromoleculares de cerca de um milhão de daltons (endotoxina livre) (Figura 4-1) e têm uma elevada capacidade de multiplicação já que requerem escassos nutrientes.<sup>10,13</sup>



**Figura 4-1** – Modelo molecular das membranas interna e externa da *E. coli*.<sup>14</sup>

As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que envolve a parede celular. Esta membrana apresenta uma camada fosfolipídica voltada para a parede celular e uma camada sobreposta constituída pelo lipopolissacárido. A porção lipídica do LPS, designada por *lipido A*, é um fosfolípido de base glucosamina contendo ácidos gordos com o grupo 3-hidroxi (Figura 4-2). Quimicamente é diferente de todos os outros lípidos da membrana biológica, é a fracção mais constante do LPS e é a responsável pela toxicidade característica da molécula. As diferentes espécies bacterianas diferem na composição do lípido A, logo as propriedades toxicológicas das endotoxinas também diferem. O aquecimento aumenta o seu efeito tóxico, visto que as proteínas desnaturam e conseqüentemente as endotoxinas acedem mais facilmente aos receptores celulares.<sup>10,13</sup>

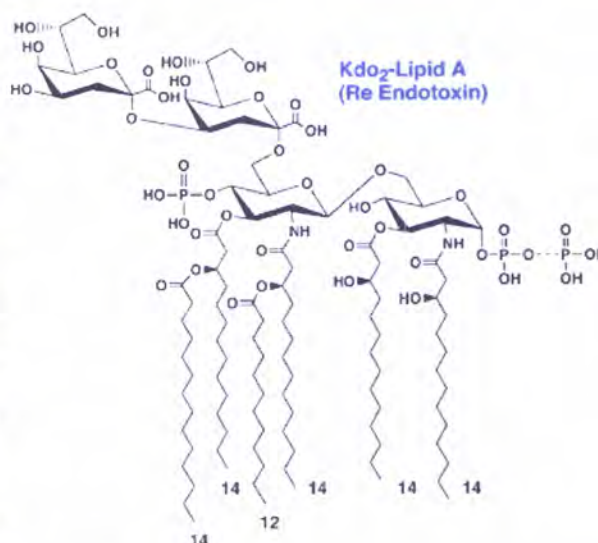


Figura 4-2 – Estrutura do Kdo2-lípido A na *E. coli* K-12.<sup>14</sup>

A porção polissacarídica consiste num polissacarídeo principal – constituído por açúcares de 6, 7 e 8 carbonos – e um polissacarídeo “O” – constituído por açúcares de 6 carbonos – que se projecta da superfície da célula (Figura 4-3). Os açúcares variam entre diferentes organismos e entre linhagens de uma mesma espécie de bactéria. O polissacarídeo “O” do LPS é um importante determinante antigénico, sendo também denominado de antígeno O ou antígeno somático. Em estirpes de tipo “selvagem”, existem açúcares adicionais no núcleo e no antígeno O. Estes não são necessários ao crescimento, mas reforçam a sobrevivência em ambientes hostis e ajudam a bactéria a evadir-se do sistema imunitário.<sup>13,14</sup>

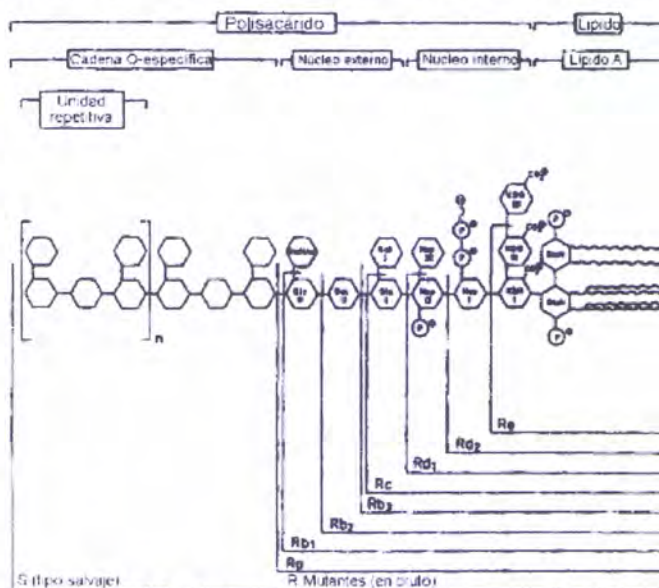


Figura 4-3 – Lipopolissacáridos bacterianos: constituição química.<sup>15</sup>

As endotoxinas conservam a sua actividade mesmo quando as bactérias já estão mortas. O LPS pode ser libertado durante os ciclos normais de crescimento da bactéria ou após destruição da bactéria pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Em estudos quantitativos, não deve utilizar-se exclusivamente o número de bactérias viáveis, no entanto, existe uma boa relação entre a contagem de bactérias Gram-negativas e a quantidade de endotoxinas no ar.<sup>10,16</sup>

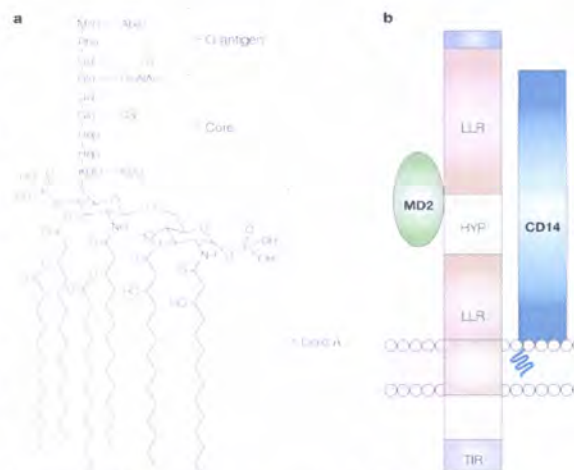
#### 4.1.2. Mecanismos de acção

As endotoxinas bacterianas estimulam a produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias. A reacção inflamatória local desencadeia alterações sistémicas que são descritas como reacção de fase aguda. A endotoxina é capaz de induzir as células mononucleares humanas (macrófagos activados) a produzir e libertar muito precocemente duas citocinas, antigamente chamadas citocinas primárias (designação em desuso), a interleucina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estas duas citocinas integram a resposta imune e têm capacidade para aumentar a adesão de fagócitos e linfócitos ao endotélio. A IL-1 activa os linfócitos e o TNF- $\alpha$  tem um papel central na resposta anti-infecciosa pelas suas propriedades inflamatórias, activando os macrófagos e polimorfonucleares, para além de ter um importante papel como indutor de necrose e induzir febre. Além disso, estimula a citotoxicidade doutras células efectoras imunes, como são os eosinófilos, células NK e linfócitos T. Estas citocinas são especialmente importantes, por poderem actuar em sinergismo quando produzidas em excesso na infecção sistémica e precipitarem a síndrome do choque séptico.<sup>14,17,18</sup>

##### 4.1.2.1. Receptores membranares

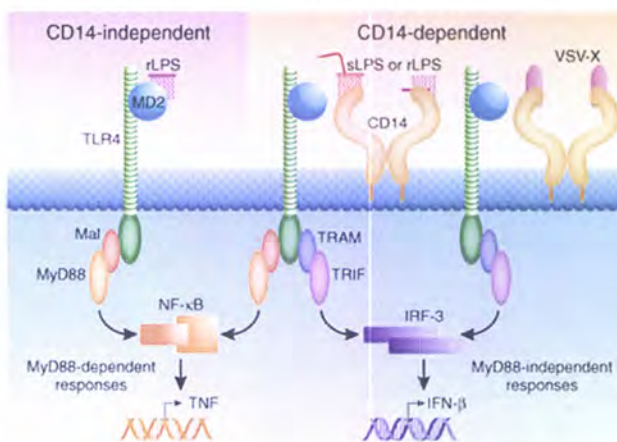
O mecanismo de reconhecimento do LPS pela célula é bem conhecido. O primeiro passo é o reconhecimento da endotoxina pela membrana celular, o qual envolve a participação de três proteínas. A proteína ligadora do lipopolissacárido, LBP, é a responsável pela primeira etapa do processo de ligação do LPS pela LBP em circulação e sua entrega ao complexo de *Toll like receptor* (TLR) que contém duas proteínas adicionais, CD14 e MD2 (Figura 4-4). O TLR4 é o receptor chave para a maioria dos lipopolissacáridos bacterianos, contudo o TLR2 também liga algumas variantes de LPS. Na maioria dos casos é necessária a estrutura tripartida, verificando-se a ligação ao CD14, depois ao MD2 e, de uma forma indirecta, ao TLR4. O TLR4 é de extrema importância porque tem um domínio intracelular, é uma estrutura transmembranar necessária para o LPS ser reconhecido. As células que não expressam constitutivamente CD14, tais como as células dendríticas, fibroblastos, células musculares lisas vasculares e endoteliais, são capazes de responder ao LPS pela interacção com moléculas CD14

circulantes. Estas moléculas remanescentes das moléculas mCD14 da superfície da membrana celular e que foram libertadas, podem ser encontradas como moléculas solúveis no soro (sCD14). Os complexos LPS-LBP ligam-se ao sCD14 e estimulam as células. A activação pode, no entanto, ocorrer sem CD14, requerendo neste caso a acção de mais lípido A.<sup>2,8,14,19,20</sup>



**Figura 4-4** – a | Estrutura química do LPS. b | Componentes do complexo receptor TLR4-MD2-CD14.<sup>21</sup>

O complexo TLR4-MD2 pode fixar o LPS de bactérias rugosas sem a presença do CD14. A sinalização por este complexo está limitada à via dependente de MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), usando as proteínas adaptadoras Mal e MyD88 para activação do NF- $\kappa$ B, resultando na transcrição de TNF. O TLR4-MD2 consegue ligar-se ao LPS de bactérias rugosas (rLPS) e de bactérias lisas (sLPS) num processo dependente do CD14. Para além dos sinais dependentes de MyD88, estes complexos sinalizam também de uma forma independente do MyD88, respondendo via TRAM e TRIF, liderando a activação do IRF-3 e a transcrição do IFN- $\beta$ . Um terceiro modo de sinalização utiliza um produto da infecção pelo VSV (VSV-X) que activa o IRF-3 mas não o NF- $\kappa$ B, num processo que requer CD14 e TLR4 (Figura 4-5). Embora a participação do TLR4-MD2 não tenha sido observada, esta resposta é consistente com o modo de sinalização independente de MyD88.<sup>22</sup>



**Figura 4-5** – Sinalização do TLR4-MD2 dependente e independente do CD14.<sup>22</sup>

Após este reconhecimento tem início o processo de transdução de sinal, o qual pode produzir a resposta celular. O sinal que se transmite intracitoplasma e depois para dentro do núcleo da célula, é um mecanismo complexo que inclui a activação e autofosforilação das cinases com produção dum factor nuclear, o  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Após a activação do complexo de receptores e a activação de uma série de proteínas cinases, dá-se a fosforilação e degradação do inibidor I $\kappa$ B, através da activação das I $\kappa$ B cinase  $\alpha$  (I $\kappa$ k- $\alpha$ ) e  $\beta$  (I $\kappa$ k- $\beta$ ), com a subsequente activação do factor activador nuclear (NF- $\kappa$ B), considerado o maior alvo intracelular do *stress* oxidativo. Uma vez activado, o NF- $\kappa$ B é



translocado para o núcleo celular e liga-se a uma sequência específica na região promotora, aumentando a expressão de vários genes que têm um papel importante na inflamação aguda e/ou crónica. Estes genes são responsáveis pela transcrição de várias citocinas e quimiocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, além de enzimas pró-inflamatórias (Figura 4-6). A sua libertação vai promover a resposta inflamatória, captando macrófagos e neutrófilos para o local de inflamação, sendo assim os mediadores inflamatórios deste processo. Este mecanismo é responsável pelo papel vital que a sinalização através do TLR4 exerce no desenvolvimento da asma e demonstra a estreita conexão entre a exposição a endotoxinas e a prevalência de asma.<sup>2,19,20</sup>

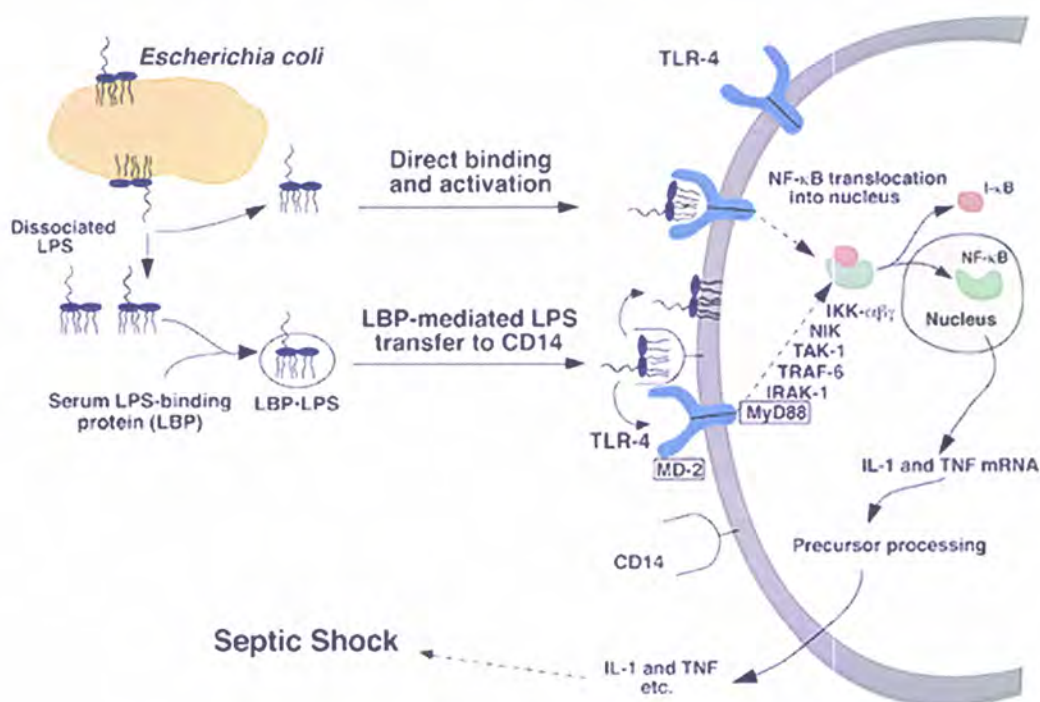


Figura 4-6 – Detecção da endotoxina pelas células e função de sinalização do receptor TLR-4 na imunidade inata.<sup>14</sup>

A lectina ligadora da manose (MBL) e a proteína C reactiva (CRP) são receptores padrão solúveis que se ligam à superfície microbiana e promovem a sua opsonização. Ambos têm ainda a capacidade para activar o sistema do complemento quando estão ligados à superfície dos microorganismos, fazendo assim do invasor um alvo provável para a lise mediada pelo complemento.<sup>2</sup>

A MBL, também chamada proteína ligadora da manose (MBP), é uma proteína sérica dependente do cálcio, com um papel na resposta imune inata por ligação a carboidratos da superfície de uma vasta gama de patógenos. A MBL pertence à família das colectinas, é produzida no fígado por estímulo inflamatório e pode opsonizar bactérias por marcação da superfície do patógeno, facilitando o reconhecimento e ingestão por fagócitos. A sua habilidade para accionar a C3 convertase clássica através da associação das serina-proteases (MASP-1 e MASP-2) qualifica-a como uma opsonina. Apresenta

uma região semelhante ao colagénio, a qual interage com as partes efectoras do sistema imune inato, e uma região lectina (homóloga ao factor C1q do complemento) que liga moléculas de açúcares da superfície bacteriana (grupos N-acetilglucosamina), ausentes na superfície das células dos mamíferos, facilitando a sua opsonização e fagocitose (Figura 4-7). A MBL é uma

proteína de fase aguda produzida durante as respostas inflamatórias, modula a inflamação e promove a *clearance* das células apoptóticas. Muitas células estão protegidas da ligação da MBL e activação do complemento através das moléculas de ácido siálico, as quais previnem o acesso da MBL aos açúcares terminais. As células apoptóticas perdem os seus resíduos siálicos, expondo assim os açúcares terminais à MBL. Na ligação a MBL interage com o receptor calreticulina da superfície dos fagócitos, promovendo a *clearance* das células mortas (Figura 4-8).<sup>2,23,24,25</sup>

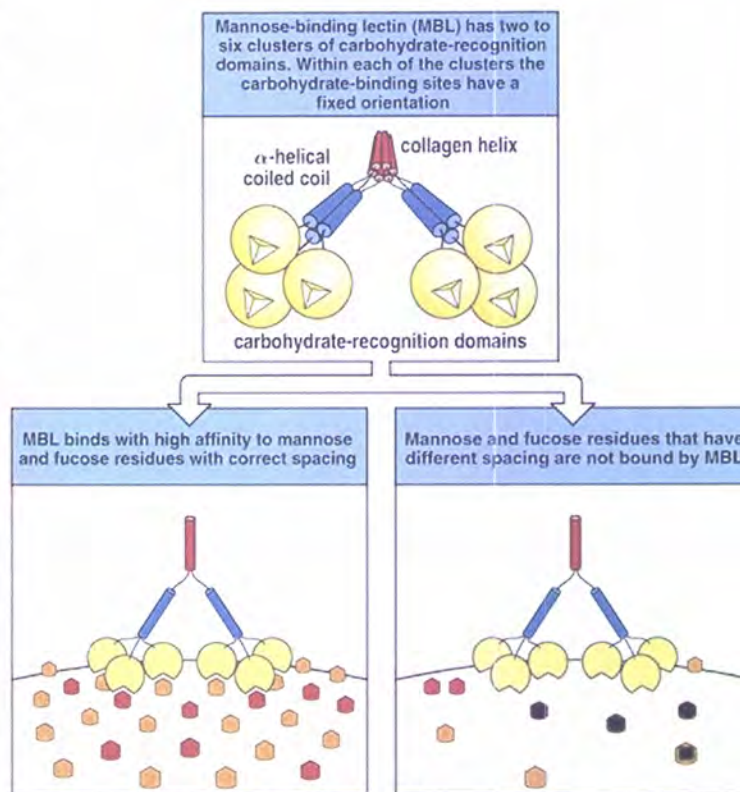
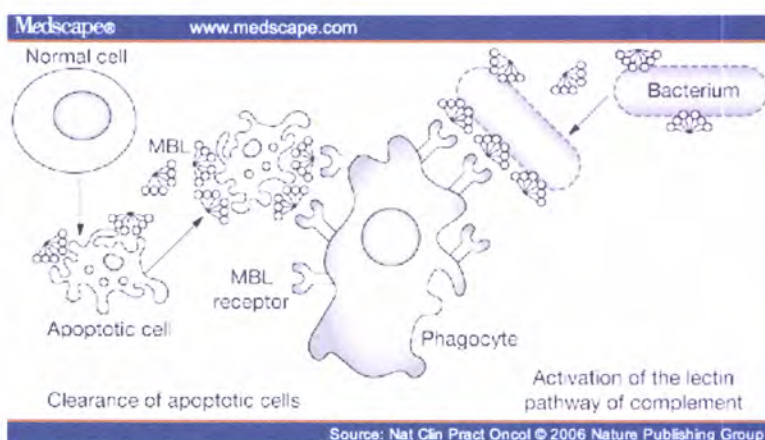


Figure 2-11 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

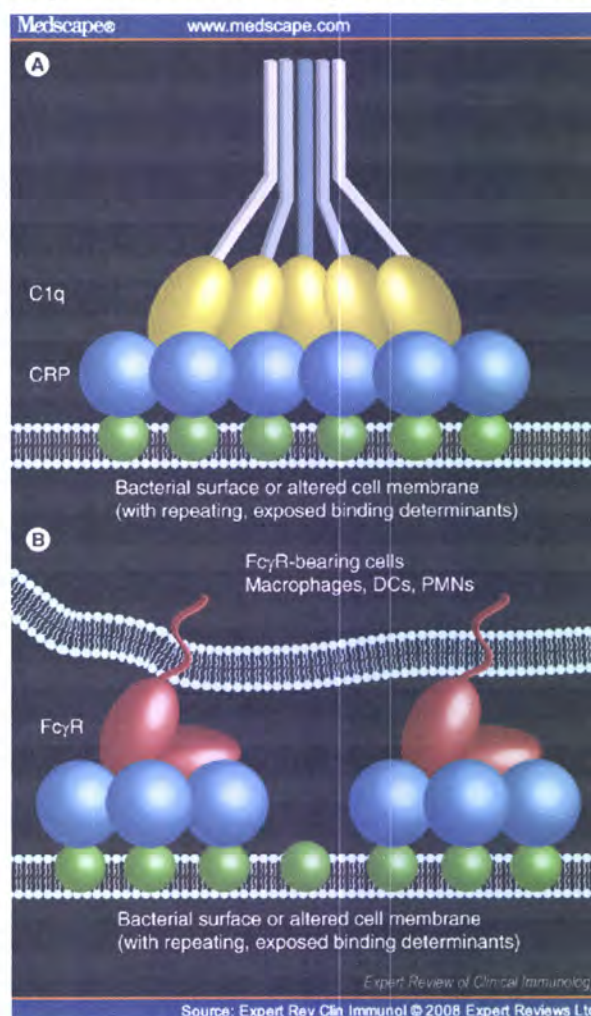
**Figura 4-7** – A MBL reconhece as superfícies bacterianas pelo espaçamento particular dos seus resíduos de hidratos de carbono.<sup>23</sup>

promovendo a *clearance* das células mortas (Figura 4-8).<sup>2,23,24,25</sup>



**Figura 4-8** – Funções da lectina ligadora da manose.<sup>24</sup>

A CRP é reconhecida há muito tempo como uma opsonina inata. O ligando da CRP é uma fosfocolina (PC), à qual a CRP se liga de uma forma dependente do cálcio e que está amplamente distribuída nos ácidos teicóicos, carboidratos capsulares e lipopolissacáridos das bactérias e outros microorganismos. A PC está também presente na camada exterior das membranas biológicas, mas normalmente não está exposta na superfície das células, ficando acessível apenas após lesão devido a deposição do complemento, por acção de algumas fosfolipases e em células mortas por apoptose ou necrose. A morte celular produz uma mudança dos fosfolípidos (flip-flop) entre as camadas interior e exterior da membrana, resultando num enriquecimento da camada exterior em fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, as quais estão normalmente presentes na camada interior. Esta redistribuição torna os fosfolípidos mais susceptíveis à hidrólise pela fosfolipase  $A_2$  secretora, produzindo lisofosfolípidos, incluindo lisolecitina. A presença da lisolecitina na camada exterior permite a ligação da CRP ao grupo polar da PC na superfície celular. Esta proteína é sintetizada pelos hepatócitos em resposta a citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-6, e é produzida rapidamente em resposta à inflamação e dano tecidual. A CRP unida ao ligando é um potente activador do sistema do complemento, produzindo uma activação selectiva de componentes precoces sem a formação do complexo de ataque da membrana (MAC) (Figura 4-9). A CRP liga-se a uma ampla variedade de microorganismos e ao activar o complemento, provoca a deposição da opsonina C3b na superfície dos microorganismos. As células fagocíticas, que expressam receptores C3b, podem então facilmente fagocitar os microorganismos com o C3b ligado. Este processo resulta no recrutamento de factor H pela CRP para inibir a amplificação da via alternativa do complemento e a formação da C5 convertase. Como resultado, a activação do complemento iniciada pela CRP resulta no recrutamento da função opsonizante do sistema, mas não resulta em efeitos pró-inflamatórios e morte da membrana.<sup>2,24,26</sup>



**Figura 4-9** –CRP ligada às bactérias ou a superfícies celulares alteradas. **A** | Ligação do pentâmero de C1q responsável pela activação da cascata do complemento **B** | Ligação do Fc $\gamma$ R na superfície de macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos.<sup>26</sup>

#### 4.1.2.2. Activação do Sistema do Complemento

A activação do sistema do complemento dá-se pela via alternativa ou pela via da lectina (Figura 4-10). Pelo facto de não requerer a presença de anticorpo, a via alternativa integra o sistema imune inato e a sua activação envolve quatro proteínas séricas: C3, factor B, factor D e properdina. Na maioria dos casos é iniciada pelos constituintes da superfície celular que são estranhos ao hospedeiro, entre os quais se encontram constituintes da parede celular das bactérias Gram-negativas.<sup>2</sup>

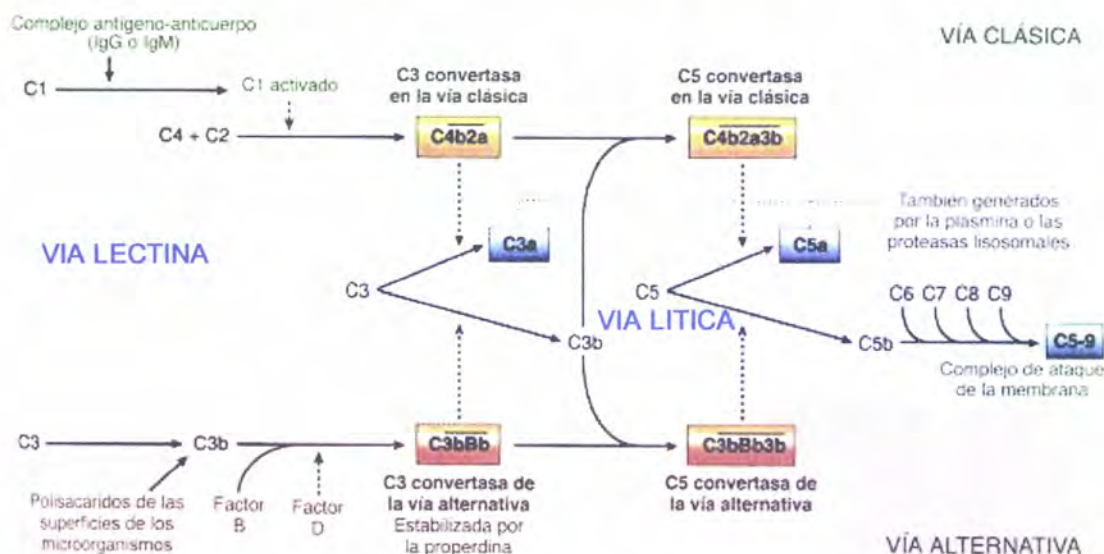
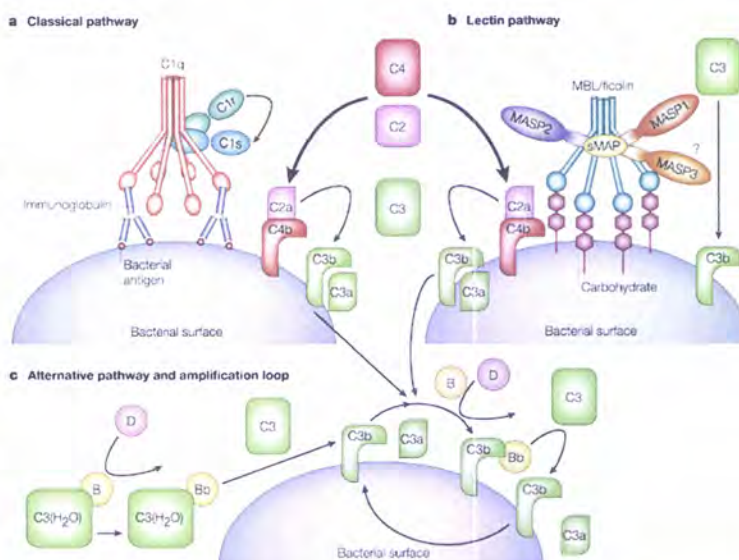


Figura 4-10 – Vias do sistema do complemento.<sup>27</sup>

Na via alternativa, o C3 sérico, que contém uma ligação tioéster instável, é sujeito a hidrólise espontânea lenta resultando C3a e C3b. O componente C3b, ou uma molécula funcionalmente semelhante designada C3i ou C3(H<sub>2</sub>O), pode ligar-se a superfícies antigénicas estranhas ao organismo, como as presentes nas células bacterianas. Na maioria das células dos mamíferos, as membranas têm elevados níveis de ácido siálico, o que contribui para uma rápida inactivação das moléculas de C3b unidas às células do hospedeiro; consequentemente esta vinculação raramente leva a novas reacções na membrana das células hospedeiras. Visto que muitas superfícies antigénicas estranhas (ex. parede celular bacteriana) têm baixos níveis de ácido siálico, o vínculo do C3b a estas superfícies permanece activo por tempo mais prolongado. Assim, o C3b presente na superfície de células estranhas pode ligar-se a outra proteína sérica chamada factor B, formando um complexo estabilizado por Mg<sup>2+</sup>. A ligação do C3b expõe um local no factor B que serve como substrato para uma proteína sérica enzimaticamente activa, chamada factor D. O factor D cliva a ligação factor B–C3b, libertando um pequeno fragmento (Ba), que se difunde, e gerando  $C3bBb$ . Este complexo tem actividade C3 convertase e tem uma semi-vida de apenas 5 minutos, excepto se for estabilizado pela proteína sérica properdina, aumentando para 30 minutos a sua semi-vida. O  $C3bBb$

gerado pode activar o C3 não hidrolizado para gerar mais C3b autocataliticamente. Desta forma, o passo inicial é repetido e amplificado, de modo que mais de  $2 \times 10^6$  moléculas de C3b podem ser depositadas na superfície antigénica em menos de 5 minutos. A actividade C3 convertase do  $C3bBb$  gera o complexo  $C3bBb3b$ , que exhibe actividade C5 convertase. O componente C3b não enzimático liga-se ao C5, e o componente Bb hidrolisa subsequentemente a ligação C5 para gerar C5a e C5b; este último liga-se à superfície antigénica.<sup>2,25</sup>

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos específicos. Como as lectinas que activam o complemento se ligam a resíduos de manose, esta via é por vezes designada de via MBLectina ou via da lectina ligadora da manose. A via da lectina, à semelhança da via alternativa, não depende de anticorpo para a sua activação, sendo activada pela ligação da lectina



**Figura 4-11** – Activação da cascata do complemento.<sup>28</sup> Nature Reviews | Immunology

ligadora da manose (MBL) aos resíduos de manose nas glicoproteínas ou carboidratos da superfície dos microorganismos, incluindo algumas bactérias Gram-negativas. Após a ligação da MBL à superfície da célula ou ao patógeno, as serina-proteases que reconhecem a MBL, MASP-1 e MASP-2, ligam-se a ela. O complexo activo formado por esta associação causa a clivagem e a activação do C4 e do C2 (Figura 4-11). Esta forma de activação dos componentes C2-C4 para formar C5 convertase, sem a necessidade de ligação a anticorpo específico, representa um importante mecanismo de defesa inato comparável com a via alternativa, mas utilizando elementos da via clássica com excepção das proteínas C1. Após clivagem do C2 e C4 forma-se o complexo  $C4b2a$  designado C3 convertase. A hidrólise do pequeno fragmento C3a da porção amino terminal da cadeia  $\alpha$  do componente C3, pela C3 convertase, dá origem ao C3b. Uma única molécula de C3 convertase pode originar mais de 200 moléculas de C3b, resultando numa grande amplificação deste passo da cascata. Algum do C3b liga-se ao  $C4b2a$  para formar um complexo trimolecular  $C4b2a3b$ , designado C5 convertase. O componente C3b deste complexo liga o C5 e altera a sua conformação, de modo que o complexo  $C4b2a$  possa clivar o C5 em C5a, que se difunde, e C5b, que ataca o C6 e inicia a formação do complexo de ataque da membrana.<sup>2</sup>

A sequência terminal da activação do complemento envolve C5b, C6, C7, C8 e C9, os quais interagem sequencialmente para formar uma estrutura macromolecular chamada complexo de ataque da membrana (MAC). Este complexo forma um grande canal na membrana da célula alvo, permitindo a difusão livre de iões e pequenas moléculas através da membrana (Figura 4-12).<sup>2</sup>

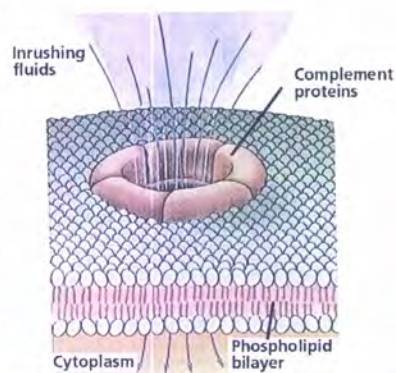


Figura 4-12 – Resultado final da activação do complemento.<sup>29</sup>

#### 4.1.2.3. Formação do Complexo de Ataque da Membrana

O resultado final da activação das vias do complemento é a produção de uma C5 convertase activa ( $C3bBb3b$  ou  $C4b2a3b$ ). A C5 tem duas cadeias de proteínas,  $\alpha$  e  $\beta$ , podendo o terminal amina da cadeia  $\alpha$  ser clivado de duas formas: por acção da C5 convertase activa e após ligação da C5 ao componente C3b não enzimático da convertase (Figura 4-13). Assim resulta o pequeno fragmento C5a, que se difunde, e o fragmento maior C5b, que se liga à superfície da célula alvo e fornece o local de ligação para os componentes subsequentes do complexo de ataque da membrana. O componente C5b é extremamente lábil e torna-se inactivo após 2 minutos, excepto se o C6 se ligar estabilizando a sua actividade.<sup>2</sup>

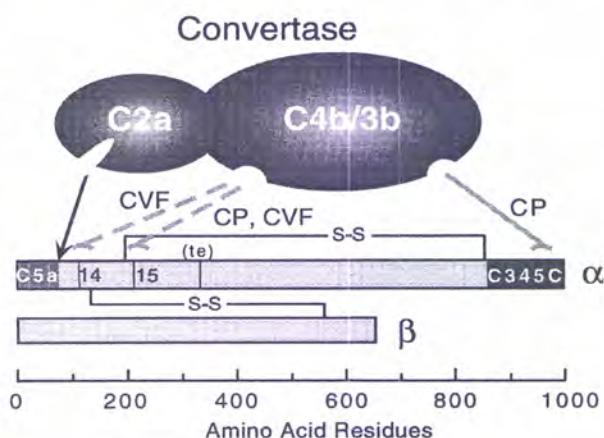


Figura 4-13 – Estrutura da C5 convertase.<sup>30</sup>

Após esta fase, as reacções do complemento decorrem na superfície hidrófila das membranas. O C5b6 liga-se ao C7 e o complexo resultante sofre uma transição estrutural expondo regiões hidrofóbicas, as quais servem de locais de ligação para os fosfolípidos das membranas das células alvo. Os locais de ligação hidrofóbicos permitem assim que o complexo C5b67 se insira na dupla camada fosfolipídica. A ligação subsequente do C8 induz uma mudança configuracional no C8, expondo a sua região hidrofóbica, interagindo com a membrana plasmática. O complexo C5b678 cria um pequeno poro que conduz à lise da célula. A fase final da formação do MAC é a ligação e polimerização do C9 ao complexo C5b678, podendo ligar-se até 16 moléculas de C9 a um único complexo. Durante a polimerização as moléculas de C9 sofrem também uma mudança estrutural, permitindo-lhes a inserção na membrana. O MAC

completo, que apresenta uma forma tubular e o tamanho de um poro funcional, consiste no complexo C5b678 rodeado pelo complexo poli-C9 (Figura 4-14). Os íões e pequenas moléculas podem assim difundir-se livremente através do canal central do MAC, a célula não consegue manter a sua estabilidade osmótica e é destruída por um afluxo de água e perda de electrólitos.<sup>2</sup>

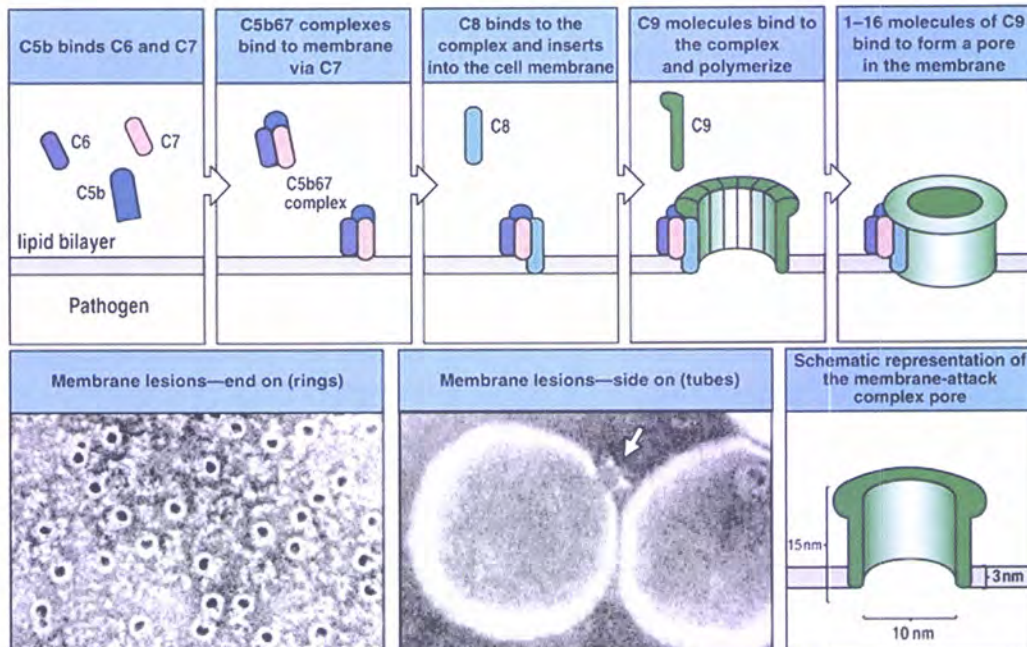
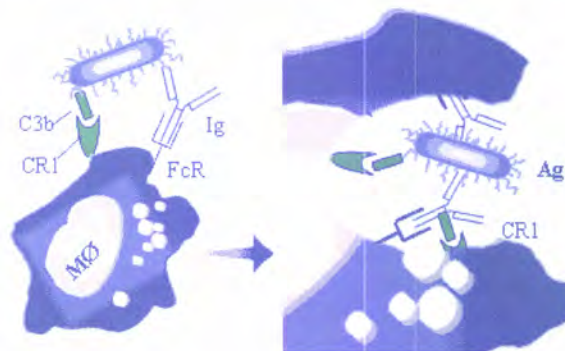


Figure 2-35 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

**Figura 4-14** – Formação do complexo de ataque da membrana.<sup>30</sup>

Alguns do C3b gerado pela actividade da C3 convertase não se associa ao  $C4b2a$ , difunde-se e reveste complexos imunes e partículas antigénicas, funcionando como uma opsonina e podendo ligar-se directamente a membranas celulares. O C3b é a opsonina major do sistema do complemento, no entanto o C4b e iC3b têm também actividade opsonizante. As células fagocíticas, assim como outras células, expressam receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) que ligam C3b, C4b ou iC3b (Figura 4-15). O antígeno revestido com C3b liga-se às células que expressam CR1. Se a célula é um fagócito (neutrófilo, monócito ou macrófago), a fagocitose será reforçada, assim como o início da transformação antigénica, e é acelerada a produção dos anticorpos específicos.<sup>2,25</sup>



**Figura 4-15** – Função facilitadora da fagocitose por parte de algumas fracções do complemento.<sup>31</sup>

O sistema do complemento tem também importantes efeitos na imunorregulação da função das células T, seja estimulando o C5a ou inibindo o C3a, funções da imunidade mediada por células. De igual modo, o factor C3b ou os seus derivados unidos a membranas facilitam a cooperação entre as células imunes e actuam na estimulação das células T e B, provavelmente devido à sua capacidade de promover a adesão célula-célula.<sup>2</sup>

O complemento serve assim como um importante mediador da resposta humoral, amplificando a resposta e convertendo-a num mecanismo de defesa para a destruição dos microorganismos invasores. O MAC medeia a lise celular, enquanto outros componentes do complemento, ou produtos de cisão, participam na resposta inflamatória. A cascata do complemento é vista muitas vezes como tendo apenas a finalidade de lise celular, mas vários peptídeos gerados durante a formação do MAC têm um papel decisivo no desenvolvimento de uma resposta inflamatória efectiva.<sup>2</sup>

O sistema do complemento é, geralmente, bastante efectivo na lise de bactérias Gram-negativas. Contudo, mecanismos que interfiram com este sistema ajudam algumas estirpes bacterianas a sobreviver, desenvolvendo resistência à lise e aumentando a virulência do microorganismo. Na *Escherichia coli* e *Salmonella*, esta resistência está associada com o forte fenótipo, o qual é caracterizado pela presença de longas cadeias laterais na fracção lipídica A do LPS da parede celular. O aumento do LPS na parede das estirpes pode prevenir a inserção do MAC na membrana bacteriana, logo o complexo é libertado em vez de formar um poro. As *Pseudomonas* secretam uma enzima, a elastase, que inactiva as anafilatoxinas C3a e C3b, diminuindo assim a reacção inflamatória localizada.<sup>2</sup>

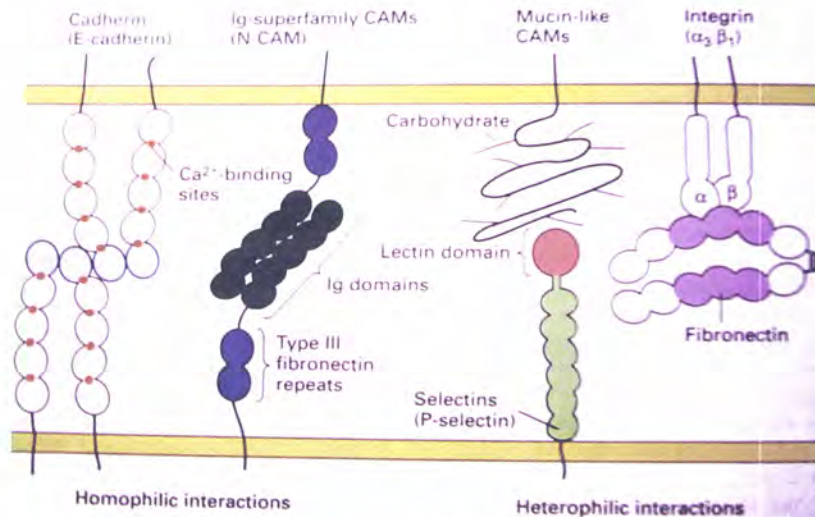
### 4.1.3. Migração de células para o local de inflamação

#### 4.1.3.1. Adesão celular

Para que os leucócitos circulantes entrem nos tecidos inflamados, as células precisam de aderir e passar entre as células endoteliais que revestem as paredes dos vasos sanguíneos, um processo chamado extravasamento. Para a interacção entre as células circulantes e o endotélio são fundamentais as moléculas de adesão celular (CAMs), glicoproteínas expressas pelas células endoteliais e específicas para os leucócitos. Algumas destas proteínas membranares são expressas constitutivamente, outras são expressas apenas como resposta a concentrações locais de citocinas produzidas durante a resposta inflamatória. Os linfócitos, monócitos e granulócitos em circulação expressam receptores que se ligam às CAMs no endotélio vascular, conferindo a estas células a possibilidade de extravasamento para os tecidos. A maioria destas moléculas



pertence a três famílias de proteínas: selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas (Figura 4-16).<sup>2,32</sup>



**Figura 4-16** – Principais famílias de moléculas de adesão celular (CAMs).<sup>32</sup>

As selectinas estabelecem as interações iniciais de adesão entre leucócitos intravasculares e o endotélio vascular, em zonas de inflamação. Possuem um grupo N-terminal semelhante à lectina que permite a ligação específica destas moléculas a carboidratos, interagindo primariamente com moléculas de carboidrato sializadas, as quais estão frequentemente associadas a moléculas semelhantes à mucina. A família das selectinas inclui três proteínas, designadas por L, E, e P (Figura 4-17). A maioria dos leucócitos circulantes expressam L-selectina, enquanto E-selectina e P-selectina são expressas nas células endoteliais vasculares. A L-selectina está constitutivamente presente na superfície microvilosa da maioria dos leucócitos e tem como função a firme fixação inicial dos leucócitos ao endotélio vascular. As mucinas são proteínas ricas em serina e treonina e altamente glicosiladas. Possuem estruturas que lhes permitem apresentar ligandos carboidratos sializados para as selectinas. A L-selectina nos leucócitos reconhece carboidratos sializados em duas moléculas mucina-like, CD34 e GlyCAM-1, expressas nalgumas células endoteliais dos gânglios linfáticos e uma PSGL-1 encontrada nos neutrófilos e que interage com E- e P-selectinas expressas no endotélio inflamado. As E- e P-selectinas encontradas na superfície endotelial, funcionam como sítios de ligação para a L-selectina. A E-selectina é sintetizada e expressa exclusivamente no endotélio vascular após estimulação pelas citocinas e lipopolissacáridos. Cerca de quatro horas após a exposição às citocinas ocorre o pico da expressão, que perdura por doze horas. A P-selectina é uma glicoproteína de membrana localizada nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais. Após a exposição das células endoteliais aos mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , histamina, trombina, C5a) a P-selectina é rapidamente translocada para a superfície celular, onde é expressa transitoriamente (trinta minutos) e pode agir como receptor de leucócitos.<sup>2,33</sup>

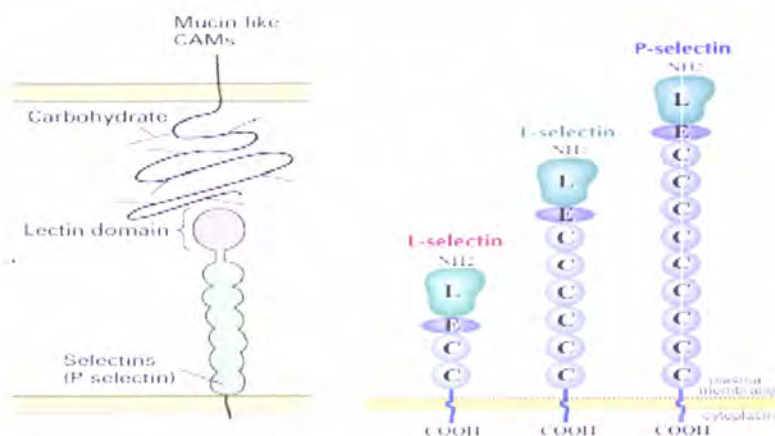
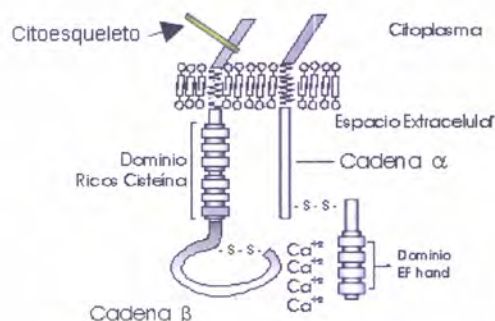
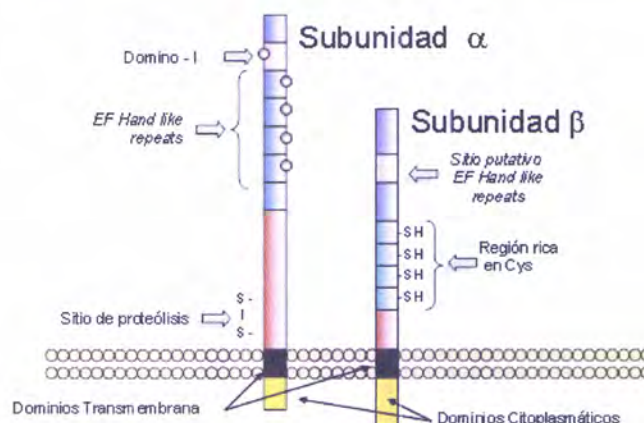


Figura 4-17 – Tipos de selectinas.<sup>34</sup>

As integrinas são proteínas heterodiméricas (cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ ) expressas pelos leucócitos, associadas de forma não covalente e que facilitam quer a aderência ao endotélio vascular quer outras interações célula-célula (Figura 4-18). Existem várias categorias de integrinas, consoante as subunidades que contêm, que permitem às diferentes populações de leucócitos a ligação a diferentes CAMs da superfamília das imunoglobulinas, expressas ao longo do endotélio vascular. A maior parte da proteína encontra-se no meio extracelular, enquanto o citoesqueleto de actina e os componentes de sinalização se encontram associados ao pequeno domínio citoplasmático. As mais importantes para adesão endotelial são as integrinas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  (CD18) e  $\beta_7$ . A subfamília  $\beta_2$  é expressa em todos os leucócitos e consiste numa subunidade  $\beta_2$  ligada a uma das quatro subunidades  $\alpha$ : CD11a ( $\alpha_L$ ), CD11b ( $\alpha_M$ ), CD11c ( $\alpha_X$ ) ou CD11d ( $\alpha_D$ ). Os linfócitos produzem fundamentalmente CD11a/CD18 (LFA-1 ou *lymphocyte function associated antigen-1*), enquanto que os eosinófilos, neutrófilos e monócitos produzem as quatro  $\beta_2$  integrinas.<sup>2,35,36</sup>



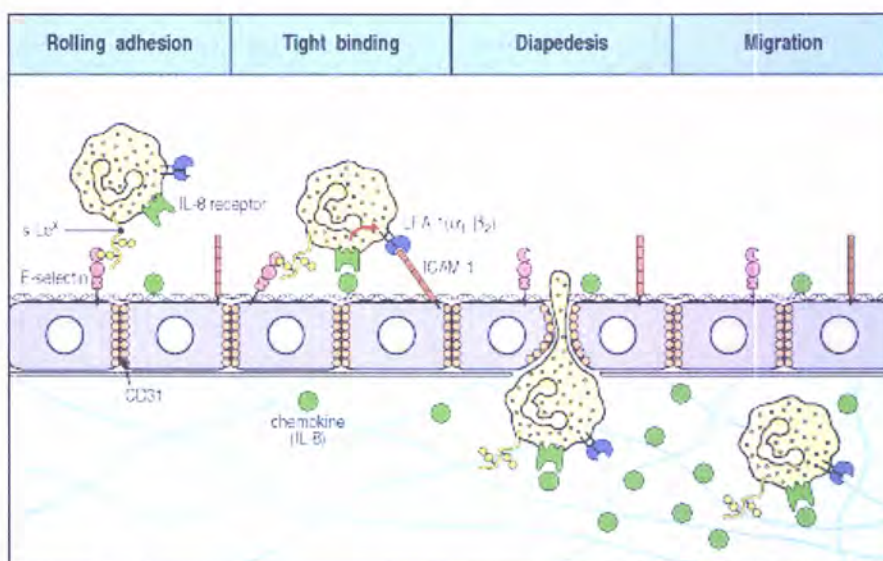
Fuente: Gompertz y cols., 2002



Fuente: Dzamba y cols., 2002

Figura 4-18 – Estrutura das integrinas.<sup>36</sup>

Diversas moléculas de adesão apresentam um número variável de domínios semelhantes à imunoglobulina e assim são classificados na superfamília das imunoglobulinas (IgSF). Cerca de 40% dos polipeptídeos da superfície dos leucócitos pertencem a esta superfamília. Neste grupo estão presentes moléculas expressas nas células endoteliais vasculares, como as ICAM-1, -2, -3 (*intercellular adhesion molecule 1,2,3*), a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), a PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) e a MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*), importantes na adesão leucócito-endotélio e que se ligam a várias moléculas de integrinas. A transcrição da ICAM-1 é regulada por várias citocinas e pelo LPS. A VCAM-1 tem uma expressão basal muito baixa nas células endoteliais, porém pode ser aumentada sob a acção de citocinas. A PECAM-1 é expressa pelas células endoteliais, leucócitos e plaquetas. As mesmas citocinas que estimulam o aumento da expressão da ICAM-1 nas células endoteliais, determinam a redistribuição da PECAM-1 para a periferia da célula, sem afectar a quantidade total expressa por cada célula. Este processo pode facilitar a migração dos leucócitos entre as células endoteliais adjacentes (Figura 4-19). A MAdCAM-1 apresenta também um domínio mucina-*like* que serve como ligando para a L-selectina.<sup>2,35</sup>



**Figura 4-19** – Neutrófilos deixando o sangue e migrando para os locais de infecção.<sup>37</sup>

Após o primeiro passo, que envolve a ligação reversível dos leucócitos ao endotélio vascular através da interacção das selectinas induzidas no endotélio e os seus ligandos carboidratos no leucócito (E-selectina e o seu ligando s-Le<sup>x</sup>), a estabilização destas interacções ocorre com a indução da ICAM-1 no endotélio e a activação dos seus receptores LFA-1 e Mac-1 no leucócito, por resposta a quimiocinas como a IL-8. A adesão entre moléculas de CD31 (PECAM), expressas tanto nos leucócitos como na junção das células endoteliais, parece contribuir para o extravasamento.<sup>37</sup>

As CAMs funcionam ainda como moléculas sinalizadoras e têm uma participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune, como ocorre na asma. As CAMs são responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração selectiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até ao local da inflamação. As citocinas e outros mediadores inflamatórios influenciam o número e a função das CAMs. A selectividade depende do mediador e do tipo de célula envolvida.<sup>35</sup>

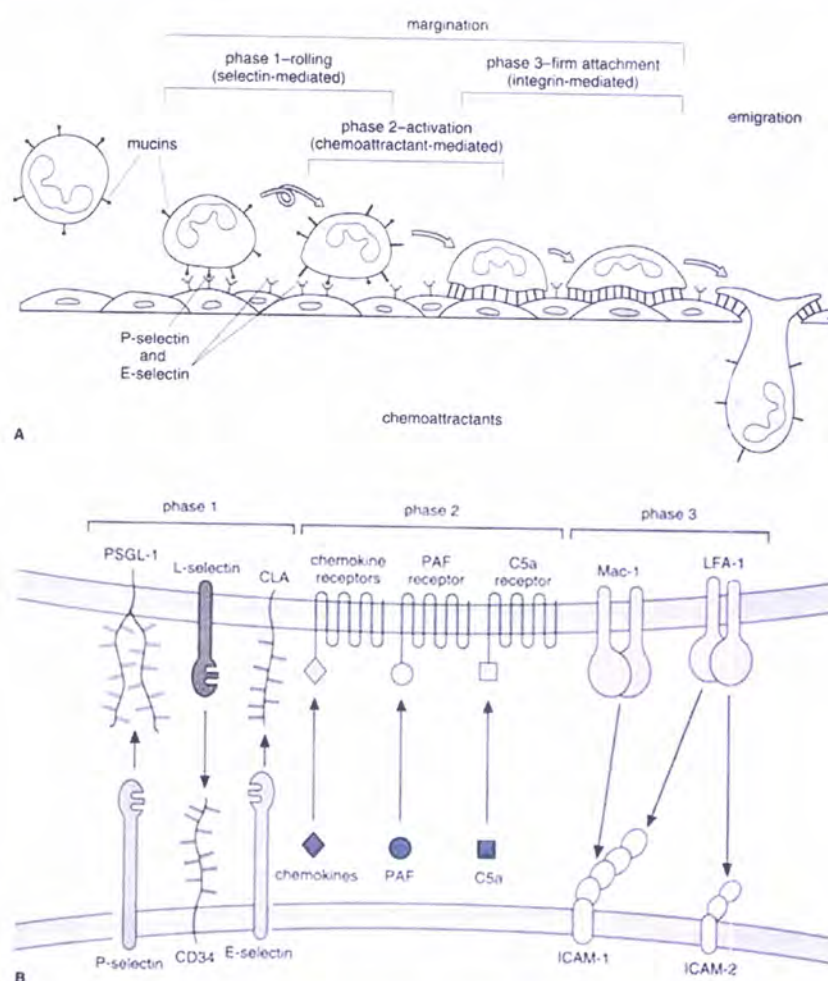
#### 4.1.3.2. Extravasamento celular

Quando se desenvolve uma resposta inflamatória, várias citocinas e outros mediadores inflamatórios actuam sobre os vasos sanguíneos locais, induzindo um aumento da expressão das CAMs endoteliais. O endotélio vascular é então activado ou inflamado. Os neutrófilos são geralmente as primeiras células a estabelecer ligação com o endotélio inflamado e extravasam para os tecidos. Para tal, os neutrófilos precisam de reconhecer o endotélio inflamado e aderir o suficiente para que não sejam arrastados pelo fluxo sanguíneo. Os neutrófilos ligados têm então de atravessar a camada endotelial e migrar para os tecidos subjacentes. Os monócitos e eosinófilos sofrem um processo semelhante de extravasamento.<sup>2</sup>

O processo de migração de leucócitos do lúmen vascular para locais de inflamação pode assim ser dividido em quatro passos:

1. Rolamento – leve ataque dos neutrófilos ao endotélio por baixa afinidade da interacção selectina-carbohidrato. Durante a resposta inflamatória, as citocinas e outros mediadores actuam no endotélio local, induzindo a expressão das moléculas de adesão da família das selectinas. A selectina E é, geralmente, a primeira a ser activada e interage com moléculas de adesão do neutrófilo, nomeadamente, a selectina leucocitária (L-selectina). As moléculas de E- e P-selectina ligam-se a moléculas de adesão mucina-like na membrana do neutrófilo ou com lactosaminoglicano sializado. Esta interacção prende brevemente o neutrófilo à célula endotelial, mas a leve força da circulação sanguínea depressa desprende o neutrófilo. As moléculas de selectina de outra célula endotelial tornam a amarrar o neutrófilo, repetindo-se este processo e desta forma o neutrófilo vai rolando ao longo do endotélio;
2. Activação por estímulo quimioatractivo – enquanto o neutrófilo rola são activados vários quimioatractantes, que são recursos permanentes da superfície celular endotelial ou são secretados localmente por células envolvidas na resposta inflamatória. As duas quimiocinas envolvidas na activação são a interleucina 8 (IL-8) e a proteína inflamatória macrofágica (MIP-1 $\beta$ ), estando também envolvidos o factor de activação plaquetar (PAF), os produtos de

- clivagem do complemento C5a, C3a e C5b67 e vários N-formil peptídeos produzidos por quebra de proteínas bacterianas durante a infecção;
3. Arrastamento e adesão – a ligação dos quimioattractantes aos receptores da membrana do neutrófilo desencadeia uma activação de sinal mediada por proteínas G associadas com o receptor. Este sinal induz uma mudança conformacional nas moléculas de integrina na membrana do neutrófilo, aumentando a sua afinidade para as moléculas de adesão da IgSF no endotélio. A subsequente interacção entre as integrinas e as CAMs da IgSF (ICAM e VCAM) estabiliza a adesão do neutrófilo à célula endotelial, permitindo a adesão firme da célula ao endotélio. É um fenómeno por “passos” em que o TNF- $\alpha$  activa o processo de rolamento e a IL-1 activa a adesão entre o leucócito e a célula endotelial;
  4. Migração transendotelial – pela activação de novas moléculas de adesão, de que se destacam as células I-CAM-1, há um processo de extravasamento e depois diapedese (quando a célula circulante passa a membrana basal) (Figura 4-20).<sup>2,19</sup>



**Figura 4-20** – A | Adesão dos leucócitos ao endotélio activado em três fases. B | Representação das superfícies moleculares dos neutrófilos e das células endoteliais com os respectivos ligandos durante o processo de migração e extravasamento. PSGL-1 – Glicoproteína de ligação da P-selectina; CLA – Antígeno cutâneo linfocitário; PAF – Factor activador plaquetário.<sup>38</sup>

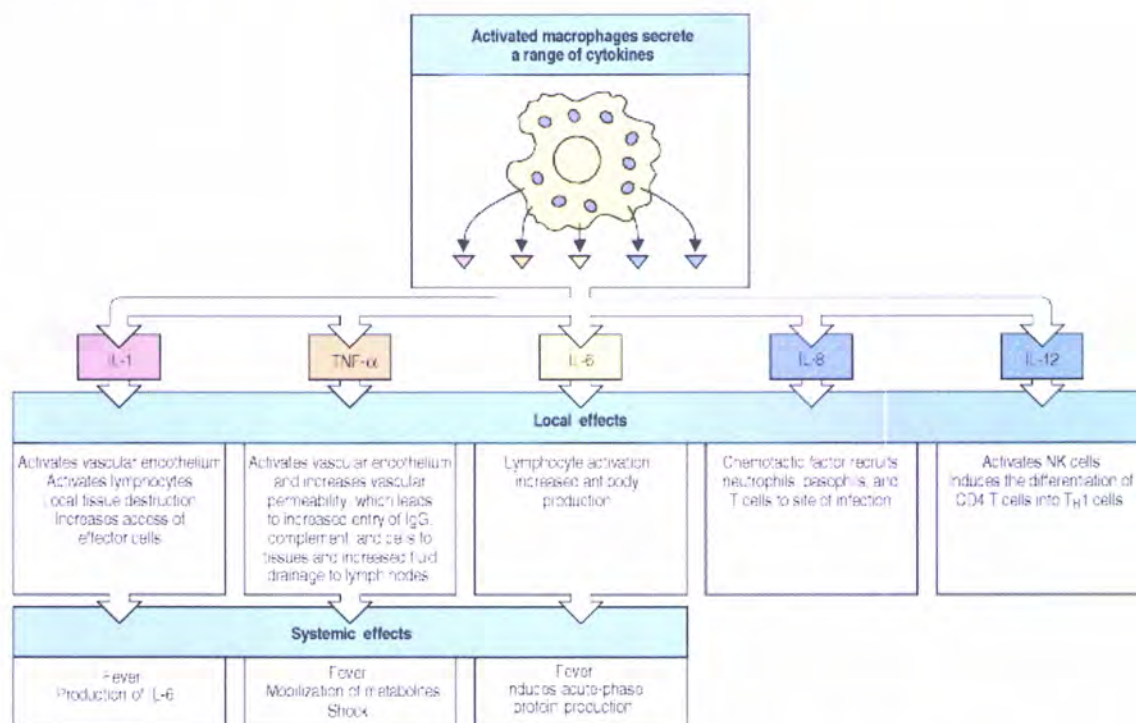
Para além deste papel na adesão leucocitária às células endoteliais vasculares, as CAMs nos leucócitos aumentam ainda a força das interacções funcionais entre células do sistema imunológico, como sejam células  $T_H$  e APCs,  $T_H$  e células B, e CTLs e células alvo.<sup>2</sup>

#### 4.1.4. Mediadores da fagocitose e inflamação

Em poucas horas após o início das mudanças vasculares descritas anteriormente, aderência dos neutrófilos às células endoteliais e sua migração para o espaço tecidual, estes neutrófilos fagocitam os patogénios invasores e libertam mediadores que contribuem para a resposta inflamatória. Após estimulação pelas endotoxinas bacterianas, os macrófagos produzem as proteínas inflamatórias macrofágicas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (ou CCL3 e CCL4 – *chemokine (C-C motif) ligand*), quimiocinas que activam os granulócitos humanos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agravam a inflamação neutrofilica aguda. As MIPs induzem ainda a síntese e libertação de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , dos fibroblastos e macrófagos. Os macrófagos chegam ao local cerca de 5 a 6 horas após o início da resposta inflamatória. Estes macrófagos são células activadas que exibem alto poder fagocitário e aumento da libertação de mediadores e citocinas que contribuem para a resposta inflamatória.<sup>2,39</sup>

Os macrófagos teciduais activados secretam três citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) que induzem muitas das alterações localizadas e sistémicas observadas na resposta inflamatória. Estas citocinas actuam localmente, induzindo a coagulação e aumentando a permeabilidade vascular. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 induzem um aumento da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais vasculares. Como exemplo, o TNF- $\alpha$  estimula a expressão de E-selectina e a IL-1 induz o aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1. Os neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes reconhecem estas moléculas de adesão na parede dos vasos, aderem e movem-se através da parede vascular em direcção aos tecidos. A IL-1 e o TNF- $\alpha$  actuam também nos macrófagos e células endoteliais induzindo a produção de quimiocinas que contribuem para o afluxo de neutrófilos, aumentando a adesão às células endoteliais vasculares e actuando como potentes factores quimiotáticos. Adicionalmente, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  activam os macrófagos e neutrófilos, promovendo o aumento da actividade fagocítica e aumentando a libertação de enzimas líticas nos tecidos. A IL-8 está envolvida na resposta inflamatória local, auxiliando na captação de neutrófilos para o local de infecção e a IL-12 activa as células NK (*natural killer*) e favorece a diferenciação das células T CD4 na resposta  $T_H1$  durante a imunidade adquirida. O resultado é um afluxo de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos para o local da lesão tecidual, onde estas células participam na *clearance* do antigénio e na cicatrização do tecido.<sup>2,37</sup>

Muitos efeitos sistémicos de fase aguda são devidos à acção combinada de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6. Cada uma destas citocinas actua no hipotálamo para induzir a resposta febril, sendo designadas de pirogénios endógenos. Dentro de 12-24 h após o início da resposta inflamatória de fase aguda, o aumento dos níveis destas citocinas (assim como o factor inibidor de leucemia (LIF) e da oncostatina M (OSM)) induz a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. O TNF- $\alpha$  actua ainda nas células endoteliais vasculares e macrófagos para induzir a secreção de factores estimulantes de colónias (M-CSF, G-CSF e GM-CSF), os quais estimulam a hematopoiese, resultando num transitório aumento do número de leucócitos sanguíneos necessários para combater a infecção (Figura 4-21).<sup>2,37</sup>



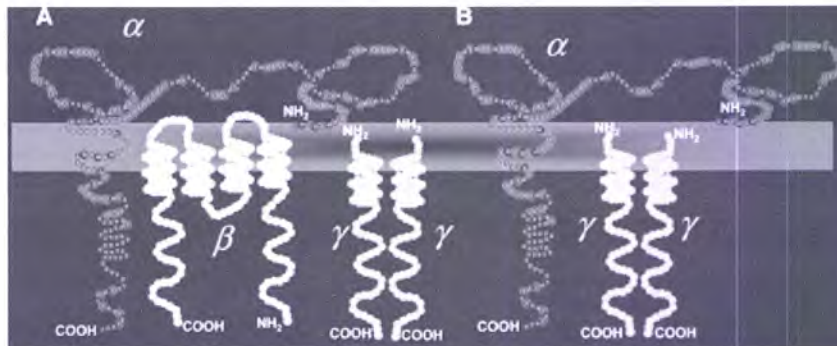
**Figura 4-21** – Importância das citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta a produtos bacterianos.<sup>37</sup>

#### 4.1.5. Desgranulação celular e libertação de mediadores

Os pequenos fragmentos que resultam da clivagem do complemento, C3a, C4a e C5a, têm importantes acções biológicas. Actuam directamente nos fagócitos, especialmente neutrófilos, aumentando a expressão dos receptores de superfície para C3b e iC3b. São também considerados anafilatoxinas, visto que se ligam a receptores dos mastócitos e basófilos sanguíneos e induzem desgranulação, com libertação de histamina e outros mediadores fisiologicamente activos.<sup>2,25</sup>

Imediatamente após a inalação do alergénio, os mastócitos tipo MC<sub>T</sub> (fenótipo que contém triptase) no pulmão e os mastócitos tipo MC<sub>TC</sub> (fenótipo que contém triptase e quimase) predominantes na mucosa nasal, previamente sensibilizados pela imunoglobulina E (IgE), são activados pela ligação do antigénio (ligação cruzada) aos receptores IgE da superfície da membrana celular. Ambos expressam o receptor de alta afinidade FcεRI, podendo assim participar nas reacções alérgicas dependentes da IgE. No entanto, funcionalmente os dois tipos de células apresentam diferenças: O MC<sub>T</sub> está relacionado com o sistema imune, enquanto que o MC<sub>TC</sub> apresenta acções de angiogénese e remodelação tecidual. A maior parte da IgE encontra-se ligada aos mastócitos teciduais, através do receptor FcεRI, possuindo uma semi-vida de 11 a 12 dias (livre no soro resiste apenas 2 dias). A primeira exposição ao alergénio resulta na produção de IgE pelos plasmócitos, ligando-se estas moléculas aos receptores específicos nos mastócitos. Após a segunda exposição ao antigénio, a ligação cruzada dos antigénios com IgE pré-formada ligada ao receptor produz a libertação e síntese de uma série de mediadores pela activação de diversas tirosina-cinases.<sup>40,41,42</sup>

Os mastócitos expressam constitutivamente o receptor FcεRI e a sua activação pode efectuar-se de forma dependente ou independente do FcεRI, receptor de alta afinidade para a IgE. Níveis elevados deste receptor estão presentes nos mastócitos e basófilos, enquanto níveis baixos são detectados em células dendríticas, monócitos, eosinófilos e nalgumas células B. Existem entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> receptores por mastócito e basófilo e a desgranulação ocorre com a agregação de 1 a 15% desses receptores.<sup>42</sup>

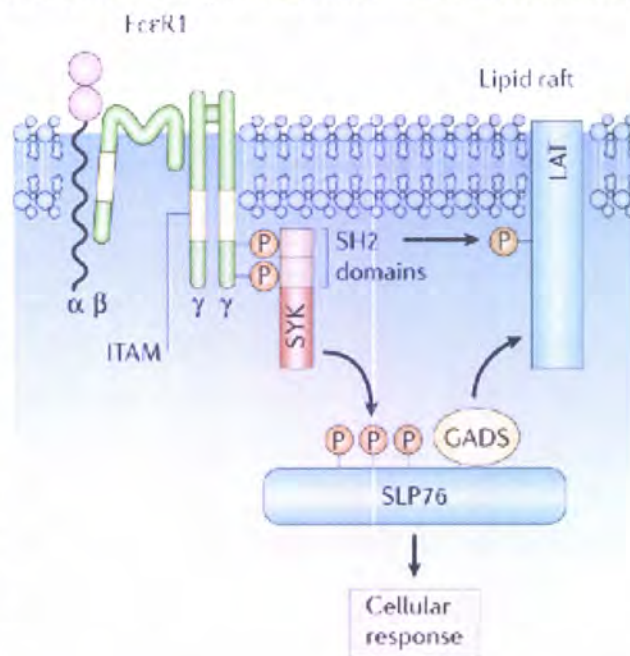


**Figura 4-22** – Estrutura do receptor de alta afinidade da IgE (FcεRI).<sup>43</sup>

Nos seres humanos o receptor FcεRI pode ser expresso como tetrâmero αβγ<sub>2</sub> ou trímero αγ<sub>2</sub>, dependendo do tipo de célula (Figura 4-22). Nos mastócitos e basófilos humanos o FcεRI responsável pela ligação da fracção Fc da IgE, é composto por uma cadeia α, uma cadeia β e duas cadeias γ ligadas por pontes dissulfito. A cadeia α é responsável pela ligação da IgE e as cadeias β e γ fornecem a transdução de sinal, ocorrendo uma série de reacções na membrana e no citoplasma (transdução de sinal, tradução e amplificação de sinal e activação de proteínas alvo/efectoras), com utilização de energia e Ca<sup>2+</sup>. A transdução de sinal é iniciada pela acção de uma proteína tirosina-cinase da



família da Src, *Lyn*, que está associada à cadeia  $\beta$  e que vai promover a fosforilação do imunoreceptor ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ . A função da fosforilação das tirosinas nas ITAMs é a ligação aos dois domínios SH2 da proteína cinase SYK (*signal-initiating-kinase*). A SYK activada é a chave para a fosforilação de diversas proteínas, como a LAT (*Linker of Activated T Cells*) na membrana plasmática e a SLP76 (*SH2-containing leucocyte-specific protein of 76 kDa*) no citoplasma (Figura 4-23). Esta cascata de transdução de sinal determina a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado intra e extracelular, libertação de mediadores por desgranulação, aumento da adesão mediada pelas integrinas e produção de citocinas. A fosforilação activa segundos mensageiros, resultando na formação de canais de cálcio e determinando o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula. A entrada do cálcio origina a formação do ácido araquidónico e promove a formação de microtúbulos necessários para o movimento dos grânulos até à membrana plasmática. A ligação cruzada activa também a adenilciclase, desencadeando um aumento transitório do AMPc. A proteína-cinase AMPc dependente fosforila as proteínas da membrana, resultando na expansão de mais de 1000 grânulos secretórios dos mastócitos e libertação de mediadores inflamatórios que desencadeiam os sintomas e sinais das reacções alérgicas. Os mastócitos sobrevivem à desgranulação e refazem o armazém de mediadores nos grânulos secretórios.<sup>41,43,44</sup>

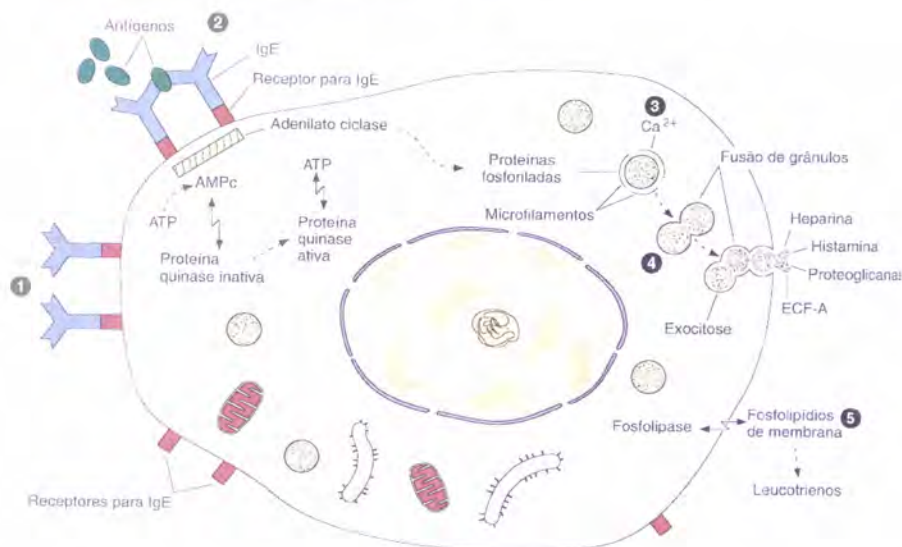


**Figura 4-23** – Ligação ao imunoreceptor FcεRI e fosforilação das tirosinas.<sup>45</sup>

Os basófilos têm função semelhante aos mastócitos, possuindo os mesmos mediadores nos seus lisossomas e possuindo também receptores para a IgE. Participam nas reacções alérgicas da mesma forma que os mastócitos, diferindo na sua localização, para além da estrutura morfológica e da origem, visto serem encontrados no sangue. A participação dos basófilos no choque anafilático é superior à dos mastócitos devido à sua presença na circulação sanguínea.<sup>46</sup>

A activação dos mastócitos de forma independente da ligação cruzada da IgE e do antígeno ao FcεRI, é uma via importante em reacções não imuno-mediadas, ou como amplificador das reacções mediadas pela IgE. Os mastócitos expressam receptores de baixa afinidade para IgG, denominados FcγRII e FcγRIII, cuja activação promove a adesão, desgranulação e síntese de  $\text{TNF-}\alpha$  pelos mastócitos.<sup>42</sup>

Os grânulos secretórios dos mastócitos contêm um complexo cristalino de mediadores pré-formados, que perdem a sua natureza cristalina após activação dos mastócitos. Os grânulos expandem-se, movem-se em direcção à membrana celular e fundem-se com ela, tornando o complexo solúvel e os mediadores como a histamina, as proteases e os proteoglicanos são libertados para o ambiente extracelular por um processo de difusão passiva, designado por exocitose (Figura 4-24).<sup>41</sup>



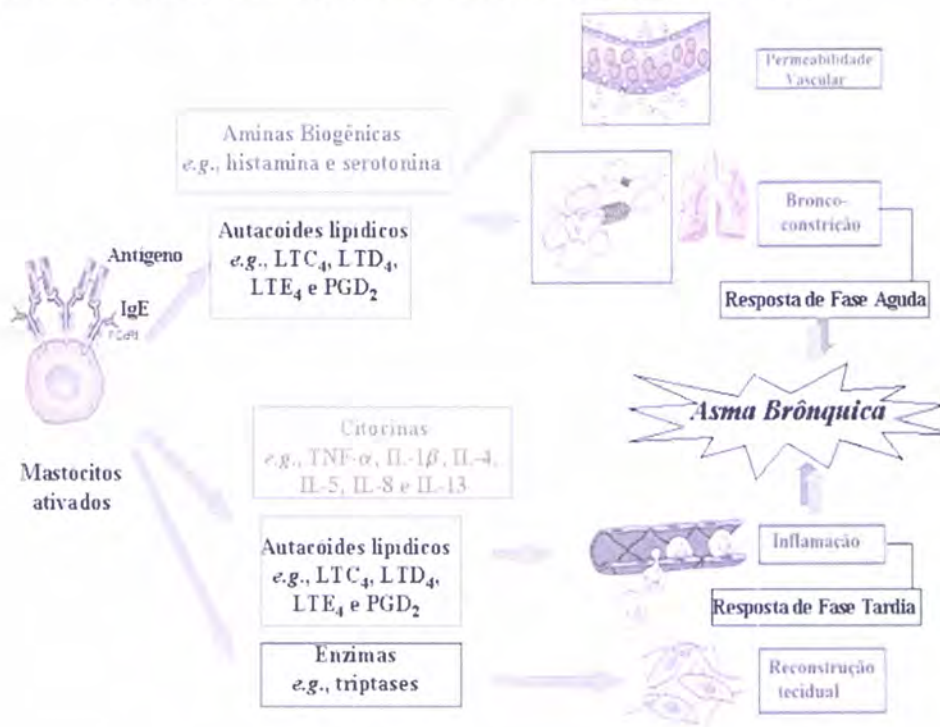
**Figura 4-24** – Mecanismo de secreção dos mastócitos. 1 | Moléculas de IgE ligadas a receptores da superfície celular; 2 | Após a segunda exposição ao antígeno, as moléculas de IgE presas aos receptores ligam-se a ele. Esta ligação activa a adenilato ciclase e resulta na fosforilação de certas proteínas; 3 | Entrada de  $Ca^{2+}$  na célula; 4 | Fusão de grânulos citoplasmáticos específicos e exocitose do seu conteúdo. O processo não lesa a célula, esta permanece viável e sintetiza novos grânulos; 5 | As fosfolipases actuam nos fosfolípidos da membrana produzindo leucotrienos.<sup>40</sup>

Para além da exocitose, os mastócitos são ainda responsáveis pela libertação de outros mediadores químicos da anafilaxia. O mediador ECF-A (*eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*) que atrai os eosinófilos ao local da inflamação, o NCF (*neutrophil chemotactic factor*) que chama os neutrófilos ao local e o SRS-A (*slow reacting substance of anaphylaxis*) que possui uma acção semelhante à histamina, porém o seu efeito na contracção do músculo liso e, conseqüentemente na permeabilidade vascular, é mais lento. Esta contracção é importante quando a reacção anafilática ocorre no pulmão (devido à inalação do antígeno) e leva a uma broncoconstricção (asma alérgica). Adicionalmente, a histamina contribui em larga medida para a asma, devido à presença de receptores histaminérgicos H2 que causam broncoconstricção.<sup>46,47</sup>

Os mediadores farmacologicamente activos libertados dos grânulos actuam nos tecidos circundantes, possuem diferentes actividades biológicas e os principais efeitos podem ser sistémicos ou localizados, dependendo do nível de mediador libertado. Um mediador pode ter várias funções, bem como vários deles apresentarem funções semelhantes. Os mediadores pré-formados incluem aminas biogénicas, como a histamina, enzimas e proteoglicanos, e mediadores sintetizados que incluem interleucinas, TNF- $\alpha$ , quimiocinas, factores de crescimento e angiogénese,

prostaglandinas e leucotrienos. Dos múltiplos efeitos biológicos resultantes da libertação das citocinas referidas, destacam-se a activação da coagulação (activa as propriedades antitrombocíticas e a síntese de factor estimulante de plaquetas - PAF), a activação da adesão leucocitária à parede do vaso (as células habitualmente migram no centro da corrente sanguínea, mas nestas situações elas aproximam-se da parede do vaso), o aumento da permeabilidade, a vasodilatação, a febre (acção no hipotálamo), a neutrofilia (acção na medula óssea), a proliferação de colagénio (estímulo de fibroblastos), a libertação de aminoácidos musculares, a produção de IL-2 (acção nas células T) e a produção de anticorpos (acção nas células B). Os mastócitos estão intimamente envolvidos com a patogenia da inflamação aguda, principalmente pela libertação da histamina que produz vasodilatação venosa e pela produção de substâncias necessárias ao recrutamento dos leucócitos, que incluem selectinas, moléculas de adesão e factores quimiotáticos. Os mastócitos participam também nos processos de fibrose e remodelação tecidual. A produção de colagénio pelos fibroblastos é induzida pelo TNF- $\alpha$  e a histamina pode estimular o crescimento dos fibroblastos, síntese de colagénio e formação de cicatriz. As quimiocinas influenciam ainda a remodelação tecidual, por induzirem a expressão de metaloproteinases em diversos leucócitos.<sup>2,4,19,42</sup>

Os mastócitos têm um papel relevante nas respostas inflamatórias alérgicas, visto que, para além do descrito anteriormente, expressam moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC), participando na apresentação de antígenos às células T, secretam IL-4 e IL-13, podendo potenciar a produção de IgE pelos linfócitos B, e têm ainda capacidade para regular a diferenciação celular T<sub>H</sub>2 (Figura 4-25).<sup>41</sup>



**Figura 4-25** – Efeitos biológicos dos mediadores químicos libertados por mastócitos ativados.<sup>48</sup>

Alguns produtos da divisão do complemento servem como factores quimiotáticos para os neutrófilos e macrófagos, contribuindo deste modo para o acúmulo de células fagocitárias no local da infecção. As actividades destas anafilatoxinas altamente reactivas são reguladas por uma protease sérica chamada carboxipeptidase N, que cliva um resíduo Arg do terminal C das moléculas produzindo as chamadas formas *des-Arg*. As formas *des-Arg* do C3a e C4a são completamente inactivas enquanto as C5a conservam cerca de 10% da sua actividade quimiotática e 1% da sua capacidade para provocar contracção do músculo liso. C3a, C5a e C5b67 podem individualmente induzir a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais vasculares, extravasando através do endotélio capilar e migrando na direcção do local de activação do complemento nos tecidos. O C3a é ainda um quimioattractante para os eosinófilos enquanto o C5a é um potente agente quimiotático dos neutrófilos e revela uma notável habilidade para actuar directamente no endotélio capilar para produzir vasodilatação e aumento da permeabilidade, um efeito que parece ser prolongado pelo leucotrieno B<sub>4</sub> libertado pelos mastócitos, neutrófilos e macrófagos.<sup>2,25</sup>

Os eosinófilos podem ser activados pelo endotélio vascular, por citocinas derivadas de células T e por citocinas derivadas de monócitos e macrófagos. Os eosinófilos abundam em locais de reacções de hipersensibilidade imediata (alérgica), visto que os basófilos ou os mastócitos estimulados na reacção alérgica, libertam o ECF-A, factor que atrai e dirige os eosinófilos até ao local da alergia, contribuindo para a lesão tecidual e para a reacção inflamatória. O eosinófilo chega ao local da reacção para a resolver (inibir) através da libertação de histaminase e aril sulfatase B, que destroem a histamina e o SRS-A respectivamente, produtos inflamatórios libertados pelos mastócitos ou basófilos sensibilizados.<sup>46,49</sup>

#### 4.1.6. Alterações na saúde humana

Os lipopolissacáridos são responsáveis pelas manifestações tóxicas nas infecções graves e nos processos inflamatórios generalizados. Provocam febre (podem considerar-se substâncias pirogénicas), mal-estar, alterações na contagem dos leucócitos, perturbações respiratórias e estado de choque, podendo mesmo provocar a morte.<sup>10,50</sup>

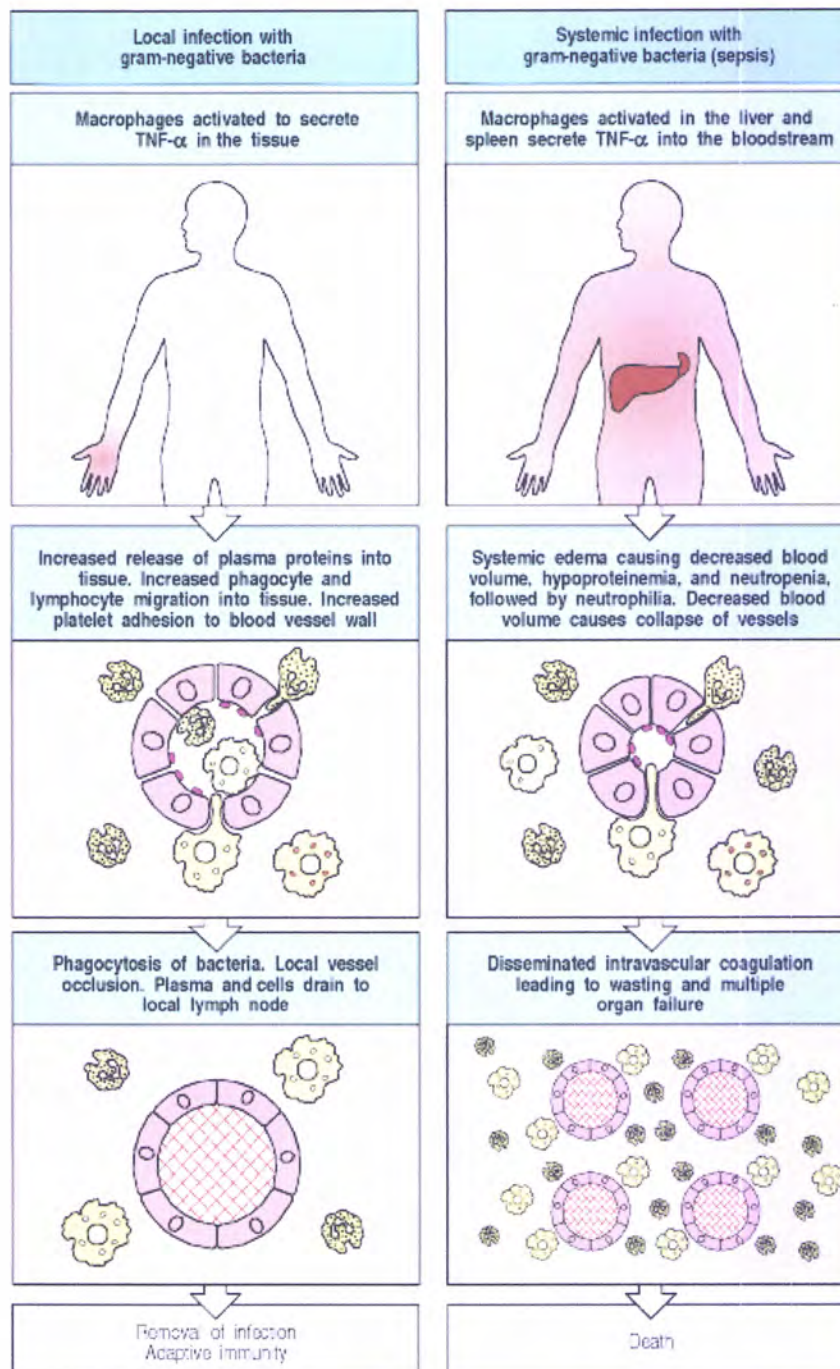
Em casa e no trabalho os indivíduos são expostos a diferentes níveis de alérgenos (pó domiciliar, ácaros domésticos, fungos do ar) responsáveis pelo desencadeamento de crises de rinite alérgica e, por vezes, agravando as crises asmáticas. A severidade da asma depende, em larga medida, dos níveis de endotoxina presentes no microambiente. Apesar de favorecer a resposta de citocinas T<sub>H</sub>1 que podem ser benéficas para o asmático, o lipopolissacárido agrava a inflamação broncopulmonar por vários mecanismos. Em baixas doses, o LPS das bactérias Gram-negativas parece aumentar a

secreção de muco nas vias aéreas e elevar os níveis de citocinas  $T_H2$ , elevando os níveis de IgE, eosinófilos e neutrófilos, e libertação de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, por activação dos macrófagos. Quando os macrófagos são activados pelo LPS, juntamente com a citocina IFN- $\gamma$  dos linfócitos T, começam a expressar altos níveis de sintetase do óxido nítrico (NOS), uma enzima que oxida a L-arginina para fornecer L-citrulina e óxido nítrico (NO). Este gás tem uma potente actividade antimicrobiana e pode combinar-se com o anião superóxido dando origem a substâncias com elevada capacidade antimicrobiana. Em doses elevadas, o LPS pode induzir uma resposta  $T_H1$ , caracterizada por recrutamento de neutrófilos, ausência de secreção de muco e aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Pode assim dizer-se que, a baixas concentrações o LPS estimula a produção de anticorpos específicos, enquanto a altas concentrações é um activador policlonal de células B.<sup>2,8,50,51</sup>

No início, o LPS activa as vias da pró-coagulação e de anticoagulação, através do aumento do factor tecidual. O efeito pró-coagulante dá-se em consequência do aumento da protrombina que é convertida em trombina, que por sua vez forma fibrina a partir do fibrinogénio. Simultaneamente, os níveis do inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1) são aumentados, resultando no bloqueio da produção de plasmina e na falência dos mecanismos normais da fibrinólise. Numa etapa posterior, as citocinas pró-inflamatórias, em particular IL-1 e IL-6, estimulam a coagulação. Em consequência da redução dos níveis da proteína C, da antitrombina e do inibidor do factor tecidual – proteínas anticoagulantes naturais, o resultado final deste fenómeno é a obstrução da microcirculação por trombos de fibrina que impedem a perfusão e oxigenação teciduais, causando disfunção celular/orgânica e por último, morte celular por apoptose e/ou necrose.<sup>20</sup>

O ser humano é extremamente sensível ao LPS, de forma que quantidades muito pequenas são suficientes para desencadear o estado de choque. Face a uma infecção por bactéria Gram-negativa, o indivíduo está exposto tanto ao LPS ligado à membrana da bactéria, como à endotoxina livre (fragmentos da parede celular), normalmente libertada durante a replicação e crescimento bacterianos. A administração de antibióticos leva à morte bacteriana, determinando um aumento rápido da endotoxina livre no plasma, reflectindo a rotura das membranas bacterianas. Nos seres humanos com sepsis por bactérias Gram-negativas, os níveis de endotoxina livre aumentam cerca de 50 vezes após a administração endovenosa de antibióticos. Com a interacção entre a endotoxina e o sistema imune do hospedeiro, ocorre a síntese e libertação de citocinas, com o subsequente aparecimento das alterações metabólicas e hemodinâmicas observadas na sepsis. Na presença de infecção sanguínea há libertação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos no fígado, baço e outros locais. A libertação sistémica de TNF- $\alpha$  causa vasodilatação e perda de volume plasmático devido ao aumento da permeabilidade vascular, conduzindo ao choque. No choque séptico, a coagulação intravascular disseminada é

também desencadeada pelo  $\text{TNF-}\alpha$  e esta situação conduz frequentemente à falha de órgãos vitais como os rins, fígado, coração e pulmões, os quais são rapidamente comprometidos pela deficiente perfusão e, conseqüentemente, o choque séptico apresenta um elevado índice de mortalidade (Figura 4-26).<sup>37,52</sup>



**Figura 4-26** – A liberação de  $\text{TNF-}\alpha$  pelos macrófagos induz efeitos locais protectores, mas a sua liberação sistêmica pode ter efeitos prejudiciais<sup>37</sup>

As endotoxinas induzem a redução da função renal em pacientes com sepsis. Na fase inicial da insuficiência renal aguda (IRA) por sepsis, as lesões tubulares são focais e mínimas e a morfologia glomerular normalmente está preservada, indicando que as

alterações hemodinâmicas sistémicas sejam as principais responsáveis pelo comprometimento da função renal. Todavia, existem fortes evidências que o estado séptico é o resultado da combinação de efeitos directos e indirectos das endotoxinas. Em estudos experimentais, foi já verificada a associação de endotoxinas bacterianas e uma resposta sistémica e renal, com produção de diferentes mediadores biologicamente activos, muitos deles responsáveis pela diminuição do fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular e pela disfunção tubular observadas em pacientes com sepsis. A presença de produtos bacterianos na circulação sistémica activa as células inflamatórias que infiltram o tecido renal e libertam radicais livres de oxigénio, proteases e citocinas inflamatórias, que por sua vez lesam e activam as células residentes renais, tais como as células endoteliais e tubulares. Além dos efeitos sistémicos, o LPS pode também, por acção directa, estimular estas células residentes e provocar modificações metabólicas, aumentando a produção e libertação local de substâncias pró-inflamatórias. Desta forma, a infecção bacteriana aguda ou crónica não debelada pode, através da molécula do LPS produzir lesão directa das células residentes, contribuindo para a lesão de órgãos alvo. A necrose tubular renal, forma mais comum de IRA de origem renal, é caracterizada pela morte das células tubulares, o que pode ocorrer por apoptose ou necrose. O LPS promove apoptose das células epiteliais tubulares, podendo assim contribuir para o desenvolvimento da IRA por sepsis e nefrotoxicidade.<sup>20</sup>

Existem alguns dados que sugerem que as toxinas superantigénicas de bactérias Gram-positivas induzem maior sensibilidade do hospedeiro ao LPS. Devido ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T activados pelas toxinas das bactérias Gram-positivas, os níveis de TNF- $\alpha$  tornam-se significativamente maiores o que poderá agravar a síndrome do choque séptico. A doença é, por vezes, causada não pelo próprio patogénio bacteriano mas pela resposta imune dirigida ao patogénio. A superprodução de citocinas estimuladas pelo patogénio conduz a sintomas de choque séptico bacteriano, o qual parece desenvolver-se porque as endotoxinas da parede bacteriana estimulam os macrófagos para superproduzirem IL-1 e TNF- $\alpha$  a níveis que causam choque séptico. Esta situação pode desenvolver-se em poucas horas após a infecção por algumas bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Neisseriae meningitidis*. Os sintomas, muitas vezes fatais, incluem uma queda na pressão arterial, febre, diarreia e coagulação sanguínea generalizada em vários órgãos. Alguns estudos oferecem alguma esperança, revelando que a neutralização da actividade de TNF- $\alpha$  e IL-1 com anticorpos monoclonais ou antagonistas pode prevenir o choque fatal desenvolvido nestas infecções bacterianas.<sup>2,20</sup>

O sistema imunológico produz mensageiros químicos (citocinas) que desempenham um papel crucial na mediação de respostas inflamatórias e imunes, servindo também como mediadores entre os sistemas imunológico e neuroendócrino. As citocinas pró-

inflamatórias, libertadas na periferia, estimulam o SNC activando o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) levando à produção de corticosteróide por parte da glândula adrenal. Estas citocinas, como IL-1 e TNF, induzem um conjunto de mudanças de comportamento e mal-estar associados à doença, denominados *sickness behavior*. Este estado consiste num conjunto de sintomas não específicos que incluem: febre, fraqueza, mal-estar, apatia, incapacidade de concentração, sentimento de depressão, letargia, anedonia e perda do apetite. Estudos em animais e humanos têm mostrado que a infusão de citocinas (sistémica ou central) induz sintomas de *sickness behavior*. Os mesmos sintomas são descritos em voluntários injectados com moléculas que induzem a síntese de citocinas endócrinas, tais como os lipopolissacáridos LPS, o fragmento activo da endotoxina das bactérias Gram-negativas.<sup>53,54</sup>

Os estudos sobre a inalação experimental de bactérias Gram-negativas ou de endotoxinas por voluntários sãos, revelaram o aparecimento de febre, tosse, dor difusa, náuseas, arquejo e obstrução aguda do fluxo de ar, o que comprova uma diminuição significativa do volume expiratório máximo por segundo (VEMS). Verificou-se ainda um aumento nos marcadores de inflamação, acumulação de neutrófilos no pulmão e aumento de monócitos, neutrófilos e linfócitos na expectoração. Consequentemente, os efeitos pulmonares da inalação das endotoxinas aumentam em indivíduos asmáticos. Os níveis de endotoxinas na poeira doméstica, e não os alergénios, parecem ser os responsáveis pela gravidade das crises de asma. Admite-se que as profundas modificações do ambiente e do estilo de vida, a exposição a alergénios e poluição atmosférica, conduzam a que a população geneticamente susceptível venha a adquirir a doença.<sup>10,11,12,50</sup>

#### 4.1.7. Marcadores analíticos

A produção de proteínas de fase aguda, tais como proteína C reactiva, proteína ligadora da manose, ceruloplasmina,  $\alpha_1$ -antitripsina e fibrinogénio, fica aumentada como resposta ao “alarme” precoce dos mediadores, enquanto que a produção de compostos de fase aguda negativa (proteínas constitutivas), como albumina e transferrina, fica diminuída. Quanto maior a intensidade do processo inflamatório, maior nível de proteínas de fase aguda e menor de proteínas constitutivas serão produzidas (Tabela 4.1). Esta resposta de fase aguda tem como objectivo exercer um efeito benéfico ao reforçar a resistência do hospedeiro, minimizando a lesão tecidual e promovendo a resolução e reparação da lesão inflamatória.<sup>17,25,55</sup>

**Tabela 4.1** – Proteínas de fase aguda.<sup>25</sup>

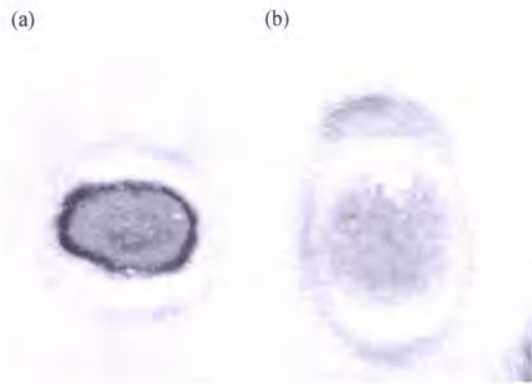
Acute phase reactant	Role
Dramatic increases in concentration	
C-reactive protein	Fixes complement, opsonizes
Mannose binding protein	Fixes complement, opsonizes
$\alpha_2$ -macroglobulin	Transport protein
Serum amyloid P component	Amyloid component precursor
Moderate increases in concentration	
$\alpha_1$ -protease inhibitors	Inhibit bacterial proteases
$\alpha_1$ -antitrypsin	Inhibit bacterial proteases
C3, C9, factor B	Increase complement function
Ceruloplasmin	$\text{O}_2^-$ scavenger
Fibrinogen	Coagulation
Angiotensin	Blood pressure
Haptoglobin	Bind hemoglobin
Fibronectin	Cell attachment



## 4.2. Utilização terapêutica

Apesar de prejudicial para os asmáticos, a exposição ao LPS parece exercer um papel na maturação do sistema imunológico em crianças, direccionando para o padrão de resposta  $T_H1$ , podendo desta forma prevenir alergia e asma. O mecanismo parece estar relacionado com o reconhecimento dos LPS pelos receptores específicos CD14 e TLR4. As células dendríticas, após activação do complexo TLR4, produzem citocinas e quimiocinas, nomeadamente IL-12, que influenciam a produção de INF- $\gamma$ . Ambos inibem a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e estimulam de forma autócrina o *feed-back* positivo de produção de IL-12, favorecendo assim a resposta tipo  $T_H1$ . Foram também demonstradas células T memória geradas por complexo antigénio-LPS com capacidade para se tornarem células efectoras produtoras de INF- $\gamma$ . O LPS influencia a capacidade das células dendríticas produzirem IL-12 e coestimularem as células T a tornarem-se células T efectoras produtoras de INF- $\gamma$ , o qual regula novamente de forma positiva a produção de IL-12 nas células da imunidade inata em resposta à estimulação. A exposição a endotoxinas, ao promover o desenvolvimento das células T de memória para proteínas alergénicas ambientais, pode também fazer com que estas células produzam INF- $\gamma$ , inibindo a resposta  $T_H2$  e prevenindo assim o desenvolvimento de doenças alérgicas. A estimulação simultânea de células por alergénio e por LPS resulta também num aumento do número de células T expressando receptores TLR4, num aumento no número de células TLR4 positivas que contêm IL-10 e num aumento do número de células que expressam CD14 e CD25 quando comparado com a estimulação isolada de alergénio. O efeito da estimulação do LPS na transcrição do IL-10 e na expressão do TLR4 parece estar diminuída nos adultos quando comparada com crianças. O LPS parece assim reduzir a resposta alérgica através do desvio  $T_H1$  e/ou a expansão de células T reguladoras, mas estes efeitos são mais pronunciados nas crianças, cujo sistema imune em desenvolvimento está ainda susceptível.<sup>12,51,56,57</sup>

Uma das principais citocinas secretadas pelos macrófagos activados é o TNF- $\alpha$ . A actividade desta citocina foi primeiramente observada pelo cirurgião *William Coley*, que constatou que o tumor de pacientes com cancro se tornava necrótico quando eles desenvolviam uma infecção bacteriana (Figura 4-27).<sup>2</sup>



**Figura 4-27** – Actividade biológica do TNF- $\alpha$ . (a) Tumor canceroso num rato injectado com endotoxina mostrando necrose hemorrágica. (b) Tumor em crescimento num rato não tratado. A endotoxina induz a produção de TNF- $\alpha$ , que actua na destruição do tumor.<sup>2</sup>

Na esperança de encontrar uma cura para o cancro, Coley começou a injectar pacientes com sobrenadantes derivados de culturas bacterianas. Estes sobrenadantes de culturas, chamados “toxinas Coley”, induzem necrose hemorrágica nos tumores mas têm numerosos efeitos indesejáveis, tornando-as insustentáveis para a terapia do cancro. Mais tarde, foi demonstrado que o componente activo da toxina de Coley era o lipopolissacárido (endotoxina), componente da parede celular bacteriana. Esta endotoxina não é, por si só, capaz de induzir a necrose tumoral, mas induz os macrófagos para produzirem TNF- $\alpha$ . Esta citocina tem um efeito citotóxico directo nas células tumorais mas não nas células normais. O TNF- $\alpha$  pode assim ser utilizado no tratamento de cancro devido ao seu potencial imunoterapêutico.<sup>2</sup>

## 5. Metodologia

Foram recolhidas amostras de ar *indoor*, num total de 30 habitações do distrito de Portalegre, concretamente em salas e quartos, e 52 colheitas de amostras de sangue aos indivíduos que nelas habitavam. A amostragem foi obtida por voluntariado e no período entre o final de Agosto e o início de Setembro do ano 2009. A recolha das amostras do ar doméstico teve como objectivo a pesquisa, quantificação e identificação das bactérias Gram-negativas em suspensão e as análises sanguíneas visaram a determinação dos níveis basais de marcadores de resposta inflamatória dos seus habitantes. Foram determinados os níveis de IgE e realizado o teste MultiRAST (Pó de Casa e Ácaros) para despiste de alergias. Foi ainda efectuado um questionário (Anexo), de modo a averiguar algumas características das habitações que possam interferir com os estados alérgicos e para conhecimento de patologias e/ou sintomas característicos de resposta inflamatória e/ou alérgica.

### 5.1. *Análise microbiológica do ar*

A amostragem microbiológica do ar foi efectuada com o colector de ar “SPIN AIR V2” da IUL INSTRUMENTS, cujo princípio de rotação das placas de Petri permite obter uma contagem real do número de unidades formadoras de colónias (UFCs), sem a necessidade de qualquer correcção (Figura 5-1). A distribuição especial dos orifícios, combinada com a lenta rotação da placa, permite a utilização de 100% da superfície do meio de agar. Este método baseia-se no princípio da impactação, no qual os bioaerossóis (bactérias Gram-negativas) são “sugados” e projectados contra o meio de cultura específico.<sup>58,59</sup>



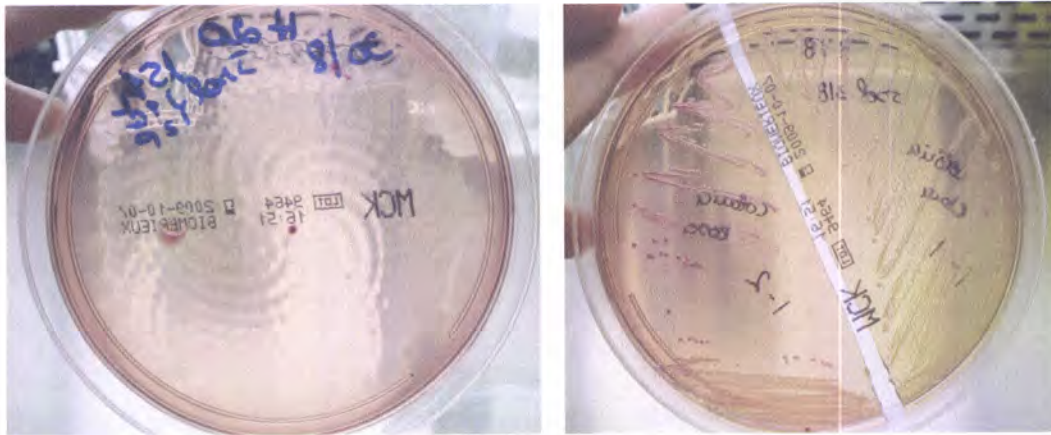
**Figura 5-1** – *Spin Air* – Dispositivo de amostragem de ar.<sup>58</sup>

#### 5.1.1. Técnica de amostragem

Foram recolhidos 2500L de ar em cada habitação, com recolha equitativa em dois locais distintos (sala de estar e quarto), com uma cadência de 100L/min. Foi aplicada uma velocidade de rotação da placa de 2rpm. Entre cada recolha foi realizada uma desinfecção da tampa perfurada, utilizando gaze embebida em álcool a 70°, de modo a evitar contaminação entre amostras.

O meio de cultura utilizado foi o Agar MacConkey, meio simultaneamente selectivo e diferencial (Figura 5-2). É selectivo porque contém sais biliares e corante cristal de

violeta, os quais inibem o crescimento das bactérias Gram-positivas. É diferencial por revelar a fermentação da lactose, como na *E. coli* que produz colónias vermelhas, enquanto que as bactérias não fermentadoras produzem colónias incolores.<sup>60</sup>



**Figura 5-2** – Placas de Petri com meio de cultura Agar MacConkey: UFCs obtidas após incubação a 36°C durante 48h e repicagem para posterior identificação bacteriana.

As placas de Petri foram incubadas a 36°C e foi efectuada a observação das mesmas após 24h e 48h. No caso de dúvida quanto à presença de bactérias ou fungos, foi realizada uma observação microscópica a fresco para confirmação morfológica. Procedeu-se, de seguida, à contagem das unidades formadoras de colónias de bactérias Gram-negativas desenvolvidas e fez-se a sua repicagem para posterior identificação. Esta identificação foi efectuada de forma automática no equipamento “VITEK 2 Compact” da *BioMerieux*.

## 5.2. Testes analíticos em amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas humanas foram obtidas através de colheita de sangue venoso, tendo sido recolhidos três tipos de amostra por cada indivíduo: sangue total em EDTA, para a contagem leucocitária diferencial; plasma citratado, para doseamento do fibrinogénio; e soro, para as determinações bioquímicas e imunológicas.

### 5.2.1. Métodos de ensaio

Os marcadores de resposta inflamatória doseados incluíram CRP,  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT) e fibrinogénio (FIB). Foram determinadas as percentagens de granulócitos e monócitos e doseadas duas proteínas constitutivas, albumina e transferrina. Os testes serológicos foram efectuados em equipamentos “Cobas” de *Roche Diagnostics* (Cobas 6000 e Cobas Integra 400 Plus), o fibrinogénio no equipamento “STA Compact” de *Diagnostica Stago* e o leucograma no equipamento “Sysmex XE5000” de *Emílio de Azevedo Campos*. O teste MultiRAST (Pó de Casa e Ácaros) foi efectuado no equipamento “ImmunoCAP250” de *Phadia*.

#### 5.2.1.1. Proteína C reactiva

A CRP foi determinada por ensaio imunoturbidimétrico com intensificação da reacção por partículas. A CRP humana aglutina-se com partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-CRP. O precipitado é determinado turbidimetricamente.<sup>61</sup>

#### 5.2.1.2. $\alpha$ 1- antitripsina

A sua determinação foi efectuada por ensaio imunoturbidimétrico. A  $\alpha$ 1-antitripsina humana forma um precipitado com um antisoro específico, que é determinado turbidimetricamente a 340 nm.<sup>62</sup>

#### 5.2.1.3. Fibrinogénio

O princípio do teste baseou-se no facto de, em presença de excesso de trombina, o tempo de coagulação de uma amostra de plasma diluído ser inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio.<sup>63</sup>

#### 5.2.1.4. Granulócitos e Monócitos

A classificação dos leucócitos foi efectuada pelo método de citometria de fluxo, utilizando um laser semiconductor. A citometria de fluxo utiliza a emissão de luz de proteínas coradas (RNA e DNA) a fim de separar as populações de células através de programas de análise de diagramas de dispersão. As células sanguíneas passam em linha pelo centro da célula de fluxo e é emitido um feixe de laser semiconductor para estas células. A luz dispersada em frente é recebida pelo fotodíodo, sendo a luz dispersada e a luz fluorescente laterais recebidas pelos tubos fotomultiplicadores. Esta luz é convertida em impulsos eléctricos, que possibilitam a obtenção de análises detalhadas em diagramas de dispersão bidimensionais.<sup>64</sup>

#### 5.2.1.5. Albumina

A albumina, com um valor de pH de 4.1, apresenta um carácter suficientemente catiónico para se ligar com verde de bromocresol, um corante aniónico, formando um complexo azul esverdeado. A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração de albumina da amostra e é medida fotometricamente.<sup>65</sup>

### 5.2.1.6. Transferrina

A determinação da transferrina (TRF) está estreitamente relacionada com a concentração de transferrina calculada de forma indirecta a partir da medição da capacidade total de fixação do ferro (TIBC), com um coeficiente de correlação de 0,96. Assim, os níveis de TIBC podem ser usados com confiança para calcular as concentrações de transferrina e o cálculo foi efectuado com base na seguinte fórmula:<sup>66,67,68</sup>

$$\text{Transferrina sérica (mg/dL)} \times 1,25 = \text{TIBC } (\mu\text{g/dL})$$

$$\Updownarrow$$

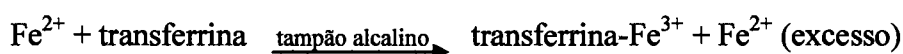
$$\text{TRF (mg/dL)} = \text{TIBC} / 1,25 \text{ } (\mu\text{g/dL})$$

#### 5.2.1.6.1. Capacidade Total de Fixação do Ferro

A determinação da TIBC é obtida pela soma do ferro sérico e da capacidade de fixação do ferro não saturado (UIBC). A TIBC é uma medida da concentração máxima de ferro que pode ser fixada pela transferrina.<sup>69</sup>

##### 5.2.1.6.1.1. *Capacidade de Fixação do Ferro Não Saturado*

O ferro é transportado sob a forma de  $\text{Fe}^{3+}$  ligado à proteína plasmática apotransferrina. O complexo apotransferrina- $\text{Fe}^{3+}$  denomina-se transferrina. Normalmente, apenas cerca de um terço dos locais de ligação do ferro da transferrina estão ocupados por  $\text{Fe}^{3+}$ . A quantidade adicional de ferro que pode ser ligada é a capacidade de fixação do ferro não saturado. A determinação é efectuada de forma directa com FerroZine:

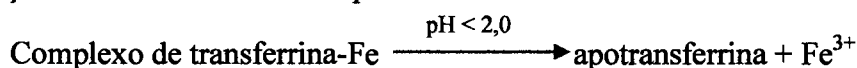


A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração do excesso de ferro não ligado e inversamente proporcional à capacidade não saturada de fixação do ferro. O resultado obtém-se medindo o aumento da absorvância fotometricamente.<sup>69</sup>

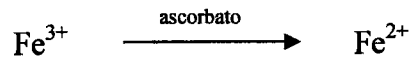
##### 5.2.1.6.1.2. *Ferro sérico*

A determinação do ferro foi efectuada por um método fotométrico em que existem três passos fundamentais:

- Libertação de iões de  $\text{Fe}^{3+}$  do complexo de transferrina através do uso de ácido;



- Redução dos iões de  $\text{Fe}^{3+}$  para iões de  $\text{Fe}^{2+}$ ;



- Reacção dos iões de  $\text{Fe}^{2+}$  para produção de um complexo corado.



Em condições acídicas, o ferro é libertado da transferrina. O ascorbato reduz os iões de  $\text{Fe}^{3+}$  libertados para iões de  $\text{Fe}^{2+}$  que, de seguida, reagem com FerroZine e formam um complexo corado. A intensidade da cor é proporcional à concentração de ferro, podendo ser determinada fotometricamente.<sup>70</sup>

#### 5.2.1.7. Imunoglobulina E

O princípio do teste baseou-se na técnica de *sandwich*. Há uma primeira incubação da IgE com um anticorpo monoclonal específico anti-IgE e um anticorpo monoclonal específico anti-IgE marcado com complexo de ruténio, que reagem entre si e formam um complexo *sandwich*. Na segunda incubação, após incorporação de micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da estreptavidina. A mistura da reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são removidos e a aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados com base numa curva de calibração.<sup>71</sup>

#### 5.2.1.8. MultiRAST (Pó de casa e Ácaros)

A IgE específica ImunoCAP é um teste *in vitro*, que mede a concentração em circulação de anticorpos IgE específicos alergénicos no soro ou plasma humanos, proporcionando uma medida objectiva da sensibilização ao alergénio. O teste Multi efectuado é um teste qualitativo que inclui *Hollister-Stier Labs.*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blatella germanica*. Os alergénios unidos covalentemente ao ImunoCAP reagem com IgE específica do soro humano. Depois de uma primeira lavagem, a IgE não específica é eliminada e é adicionada uma enzima marcada com anticorpos anti-IgE formando-se um complexo. Depois da incubação, a enzima-anti-IgE não unida é eliminada por nova lavagem e o complexo final é posteriormente incubado com a solução de resolução e é medida a fluorescência desenvolvida.<sup>72</sup>

## 6. Resultados

Os dados obtidos foram reunidos em tabelas (Tabelas 6.1 e 6.2) e foram efectuados gráficos por parâmetro, de modo a averiguar a relação de cada grupo de valores com o número de UFCs correspondentes.

Tabela 6.1 – Resultados obtidos nos métodos analíticos.

Quadro de Dados												
Teste N.º	GRA %	MN %	PCR mg/L	FIB g/L	$\alpha$ 1-AT g/L	ALB g/dL	TIBC $\mu$ g/dL	TRF g/L	IgE U/ml	Multi RAST	UFCs/L (*10 <sup>3</sup> )	Bactéria G-
P01/H01	52,6	5,6	1,4	2,50	1,35	4,8	273	2,18	55,04	N	0,4	
S01/H01	56,0	4,3	1,0	2,43	1,33	4,6	300	2,40	10,18	N	0,4	<i>Pseudomonas oryzae</i>
A02/H02	63,0	8,0	2,8	2,67	1,39	4,9	261	2,08	84,47	P	0,4	
J02/H02	52,3	7,4	0,5	1,62	1,02	4,5	313	2,50	8,21	N	0,4	<i>Pantoea spp</i>
C03/H03	57,2	4,9	4,9	1,59	1,57	4,4	274	2,19	247,80	P	0,0	
L03/H03	48,0	9,1	0,7	2,03	0,98	4,9	289	2,31	77,15	N	0,0	
MC04/H04	60,8	8,9	4,7	2,84	1,38	4,2	313	2,50	49,91	N	0,0	
JD04/H04	65,3	6,3	0,7	2,60	1,53	4,3	323	2,58	224,90	P	0,0	
MA05/H05	53,0	6,6	7,8	2,92	1,55	3,9	284	2,27	4,35	N	1,6	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas oryzae</i>
N06/H06	55,7	11,0	1,0	2,87	1,59	4,4	304	2,43	35,84	N	2,8	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>
LM07/H07	47,9	6,8	0,7	2,77	1,18	4,7	261	2,08	5,81	N	0,0	
I08/H08	64,8	6,9	1,3	3,14	1,25	4,7	377	3,01	9,88	N	0,4	
AG08/H08	64,4	6,9	0,8	2,35	1,20	4,6	235	1,88	45,7	P	0,4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EJD09/H09	57,4	6,6	2,5	1,76	1,57	4,8	319	2,55	392,00	N	0,0	
FAM09/H09	57,2	4,3	4,0	3,27	1,53	4,4	289	2,31	352,70	P	0,0	
ML10/H10	51,8	7,2	2,1	2,57	1,29	4,5	318	2,54	29,33	N	0,0	
JM10/H10	60,0	8,5	2,9	3,37	1,35	4,5	280	2,24	143,50	P	0,0	
MP11/H11	65,2	6,4	11,3	4,16	1,39	4,1	301	2,40	6,40	N	0,0	
JC11/H11	61,0	7,0	1,1	2,89	1,22	4,5	298	2,38	21,71	N	0,0	
DE12/H12	67,4	11,9	24,9	3,63	1,47	4,5	290	2,32	41,03	N	0,4	<i>Pseudomonas putida</i>
PV13/H13	53,4	5,1	1,1	2,92	1,22	4,6	262	2,09	772,2	P	0,0	
FC13/H13	46,4	11,4	0,6	2,95	0,94	4,7	286	2,28	27,91	N	0,0	
MMC14/H14	50,0	4,5	1,3	3,06	1,54	4,6	286	2,28	92,91	P	0,0	
AC14/H14	52,0	9,2	0,6	2,62	1,26	4,7	257	2,05	75,32	P	0,0	
MAD15/H15	70,2	5,8	3,4	1,99	1,09	4,2	280	2,24	24,94	N	0,4	<i>Pseudomonas oryzae</i>
VA16/H16	63,8	7,8	2,5	2,46	1,31	4,4	243	1,94	8,88	N	0,0	
MJ17/H17	58,2	5,6	0,7	2,01	1,25	4,3	374	2,99	31,81	N	0,4	
ANS17/H17	61,3	9,3	0,6	1,92	1,39	5,1	346	2,76	38,13	P	0,4	<i>Pantoea spp</i>
MM18/H18	51,8	8,1	1,1	3,77	1,30	4,4	252	2,01	96,65	N	0,8	
FL18/H18	57,6	8,2	3,3	4,10	1,51	4,4	226	1,80	75,46	N	0,8	<i>Pantoea spp</i> <i>Escherichia coli</i>
JC19/H19	70,0	7,4	5,6	3,25	1,47	4,2	327	2,61	83,60	N	0,8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
LL20/H20	53,3	7,7	6,9	3,75	1,25	4,3	307	2,45	29,72	N	1,2	
RL20/H20	55,6	6,2	2,7	3,14	1,18	4,1	271	2,16	10,19	N	1,2	<i>Pantoea spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
FA21/H21	65,1	5,7	2,8	2,64	0,95	4,3	368	2,94	114,70	N	0,0	
AD21/H21	54,9	6,9	2,9	3,14	1,35	4,6	298	2,38	75,59	N	0,0	
O22/H22	60,1	6,9	3,5	2,29	1,23	4,6	377	3,01	15,21	N	0,0	
PR22/H22	43,2	5,8	2,7	2,69	1,21	4,5	253	2,02	41,78	P	0,0	
D23/H23	43,3	10,8	2,2	3,99	1,24	4,2	315	2,52	31,89	N	1,2	
RS23/H23	59,0	8,9	1,3	3,29	1,34	4,3	276	2,20	135,10	P	1,2	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Escherichia vulneris</i>
AM24/H24	55,1	7,9	1,0	3,41	1,51	4,6	286	2,28	209,00	P	0,4	
JMM24/H24	59,5	10,6	7,1	2,76	1,08	4,1	263	2,10	32,80	N	0,4	<i>Pseudomonas oryzae</i>
MJ25/H25	62,0	7,1	4,7	3,01	1,62	4,5	332	2,65	30,44	N	0,0	
MMJ25/H25	61,9	5,4	2,4	2,26	1,13	4,9	347	2,77	5,72	N	0,0	
RM26/H26	57,4	9,6	3,4	3,11	1,42	3,9	307	2,45	4,74	N	0,0	
CD27/H27	52,2	7,3	2,7	3,11	1,43	4,4	245	1,96	157,80	P	0,0	
MCD27/H27	53,5	6,8	1,2	1,97	0,83	4,7	343	2,74	147,60	N	0,0	
AS28/H28	69,6	6,7	2,3	3,49	1,28	3,5	329	2,63	199,00	N	0,0	
R28/H28	43,5	9,3	2,2	2,43	1,18	4,5	262	2,09	46,11	N	0,0	
VM29/H29	58,7	8,2	22,2	3,39	1,67	4,3	393	3,14	79,66	P	0,0	
MN29/H29	58,3	8,9	1,0	2,52	1,14	4,7	262	2,09	107,60	P	0,0	
PP30/H30	57,9	7,1	9,8	2,63	1,20	4,6	283	2,26	8,52	N	0,0	
MP30/H30	59,5	7,7	1,8	3,20	1,45	4,6	322	2,57	11,55	N	0,0	



Tabela 6.2 – Respostas obtidas nos questionários.

Dados – Questionário											
Questão N.º	Idade Hab. (anos)	Piso Hab. a)	Ar Cond. b)	Purif. b)	D. Crón. b)	Alergia b)	Esp./ Irrit. b)	Asma b)	Medic. b)	UFCs/L (*10 <sup>3</sup> )	
P01/H01	7	2	1	1	1	1	1	1	1	0,4	
S01/H01	7	2	1	1	1	1	1	1	1	0,4	
A02/H02	20	8	10	1	1	10	5	1	1	0,4	
J02/H02	20	8	10	1	1	1	5	1	1	0,4	
C03/H03	2	7	10	1	1	10	10	10	10	0,0	
L03/H03	2	7	10	1	1	1	1	1	1	0,0	
MC04/H04	1	7	1	1	1	1	1	1	1	0,0	
JD04/H04	1	7	1	1	10	1	1	1	1	0,0	
MA05/H05	30	3	1	1	1	1	5	1	1	1,6	
N06/H06	100	9	1	1	10	1	1	1	1	2,8	
LM07/H07	3	4	1	1	1	1	5	1	5	0,0	
I08/H08	3	3	1	1	1	1	5	1	1	0,4	
AG08/H08	3	3	1	1	1	10	10	1	5	0,4	
EJD09/H09	18	7	10	1	1	1	5	1	5	0,0	
FAM09/H09	18	7	10	1	10	10	5	10	10	0,0	
ML10/H10	6	2	10	1	10	1	10	1	1	0,0	
JM10/H10	6	2	10	1	10	10	1	1	1	0,0	
MP11/H11	12	3	1	1	1	1	1	1	1	0,0	
JC11/H11	12	3	1	1	1	10	1	1	1	0,0	
DE12/H12	2	4	10	1	1	1	1	1	1	0,4	
PV13/H13	30	4	1	1	1	1	5	1	1	0,0	
FC13/H13	30	4	1	1	1	1	1	1	1	0,0	
MMC14/H14	10	2	10	1	10	10	5	10	10	0,0	
AC14/H14	10	2	10	1	10	1	5	1	5	0,0	
MAD15/H15	20	8	10	1	10	1	1	1	5	0,4	
VA16/H16	22	7	1	1	1	1	1	1	5	0,0	
MJ17/H17	25	8	1	1	1	1	1	1	1	0,4	
ANS17/H17	25	8	1	1	10	10	1	10	10	0,4	
MM18/H18	22	6	10	1	10	10	10	10	5	0,8	
FL18/H18	22	6	10	1	10	1	1	1	1	0,8	
JC19/H19	20	8	10	1	10	10	10	1	1	0,8	
LL20/H20	30	3	1	1	10	10	10	1	10	1,2	
RL20/H20	30	3	1	1	10	1	10	1	1	1,2	
FA21/H21	8	7	1	1	1	10	5	10	5	0,0	
AD21/H21	8	7	1	1	1	1	1	1	1	0,0	
O22/H22	10	7	10	1	1	1	1	1	5	0,0	
PR22/H22	10	7	10	1	1	10	10	1	1	0,0	
D23/H23	18	7	10	1	1	10	5	1	5	1,2	
RS23/H23	18	7	10	1	1	10	5	1	1	1,2	
AM24/H24	30	4	10	1	10	10	10	1	5	0,4	
JMM24/H24	30	4	10	1	10	1	10	1	1	0,4	
MJ25/H25	15	3	10	1	1	1	10	1	5	0,0	
MMJ25/H25	15	3	10	1	1	1	1	1	5	0,0	
RM26/H26	3	2	10	1	1	1	1	1	10	0,0	
CD27/H27	7	7	10	1	10	10	10	10	5	0,0	
MCD27/H27	7	7	10	1	1	10	5	1	5	0,0	
AS28/H28	7	4	1	1	1	10	1	10	1	0,0	
R28/H28	7	4	1	1	1	1	1	1	1	0,0	
VM29/H29	4	7	10	1	10	10	10	10	5	0,0	
MN29/H29	4	7	10	1	1	1	1	1	1	0,0	
PP30/H30	11	4	10	1	1	1	1	1	1	0,0	
MP30/H30	11	4	10	1	1	1	5	1	1	0,0	

a) 2=Tijoleira; 3=Mosaico; 4=Madeira; 6= Corticite; 7=Tijoleira/Mosaico+Madeira;  
8=Tijoleira/Mosaico+Corticite; 9=Xisto

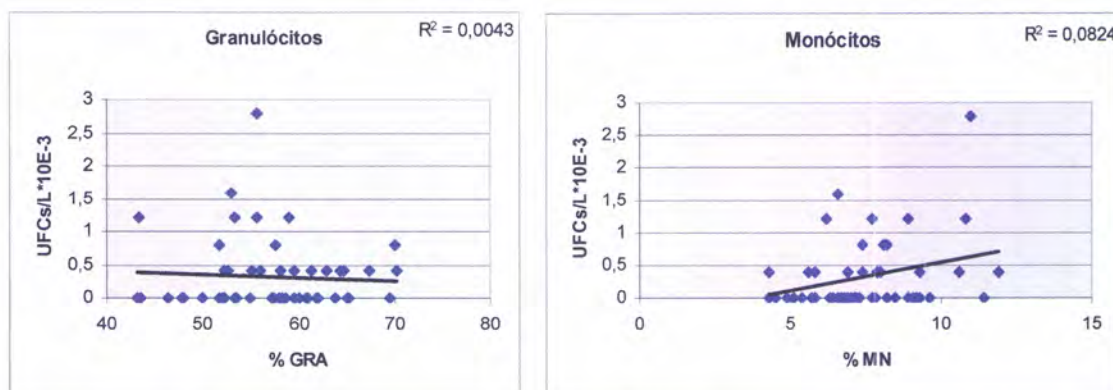
b) 1=Não; 5=Às vezes; 10=Sim

## 6.1. Tratamento e análise de dados

De acordo com os resultados da amostragem do ar *indoor*, obteve-se um nível baixo de bactérias Gram-negativas em suspensão, nas habitações estudadas. A média obtida foi de 0,0003 UFCs por litro de ar recolhido. Das espécies identificadas o predomínio pertenceu ao grupo das *Pseudomonas*, tendo sido também isoladas algumas espécies de *Pantoea*, *Escherichia*, *Sphingomonas* e *Enterobacter*. As contagens de UFCs das diferentes habitações foram relacionadas com: os níveis dos marcadores analíticos sanguíneos dos diferentes habitantes, de modo a averiguar a possível influência das endotoxinas *indoor* nos níveis basais dos marcadores inflamatórios e alérgicos; as características das habitações, para testar a sua influência na concentração de endotoxinas; e os estados patológicos dos indivíduos, para analisar a sua incidência relativamente ao nível deste tipo de bactérias.

### 6.1.1. Marcadores de resposta inflamatória

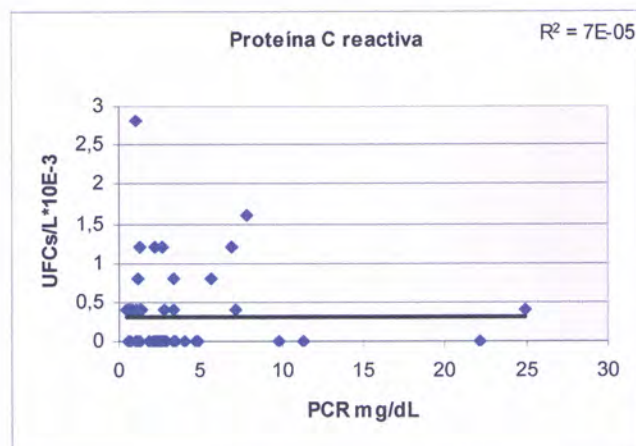
#### 6.1.1.1. Contagens celulares



**Gráficos 6.1** – Correlação entre as percentagens celulares e as UFCs por litro de ar.

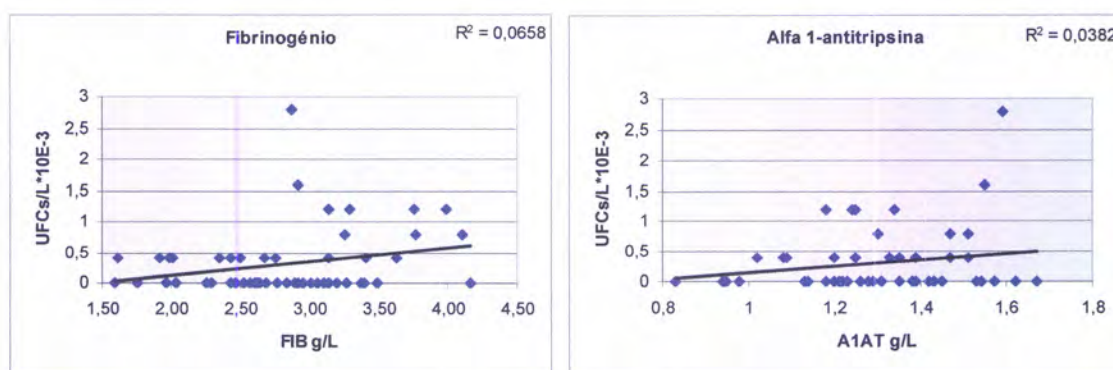
A análise dos gráficos permite-nos deduzir que não existe correlação directa entre o número de UFCs por litro de ar e as percentagens de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e de monócitos, em condições não patológicas (Gráficos 6.1).

### 6.1.1.2. Proteínas de fase aguda



**Gráfico 6.2** – Correlação entre a proteína C reactiva e as UFCs por litro de ar.

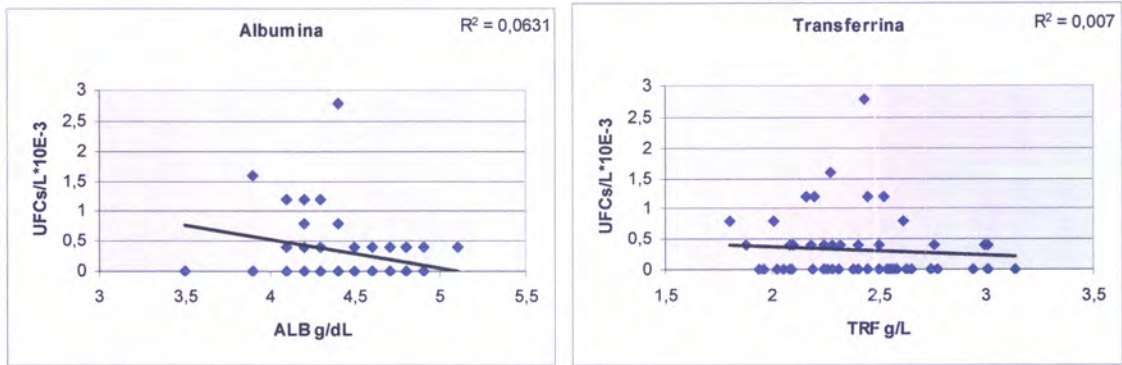
De igual forma, não se obteve correlação para a proteína “major” de resposta inflamatória (Gráfico 6.2), assim como para as outras duas proteínas inflamatórias doseadas (Gráficos 6.3).



**Gráficos 6.3** – Correlação das proteínas fibrinogénio e  $\alpha$ 1-antitripsina com as UFCs por litro de ar.

### 6.1.1.3. Proteínas constitutivas

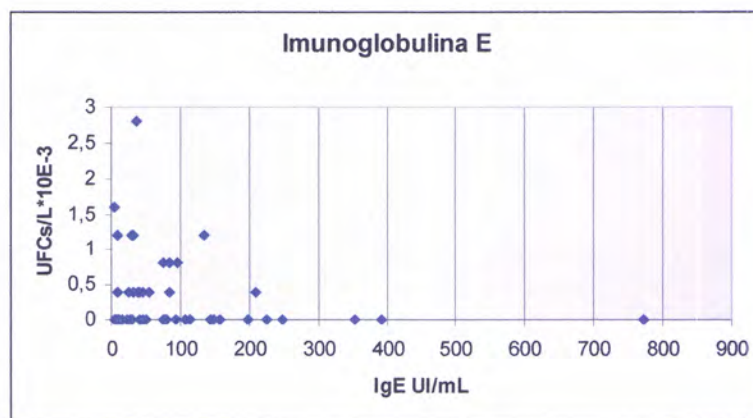
No que diz respeito às proteínas constitutivas, os níveis mais baixos não demonstram correlação com o maior número de UFCs por litro de ar recolhido (Gráficos 6.4).



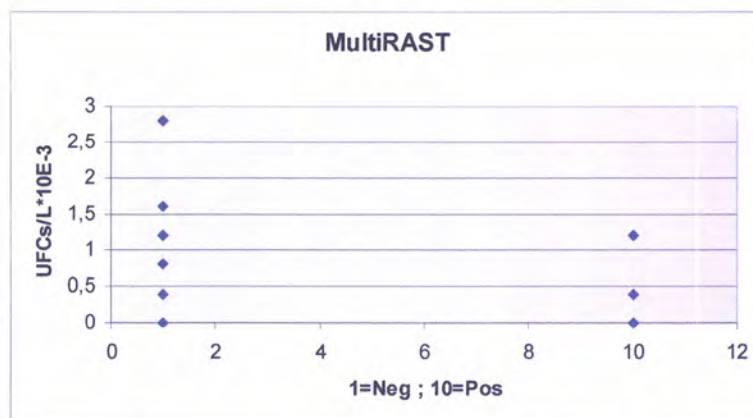
**Gráficos 6.4** – Correlação entre as proteínas constitutivas e as UFCs por litro de ar.

### 6.1.2. Indicadores de alergia

Analisando os gráficos relativos à IgE (Gráfico 6.5) e ao teste MultiRAST (Gráfico 6.6), em comparação com as UFCs obtidas, pode constatar-se que as endotoxinas em suspensão não interferem com estes parâmetros.



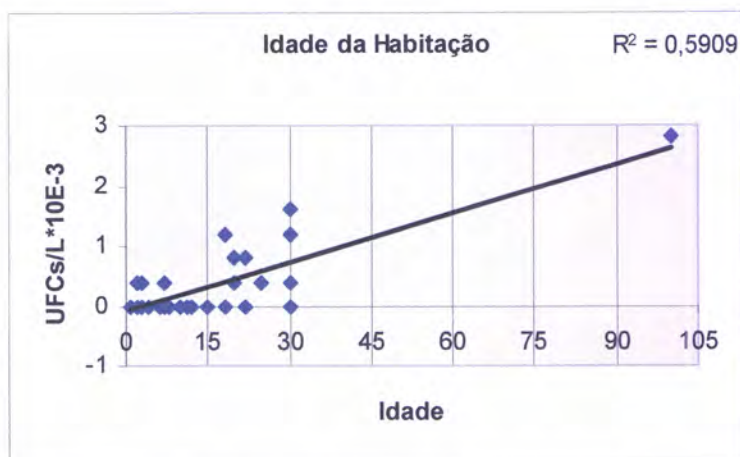
**Gráfico 6.5** – Comparação entre os níveis de IgE e as UFCs por litro de ar.



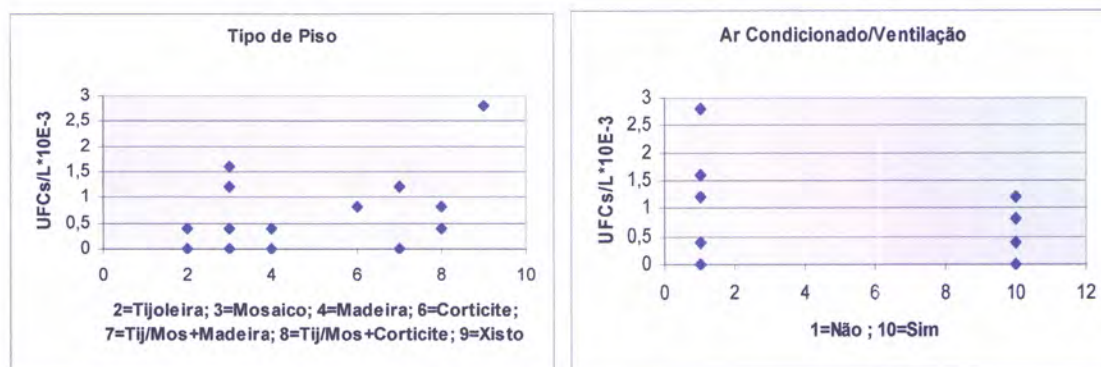
**Gráfico 6.6** – Comparação dos resultados do teste MultiRAST com as UFCs por litro de ar.

### 6.1.3. Características das habitações

Foram estudadas quatro características habitacionais com possível influência no nível de endotoxinas presente: idade da habitação, tipo de piso, presença de ar condicionado ou outro tipo de ventilação e utilização de purificadores ambientais. Foram seleccionados os quartos e as salas mais frequentados pela população estudada, visto serem estas as divisões em que se permanece durante grande parte do dia e às quais se atribui maior responsabilidade nos estados alérgicos.



**Gráfico 6.7** – Correlação entre a idade das habitações e as UFCs por litro de ar.



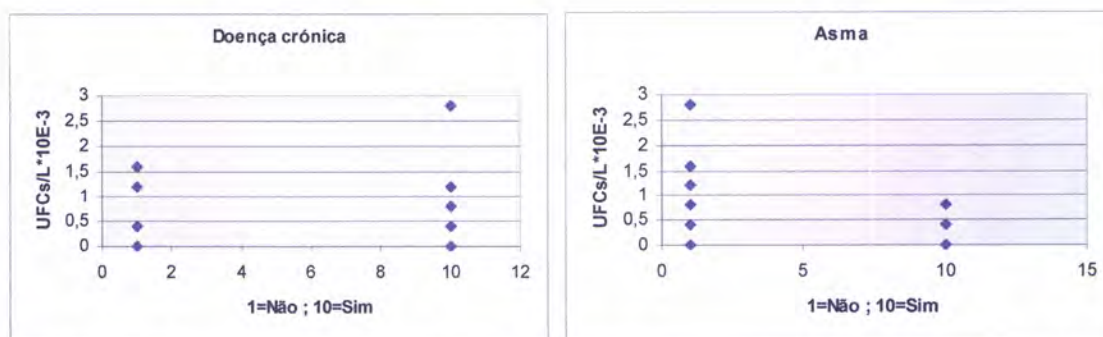
**Gráficos 6.8** – Comparação entre o piso das habitações e a existência de ventilação artificial com as UFCs por litro de ar.

Pode observar-se que, relativamente à idade das habitações ([Gráfico 6.7](#)), apesar de não existir uma boa correlação com as UFCs recolhidas, se nota uma tendência para que as casas mais recentes (< 18 anos) apresentem menor concentração deste tipo de bactérias. Este facto pode atribuir-se a vários factores: menor tempo para acumulação de microorganismos; diferente material utilizado nas construções ao longo do tempo; ou melhores técnicas de limpeza doméstica, com utilização de detergentes que contêm agentes antibacterianos.

Relativamente ao tipo de piso das salas e quartos estudados e à existência de ar condicionado ou outro tipo de ventilação, ambas as características revelam não interferir com o nível de endotoxinas em suspensão (Gráficos 6.8). Quanto ao tipo de piso, pode notar-se que ao maior número de UFCs corresponde o piso em xisto, no entanto a reduzida taxa de habitações estudadas com esta característica (3,33%) não permite concluir quanto à relação directa entre os dois factores. A presença de ar condicionado, característica habitacional em ascensão ao longo dos anos, revela não ser prejudicial quanto ao nível de endotoxinas aéreas. Como pode observar-se no gráfico, os níveis mais elevados de UFCs pertencem às habitações que não possuem ar condicionado ou ventilação artificial, o que poderá dever-se à manutenção de temperaturas mais elevadas no interior destas habitações. No que se refere à utilização de purificadores não foi possível efectuar o estudo, visto não ter sido referida a sua presença em nenhuma das habitações estudadas.

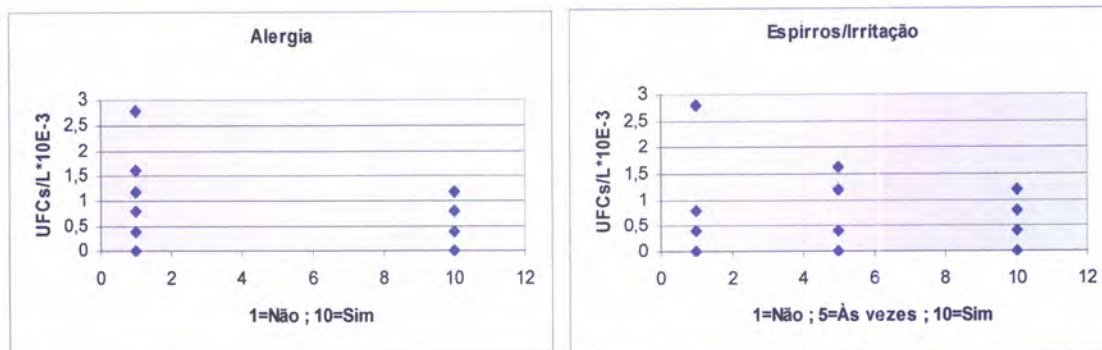
#### 6.1.4. Patologias e sintomatologia associadas

Foram estudadas quatro situações de patologia ou sintomatologia associadas aos estados inflamatórios ou alérgicos (doença crónica, alergia, asma e espirros ou irritação nasal/ocular), de modo a averiguar a possível correlação com os níveis de endotoxinas *indoor*, assim como a toma de medicamentos anti-inflamatórios ou anti-alérgicos pelos indivíduos. Este último factor foi ainda estudado, pelo facto da sua utilização poder interferir com os níveis dos marcadores analíticos estudados.



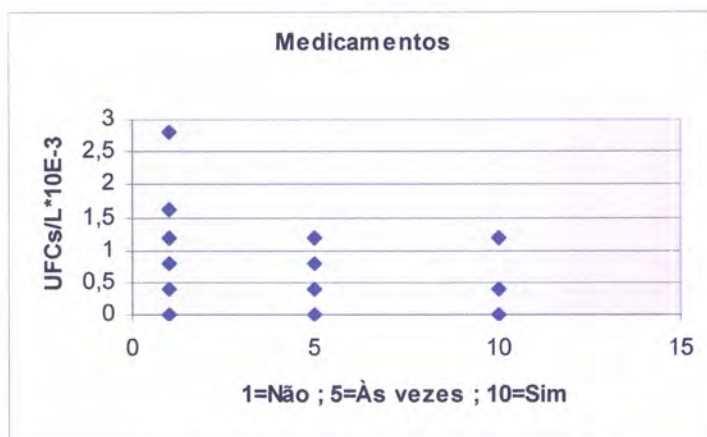
**Gráficos 6.9** – Comparação entre a existência de doença crónica e as UFCs por litro de ar.

Analisando os gráficos que relacionam a presença de doença crónica ou asma com a concentração de endotoxinas do ambiente doméstico (Gráficos 6.9), pode deduzir-se que não existe associação entre estes dois factores. No que diz respeito aos indivíduos que revelaram ter asma, pode notar-se que os níveis de UFCs recolhidas nas suas habitações estão nos valores mais baixos, pelo que estes indivíduos precisarão de ter algum cuidado especial, para o não agravamento do seu estado asmático, apenas nas suas crises e quando em contacto com níveis superiores de bactérias Gram-negativas.



**Gráficos 6.10** – Comparação entre a presença de alergia ou espirros/irritação nasal ou ocular e as UFCs por litro de ar.

Relativamente à presença de alergia e à frequência de espirros ou irritação nasal ou ocular (Gráficos 6.10), não é possível estabelecer uma associação entre a concentração de UFCs e estes estados patológico e sintomatológico. No entanto, é conveniente que os indivíduos em crise alérgica e em presença de níveis mais elevados de endotoxinas tenham cuidados especiais para evitar o agravamento do seu estado de saúde.

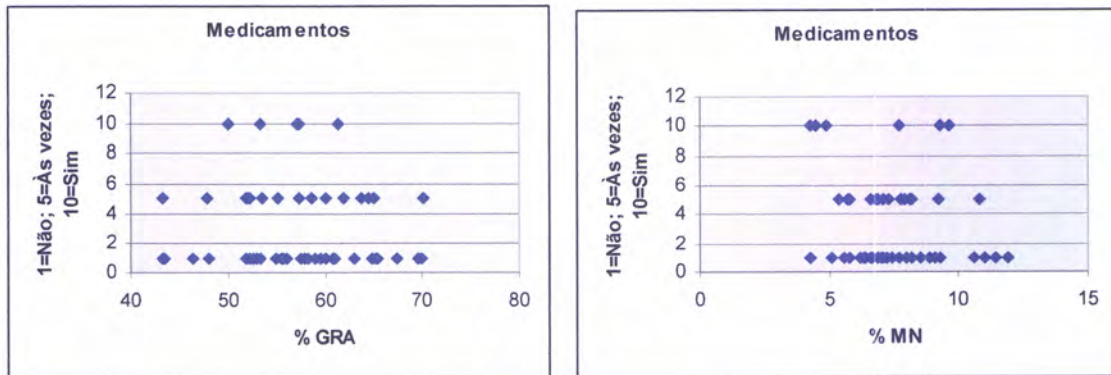


**Gráfico 6.11** – Comparação entre a toma de medicamentos anti-inflamatórios ou anti-alérgicos e as UFCs por litro de ar.

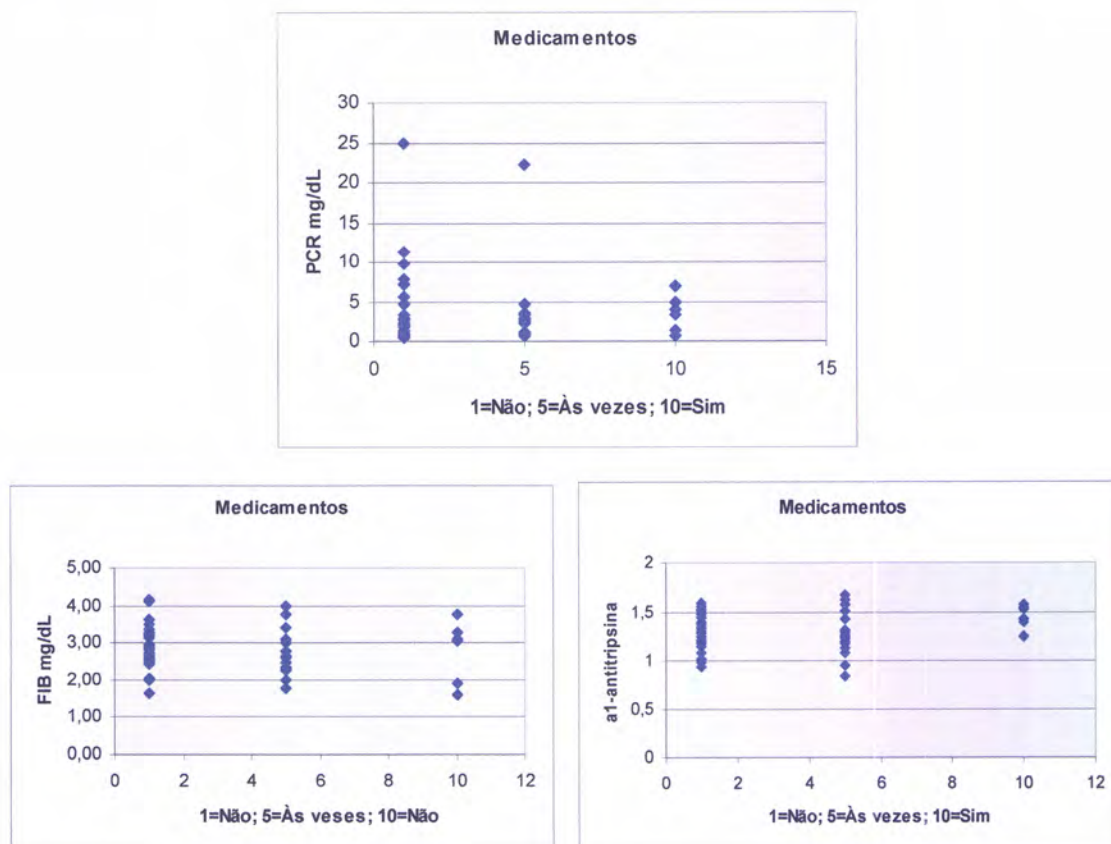
Como pode observar-se (Gráfico 6.11), não se verifica maior toma dos medicamentos estudados nos casos de mais elevada concentração de bactérias Gram-negativas. Desta forma pode dizer-se que, os níveis de endotoxinas *indoor* obtidos não induzem o recurso a maior quantidade dos medicamentos referidos.

## 6.2. Análise de interferências

A toma de medicamentos anti-inflamatórios e/ou anti-alérgicos foi relacionada com os níveis dos marcadores de resposta inflamatória e alérgica, de forma a despistar possíveis interferências nos resultados e nas análises efectuadas (Gráficos 6.12 e 6.13).

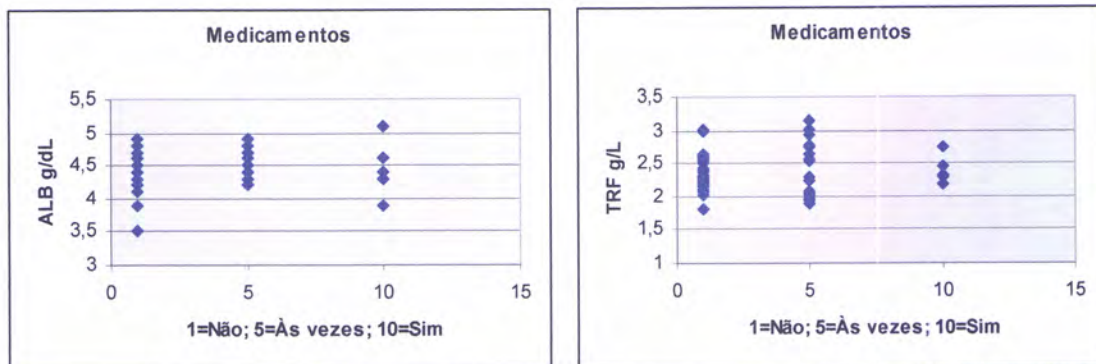


**Gráficos 6.12** – Influência dos medicamentos anti-inflamatórios e/ou anti-alérgicos nas contagens celulares.

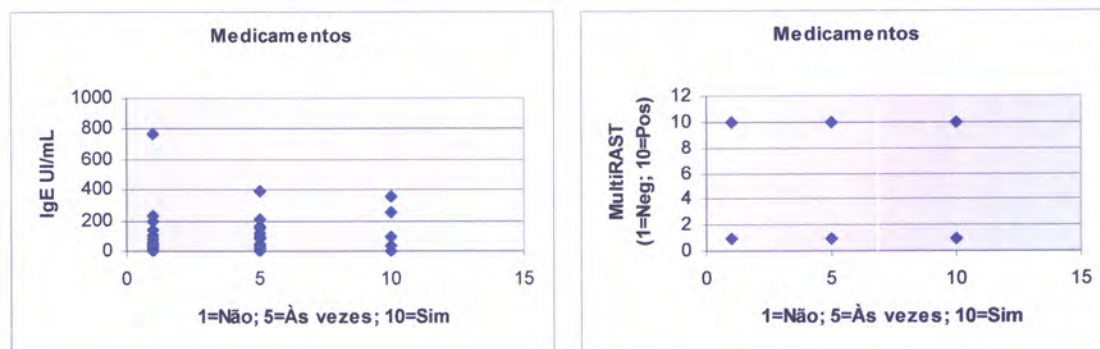


**Gráficos 6.13** – Influência dos medicamentos anti-inflamatórios e/ou anti-alérgicos nos marcadores de resposta inflamatória.





**Gráficos 6.14** – Influência dos medicamentos anti-inflamatórios e/ou anti-alérgicos nas proteínas constitutivas.



**Gráficos 6.15** – Influência dos medicamentos anti-inflamatórios e/ou anti-alérgicos nos marcadores de alergia.

Pela observação dos gráficos (Gráficos 6.12, 6.13, 6.14 e 6.15) pode deduzir-se que os resultados analíticos não são directamente influenciados pela toma dos medicamentos pesquisados, pelo que foram mantidas as análises efectuadas anteriormente.

## 7. Conclusões

Desde sempre que o Homem procurou proteger-se das agressões do exterior refugiando-se no interior da sua habitação: do frio, da chuva, do calor, dos animais e dos outros homens. Ao fazê-lo não parou de aperfeiçoar as condições de vida na sua casa e no local de trabalho ou de lazer, procurando um bem-estar cada vez maior. Essa procura não tem sido alcançada de igual forma, variando com os hábitos, costumes e sobretudo com a capacidade técnica e económica de cada sociedade. No mundo ocidental assiste-se a uma melhoria das condições de vida no interior dos edifícios (sistemas de aquecimento/arrefecimento, condições de iluminação, uso de materiais diversos na construção), particularmente ao longo dos dois últimos séculos. Paralelamente, a vida passou a fazer-se cada vez mais dentro dos edifícios, passando os indivíduos mais tempo neste ambiente. O Homem apercebeu-se então da repercussão deste “bem-estar” na sua saúde.

Do estudo efectuado pode concluir-se que a concentração de endotoxinas bacterianas no ambiente doméstico, deduzida a partir da quantificação de bactérias Gram-negativas em suspensão *indoor*, é muito baixa. O nível obtido demonstrou não influenciar os níveis basais dos marcadores de resposta inflamatória ou alérgica dos seus habitantes, pelo que a vigilância do seu efeito de agravamento de alguns estados patológicos terá de ser efectuada apenas com concentrações bacterianas mais elevadas ou nos casos de crise das patologias susceptíveis à sua actuação.

Foi também possível apurar que a concentração de endotoxinas *indoor* é influenciada pela idade da habitação, mas não pelo tipo de piso ou pela utilização de equipamentos de ar condicionado. Os diferentes materiais utilizados na construção civil ao longo dos anos poderão estar na base da explicação para estes resultados, no entanto o decorrer do tempo poderá ser também um factor de maior acumulação destas toxinas.

Os níveis muito baixos de endotoxinas, como os obtidos neste estudo, não induzem a toma de doses mais elevadas de medicamentos anti-inflamatórios ou anti-alérgicos, o que confirma a não interferência destes níveis residuais no estado de saúde dos indivíduos, mesmo daqueles que já possuem uma patologia deste foro associada.

Assim sendo, em condições normais e relativamente às endotoxinas bacterianas *indoor* presentes em suspensão aérea de ambientes domésticos, pode afirmar-se que o conforto habitacional obtido com a melhoria das condições gerais de vida não acarreta prejuízos significativos para a saúde humana

## Bibliografia

1. Gomes J. *Contaminação do ar interior por bioaerossóis*. (2002). Rev Port Pneumol VIII(6):689-694. Acedido: 12 de Outubro de 2008. Em: <http://www.sppneumologia.pt/publicacoes/?imc=50n&publicacao=22&edicao=261&fmo=pa>
2. Kuby J. *Kuby-Immunology*. (2003). Editora W. H. Freeman. Cap. 1:19-22; 2:32-43; 3:69-74; 11:254-55; 12:291-92; 13:299-314; 15:338-55 e 16:361-375. Acedido: 20 de Julho de 2008. Em: <http://www.megaupload.com/?d=7SC1P3JB>
3. Gaffin J. e Phipatanakul W. *The role of indoor allergens in the development of asthma*. (2009). Curr Opin Allergy Clin Immunol. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674017>
4. Santos F. et al. (2000). *Deteção de endotoxina pelo teste do Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) em Unidades de hemodiálise*. Rev Medicina On line. Volume 1 N.º6. Acedido: 22 de Setembro de 2008. Em: [http://www.medonline.com.br/med\\_ed/med8/endotox.htm](http://www.medonline.com.br/med_ed/med8/endotox.htm)
5. *Bactéria na poeira doméstica pode desencadear sintomas da asma*. (2005). American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Acedido: 24 de Setembro de 2008. Em: <http://emedix.uol.com.br/not/not2005/05set07pne-ajrcm-bih-asma.php>
6. Liebers V., Raulf-Heimsoth M. e Brüning T. (2008). *Health effects due to endotoxina inhalation (review)*. Arch Toxicol. 82(4):203-10. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322674>
7. Fransen F. et al. (2009). *Naturally occurring lipid A mutants in neisseria meningitides from patients with invasive meningococcal disease are associated with reduced coagulopathy*. PLoS Pathog. 5(4):e1000396. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390612>
8. Dong L., Li H., Wang S. e Li Y. (2009). *Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages*. J Asthma. 46(3):229-33. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373628>
9. Quadros M. (2008). *Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos*. Acedido: 1 de Fevereiro de 2009. Em: <http://www.tede.ufsc.br/teses/PGEA0317-D.pdf>
10. Sole M., Espadálé R. e Aubert A. *Endotoxinas en ambientes laborales*. Acedido: 12 de Outubro de 2008. Em: <http://www.siafa.com.ar/notas/nota103/endotoxinas.htm>
11. Gomes M. (2005). *Asma e ambiente*. Rev Port Pneumol XI, 2 (Supl 1): S33-S42. Acedido: 24 de Setembro de 2008. Em: <http://www.sppneumologia.pt/publicacoes/?imc=50n&publicacao=22&edicao=1501&fmo=pa>
12. Williams L. et al. (2005). *The role of endotoxin and its receptors in allergic disease*. Ann Allergy Asthma Immunol. 94(3):323-332. Acedido: 23 de Junho de 2009. Em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1351105>
13. Finlay B. e Falkow S. (1997). *Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Pp 136-169. Ed American Society for Microbiology. Acedido: 22 de Setembro de 2008. Em: <http://mmb.asm.org/cgi/reprint/61/2/136.pdf>
14. Raetz H. *More about E. coli, lipid A and endotoxin signaling*. Duke Biochemistry. Acedido: 17 de Maio de 2009. Em: <http://www.biochem.duke.edu/faculty/christian-raetz/research-interests>
15. *Lipopolisacáridos bacterianos: constitución química*. Acedido: 28 de Abril de 2009. Em: <http://patentados.com/img/2006/composiciones-qu4e-comprenden-hemoglobina-fetal-y-endotoxina-bacteriana-y-opcionalmente-componentes-de-higado-fetal-adicionales.png>
16. Baron E., Peterson L. e Finegold S. (1994). *Diagnostic Microbiology – Bailey & Scott's*. 9ª Edição. Ed Mosby. Pp 197; 369.
17. (2001). *Artigos*. MED OnLine. Acedido: 24 de Setembro de 2008. Em: <http://www.medonline.com.br/biern5.htm>
18. Fresno M. e Muñoz-Fernandez A. *Immunología de la infección*. Acedido: 12 de Outubro de 2008. Em: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema23/etexto23.htm>
19. (2006). *Citocinas Inflamatórias*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Acedido: 3 de Maio de 2009. Em: [http://users.med.up.pt/cc04-10/Imunologia/desgravadas/17\\_CitocinasInflamatorias.pdf](http://users.med.up.pt/cc04-10/Imunologia/desgravadas/17_CitocinasInflamatorias.pdf)
20. Almeida W., Campos A. e Schor N. (2006). *Endotoxinas e rim*. Rev Port Nefrol Hipert 20(3): 173-189. Acedido: 14 de Maio de 2009. Em: [http://www.spnephro.pt/RPNH/PDFs/n3\\_2006/artigo\\_04.pdf](http://www.spnephro.pt/RPNH/PDFs/n3_2006/artigo_04.pdf)
21. Miller S., Ernst R. e Bader M. (2005). *LPS, TLR4 and infectious disease diversity*. Nature Reviews Microbiology 3: 36-46. Acedido: 17 de Maio de 2009. Em: [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n1/fig\\_tab/nrmicro1068\\_F3.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n1/fig_tab/nrmicro1068_F3.html)
22. Godowski P. (2005). *A smooth operator for LPS responses*. Nature Immunology 6: 544-546. Acedido: 17 de Maio de 2009. Em: [http://www.nature.com/ni/journal/v6/n6/fig\\_tab/ni0605-544\\_F1.html](http://www.nature.com/ni/journal/v6/n6/fig_tab/ni0605-544_F1.html)
23. Mohr C. (2006). *Mannose-binding Lectin (MBL)*. Davidson College. Acedido: 28 de Maio de 2009. Em: <http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Mohr/MBL.html>
24. Kravitz M. e Shoenfeld Y. (2006). *Autoimmunity to protective Molecules: Is it the Perpetuum Mobile (Vicious Cycle) of Autoimmune Rheumatic Diseases?* Nature Clinical Practice Rheumatology. Acedido: 15 de Junho de 2009. Em: <http://www.medscape.com/viewarticle/543904>
25. Roitt I. & Delves P. (2001). *Essential Immunology – Roitt's*. 10ª Edição. Ed Blackwell Science. Pp 10-17.

26. Peisajovich A. et al. (2008). *C-reactive Protein at the Interface Between Innate Immunity, Inflammation: CRP Structure & Expression*. *Expert Rev Clin Immunol* 4(3): 379-390. Acedido: 28 de Maio de 2009. Em: [http://www.medscape.com/viewarticle/575924\\_3](http://www.medscape.com/viewarticle/575924_3)
27. Asencio P. (2007). *Importancia del Sistema de Complemento*. *Rev Med Vallejana* vol.1 no.4: 68-78. Acedido: 17 de Maio de 2009. Em: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1817-20752007000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1817-20752007000100008&script=sci_arttext)
28. Nature Reviews/Immunology. Acedido: 26 de Maio de 2009. Em: <http://plab.ku.dk/tcbh/complementpathways.gif>
29. *Sistema do Complemento. Vias de ativação e Regulação. Atividades Biológicas de seus Produtos*. Acedido: 26 de Maio de 2009. Em: <http://www.rbi.fmrp.usp.br/immunobiol/aulas/t5.htm>
30. *Human Complement Component 5 (C5)*. Davidson College. Acedido: 26 de Maio de 2009. Em: <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/Immunology/Students/spring2006/Fiser/C5.html>
31. Olivares E. et al. *Sistema del complemento*. Acedido: 26 de Maio de 2009. Em: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema13/etexto13.htm>
32. Góis F. et al. (2005). *Adesão celular*. Faculdade de Medicina Dentária. Acedido: 11 de Junho de 2009. Em: <http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2005/adesaoecelular.doc>
33. Segawa C. et al. (1997). *In situ expression and soluble form of P-selectin in human glomerulonephritis*. *Kidney Int* 52(4): 1054-63. Acedido: 12 de Junho de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328945>
34. Sousa V. *Matriz Extracelular*. Patologia Molecular em Medicina. Acedido: 12 de Junho de 2009. Em: <https://woc.uc.pt/fmuc/getFile.do?tipo=1&id=322>
35. Filho P. *Asma Brônquica – Adesão de Moléculas*. Acedido: 11 de Junho de 2009. Em: [http://www.asma-bronquica.com.br/medical/adesao\\_moleculas.html](http://www.asma-bronquica.com.br/medical/adesao_moleculas.html)
36. López J. e Rodriguez-Acosta A. (2003). *Metaloproteasas – Desintegrinas en el campo de la ofidiologia*. VITAE Academia Biomédica Digital. Acedido: 12 de Junho de 2009. Em: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeDicisiete/Articulos/Ofidiologia/ArchivosHTML/ofidiologia.pdf>
37. Janeway C. et al. (2001). *Immunobiology 5 – The immune system in health and disease*. 5ª Edição. Ed Garland. Pp 77-100.
38. Abitbol R. et al. *Papel das Selectinas na Atividade Inflamatória*. MedStudents. Acedido: 4 de Junho de 2009. Em: <http://www.medstudents.com.br/original/revissao/selectin/selectin.htm>
39. *Macrophage inflammatory protein*. Acedido: 27 de Junho de 2009. Em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage\\_inflammatory\\_protein](http://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_inflammatory_protein)
40. Cavadas C. (2008). *Mastócitos*. *Histologia e Embriologia Humana*. Acedido: 12 de Junho de 2009. Em: <http://woc.uc.pt/ffuc/getFile.do?tipo=2&id=1961>
41. Filho P. *Asma Brônquica – Inflamação Alérgica*. Acedido: 25 de Junho de 2009. Em: [http://www.asma-bronquica.com.br/medical/inflamacao\\_alergica.html](http://www.asma-bronquica.com.br/medical/inflamacao_alergica.html)
42. Rech R. e Graça D. (2006). *Mastócitos em Condições Normais e Patológicas – Revisão*. *Vet Not* vol.12 no.1: 51-60. Acedido: 27 de Junho de 2009. Em: <http://www.vetnot.famev.ufu.br/include/getdoc.php?id=171&article=42&mode=pdf>
43. Gounni A. (2006). *The high-affinity IgE receptor (FcεRI): a critical regulator of airway smooth muscle cells?* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L312-L321. Acedido: 25 de Junho de 2009. Em: <http://ajplung.physiology.org/cgi/content/full/291/3/L312>
44. Austen K. *Harrison's Principles of Internal Medicine Online*. 17ª Edição. Ed Mac Graw Hill. Cap 311. Acedido: 28 de Setembro de 2008. Em: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aid=2858746>
45. Koretzky G., Abtahian F. e Silverman M. (2006). *SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond*. *Nature Reviews Immunology* 6: 67-78. Acedido: 24 de Junho de 2009. Em: [http://www.nature.com/nri/journal/v6/n1/fig\\_tab/nri1750\\_F3.html](http://www.nature.com/nri/journal/v6/n1/fig_tab/nri1750_F3.html)
46. Júnior M. *Células do Sistema Imune*. Acedido: 13 de Junho de 2009. Em: <http://ioh.medstudents.com.br/imuno2.htm>
47. Carol F. (2007). *Mastócitos*. SHVOONG. Acedido: 16 de Junho de 2009. Em: <http://pt.shvoong.com/medicine-and-health/structural-biology/1617151-mast%C3%B3citos/>
48. Lima L., Fraga C. e Barreiro E. (2002). *Agentes Antiasmáticos Modernos: Antagonistas de Receptores de Leucotrienos Cisteínicos*. *Quim Nova* vol.25 no.5. Acedido: 14 de Junho de 2009. Em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000500019&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000500019&script=sci_arttext)
49. *Células envolvidas na Inflamação*. Odonto UFPR. Acedido: 16 de Junho de 2009. Em: <http://www.geocities.com/odontoufpr/ceinfla.html>
50. *Vacina Antialérgica – Três Elementos*. ALLOS Laboratórios. Acedido: 24 de Setembro de 2008. Em: <http://www.allos.com.br/PDF/VACINA%20ANTIALERGI CA%203%20ELEMENTOS.pdf>
51. Silva J. et al. (2000). *Endotoxins, asthma, and allergic immune responses*. *Toxicology* 152(1-3):31-5. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090937>
52. Galvani A., Krebs V. e Vaz F. (1998). *Características bioquímicas e propriedades dos mediadores humorais nas infecções bacterianas*. Acedido: 14 de Maio de 2009. Em: <http://pediatriasao paulo.usp.br/upload/html/414/body/07.htm>
53. Marques-Deak A. e Sternberg E. (2004). *Psiconeuroimunologia – A relação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico*. *Rev Brás Psiquiatr* 26(3): 143-4. Acedido: 3 de Maio de 2009. Em: <http://www.scielo.br/pdf/rbp/v26n3/a02v26n3.pdf>
54. Webster J., Tonelli L. e Sternberg E. (2002). *Neuroendocrine regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol* 20:125-63. Acedido: 3 de Maio de 2009. Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861600>

55. Costa C. e Sampietro V. *Terapia nutricional no paciente séptico*. Hospital Anchieta. Acedido: 11 de Junho de 2009. Em:  
[http://www.hospitalanchieta.com.br/acms/clientes/anchieta/index.php?a=dicas\\_saude\\_ver.php&ID\\_MATERIA=87](http://www.hospitalanchieta.com.br/acms/clientes/anchieta/index.php?a=dicas_saude_ver.php&ID_MATERIA=87)
56. Ngoc P. *et al.* (2005). *Cytokines, allergy, and asthma*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5(2): 161-6. Acedido: 1 de Maio de 2009. Em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764907>
57. Moreira A. (2003). *Mecanismos etiopatogénicos das bactérias, vírus e parasitas na regulação da resposta alérgica*. *Rev Port Imunoalergol XI*: 216-20. Acedido: 24 de Setembro de 2008. Em:  
[http://www.spaic.pt/download.php?path=pdfs&filename=RPI\\_2003\\_11\\_210\\_textos.pdf](http://www.spaic.pt/download.php?path=pdfs&filename=RPI_2003_11_210_textos.pdf)
58. *Spin Air – Air Sampler*. Acedido: 16 de Junho de 2009. Em:  
<http://www.iul-inst.com/spin-air-air-sampler.html>
59. *SPIN AIR V2 – User’s guide*. IUL Instruments. Doc. No. 6169R01
60. *Media – MacConkey Agar*. Acedido: 20 de Junho de 2009. Em:  
<http://www.microbeid.com/Media/mac.html>
61. (2006). *CRPLX/C-Reactive Protein (Latex)*. Analisadores cobas®6000. Manual de Métodos para o analisador cobas c 501. Roche Diagnostics.
62. (2008). *Teste Tina quant □ α1-antitripsina, 2ª geração*. Manual de Métodos. COBAS INTEGRA 400/700/800. Roche Diagnostics.
63. (2007). *STA Fibrinogen*. Diagnostica Stago. Roche Diagnostics.
64. (2007). *Analisador de Hematologia Automático XE-5000. Instruções de Utilização*. Sysmex Corporation. Cap 4 e 11.
65. (2006). *ALB2 – Albumin Gen.2*. Analisadores cobas®6000. Manual de Métodos para o analisador cobas c 501. Roche Diagnostics.
66. Kalantar-Zadeh K. *et al.* (1998). *Total Iron-Binding Capacity-Estimated transferrin Correlates With the Nutritional Subjective Global Assessment in Hemodialysis Patients*. *Am J Kidney Diseases*, vol.31 no.2: 263-272. Acedido: 11 de Agosto de 2009. Em:  
[http://www.nephrology.rei.edu/TIBC\\_98.pdf](http://www.nephrology.rei.edu/TIBC_98.pdf)
67. Kalantar-Zadeh K. *et al.* (1995). *Diagnosis of iron deficiency anemia in renal failure patients during the post-erythropoietin era*. *Am J Kidney Diseases* 26(2): 292-9. Acedido: 11 de Agosto de 2009. Em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7645533>
68. Yamanishi H. *et al.* (2003). *Total Iron-binding Capacity Calculated from Serum Transferrin Concentration or Serum Iron Concentration and Unsaturated Iron-binding Capacity*. *Clinical Chemistry* 49: 175-178. Acedido: 11 de Agosto de 2009. Em:  
<http://www.clinchem.org/cgi/content/full/49/1/175>
69. (2006). *UIBC – Unsaturated Iron-Binding Capacity*. Analisadores cobas®6000. Manual de Métodos para o analisador cobas c 501. Roche Diagnostics.
70. (2006). *IRON2 – Iron Gen.2*. Analisadores cobas®6000. Manual de Métodos para o analisador cobas c 501. Roche Diagnostics.
71. (2009). *IgE II – Imunoglobulina E*. Analisadores cobas®6000. Manual de Métodos para o analisador cobas c 501. Roche Diagnostics.
72. (2006). *ImmunoCAP Specific IgE*. Phadia. Acedido: 11 de Agosto de 2009. Em:  
[http://www.immunocapinvitrosight.com/dia\\_templates/ImmunoCAP/PageReferences\\_27685.aspx](http://www.immunocapinvitrosight.com/dia_templates/ImmunoCAP/PageReferences_27685.aspx)

# Anexo

(Questionário + Declaração)

## Questionário

Tese de Mestrado

"Endotoxinas bacterianas *indoor* – Influência na resposta inflamatória e alérgica"

♦ Qual a idade aproximada da sua habitação?

---

♦ Qual o tipo de piso que a sua habitação possui, nomeadamente em salas e quartos?

---

♦ Possui ar condicionado, ou outro tipo de ventilação, no interior da habitação?

---

♦ Utiliza purificadores de ar na sua habitação?

---

♦ Possui alguma doença crónica? Se sim, por favor refira qual ou quais.

---

♦ Sofre de algum tipo de alergia? Se sim, por favor refira qual ou quais.

---

♦ Costuma espirrar com frequência ou ter irritação nasal ou ocular?

---

♦ Já teve crises de asma (falta de ar)? Se sim, refira a frequência (raramente, algumas vezes, frequentemente).

---

♦ Costuma tomar medicamentos anti-alérgicos ou anti-inflamatórios? Se sim, refira a frequência (raramente, algumas vezes, frequentemente).

---

Obrigada!

## DECLARAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_

Abaixo-assinado, declaro por minha honra, que:

- Respondi com verdade a todas as perguntas que me foram dirigidas neste questionário;
- Tenho conhecimento de que serão efectuadas análises no meu sangue, nomeadamente:
  - \* Hemograma
  - \* Proteína C Reactiva
  - \*  $\alpha$ -1-antitripsina
  - \* Fibrinogénio
  - \* Transferrina
  - \* Albumina
  - \* IgE total
  - \* RAST
- Aceito a pesquisa de bactérias Gram-negativas no ambiente interior da minha habitação.
- Fui informado(a) de que os dados obtidos são confidenciais e serão utilizados exclusivamente para o estudo do trabalho referido.

Nestas circunstâncias, autorizo que me seja feita uma colheita de sangue e seja recolhida uma amostra de ar no interior da minha habitação, no âmbito do Trabalho de Tese de Mestrado de Alzira Miguéns Lopes Louro, aluna n.º 4136 do Mestrado de Análises Aerobiológicas da Universidade de Évora, e assino voluntariamente esta declaração em plena consciência.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_