

SHIRLEY YUMI HAYASHI

**ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E
COMPLEXOS IMUNES CIRCULANTES
NA ENDOCARDITE INFECCIOSA**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação - Mestrado em
Cardiologia, Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Iara José Taborda de Messias

CURITIBA
1995

SHIRLEY YUMI HAYASHI

ATIVACÃO DO COMPLEMENTO E COMPLEXOS IMUNES CIRCULANTES NA
ENDOCARDITE INFECCIOSA.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Cardiologia - Mestrado, da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Profa.Dra. Iara José Taborda de Messias
Setor de Ciências da Saúde,UFPr

Prof.Dr. Acyr Rachid
Setor de Ciências da Saúde,UFPr

Prof.Dr. Iseu Affonso da Costa
Setor de Ciências da Saúde,UFPr

Prof. Antonio Carlos Boaretti
Setor de Ciências da Saúde,UFPr

Curitiba,30 de dezembro de 1995

Ao meu filho Tiago, por ter
retribuído com amor, a minha falta de tempo.
A minha Mãe e meu esposo Marcelo.

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra.Iara José Taborda de Messias pela sua orientação e participação efetiva em todas as fases do trabalho, pela sua compreensão, estímulo constante e principalmente por sua amizade e dedicação que foram essenciais para que esta tese fosse concluída.

Ao Prof.Dr.Anselmo Chaves Neto , do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, por sua orientação firme e segura na análise estatística dos dados.

Ao Prof.Dr.Antonio Carlos Boaretti, pela sua orientação e conhecimento .

Ao Dr.Iris Victor Bianco , Dra. Divone Freitas e Dr.Alexandre Alessi por terem me substituído em minhas atividades profissionais.

A Todos os pacientes que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dra. Elvira Missako Doi do Setor de sorologia do Laboratório do Hospital de Clinicas , por sua gentileza e colaboração.

Ao Dr. Renato Mitsunori Nisihara do Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná, por sua colaboração.

Ao Dr.Dalton Bertolin Précoma pela colaboração e incentivo na realização do trabalho.

A Dra. Cleonice Bueno e Dra.Heloisa Bonfá do Laboratório de Imunopatologia Humoral-Reumatologia da Universidade de Medicina de São Paulo, pela realização das dosagens de imuno complexos.

A Valéria T.Avelleda Knapp e Lúcia Lemiszka, que sempre nos atendem na secretaria do Curso de Pós Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná.

LISTA DE TABELAS

1 - Resultados obtidos nos pacientes com endocardite infecciosa.....	72
2 - Comparação dos valores médios de CIC (Anti-C3 ELISA), C3, C4, C3d, C3a desArg, TCC, C1rs-C1inh e C3bBbP entre controles normais, valvares e pacientes com endocardite infecciosa.....	74
3 - Correlação entre os resultados obtidos dos diferentes marcadores estudados nos pacientes com endocardite infecciosa.....	82
4 - Manifestações extra-cardíacas mais frequentes, complexos imunes circulantes e ativação do complemento nos pacientes com EI.....	86
5 - Estudos prévios analisando componentes do complemento em EI.....	94
6 - Dosagens de CIC na EI.....	100

LISTA DE QUADROS

1 - Proteínas do sistema complemento.....	36
2 - Proteínas plasmáticas reguladoras do complemento.....	45
3 - Proteínas de membrana reguladoras de complemento.....	46
4 - Atividades biológicas geradas pela ativação do complemento.....	49
5 - Fatores que influenciam os níveis dos complexos imunes circulantes.....	52

LISTA DE FIGURAS

1 - Esquema de ativação das vias clássica e alternativa do complemento.....	42
2 - Principais funções biológicas do complemento.....	48

3 - Participação do complemento na solubilização dos CIC.....	54
4 - Representação esquemática do mecanismo de processamento dos complexos imunes.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

1 - Níveis médios de C3d observados nos pacientes com endocardite infecciosa, controles valvares e con- troles normais.....	75
2 - Níveis médios de C3a-desArg observados entre os pacientes com endocardite infecciosa, controles valvares e controles normais.....	76
3 - Comparação dos níveis de TCC entre os pacientes com endocardite infecciosa, controles valvares e controles normais.....	77
4 - Comparação dos níveis de Cirs-Clinh entre os pacientes com endocardite infecciosa, controles valvares e con- troles normais.....	78
5 - Comparação entre os níveis médios de CIC, C3d, C3adesArg, TCC, VC e VA entre os pacientes com manifestação pulmonar e sem manifestação pulmonar....	86
6 - Comparação dos níveis médios de CIC, C3d, TCC e VC entre os pacientes com mais de uma manifestação extra-cardíaca e pacientes com manifestação única....	87
7- Frequência dos microorganismos encontrados nas hemoculturas dos pacientes com endocardite infecciosa.....	88
8- Comparação entre os pacientes com hemoculturas positivas e negativas e a presença de complexos imunes circulantes.....	89
9 - Distribuição dos pacientes com endocardite infecciosa quanto à evolução final.....	90
10- Comparação entre os valores médios de CIC, C3a desArg, TCC e VC entre os pacientes que foram à óbito e os que tiveram cura.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	- Antígeno
Ac	- Anticorpo
EI	- Endocardite Infecciosa
CIC	- Complexos Imunes Circulantes
C	- Complemento
DAF	- Fator acelerador de decaimento
FR	- Fator Reumatóide
GN	- Glomerulonefrite aguda
IR	- Insuficiência Renal
LES	- Lupus Eritematoso Sistêmico
MBG	- Membrana basal glomerular
VA	- C3bBbP
VC	- C1rs-C1inh

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE QUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE GRÁFICOS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Endocardite Infecciosa.....	21
3.2.1 Patogênese.....	24
3.2.2 Aspectos imunológicos.....	27
3.2 Complemento.....	33
3.2.1 Histórico.....	33
3.2.2 Nomenclatura.....	34
3.2.3 Ativação do sistema complemento....	36
1 Via Clássica.....	36
2 Regulação da via clássica.....	38
3 Via alternativa.....	38
4 Regulação da via alternativa.....	40
3.2.4 Complexo de ataque de membrana....	43
1 Regulação do complexo de ataque de membrana.....	43
3.2.5 Receptores do complemento.....	44

3.2.6 Atividades Biológicas do Sistema Complemento.....	46
3.3 Complexos imunes.....	50
3.3.1 Formação dos complexos imunes.....	50
3.3.2 Solubilização e Eliminação dos imunocomplexos.....	53
3.3.3 Lesão tecidual mediada por depósito de complexos imunes...	55
3.4 Complexos Imunes e Complemento na Endocardite Infecciosa.....	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1 Pacientes.....	63
4.1.1 Seleção dos pacientes.....	63
4.1.2 Amostras sanguíneas.....	64
4.2 Ensaio Imunológico.....	65
4.2.1 C3 e C4.....	65
4.2.2 Dosagem de Imunocomplexos circulantes.....	66
4.2.3 Dosagem de C3d.....	66
4.2.4 TCC.....	67
4.2.5 C3a desArg.....	68
4.2.6 Dosagem do Complexo C1rs-C1inh (VC).....	69
4.2.7 Dosagem do Complexo C3bBbP (VA).....	70
4.2.8 Fator Reumatóide.....	70
4.3 Análise Estatística.....	71
5 RESULTADOS	72
5.1 C3d.....	75

5.2 C3a desArg.....	76
5.3 TCC.....	77
5.4 Via Clássica (Clrs-Clinh).....	78
5.5 Via Alternativa (C3bBbP).....	79
5.6 CIC.....	79
5.7 C3 e C4.....	80
5.8 Fator Reumatóide.....	80
5.9 Correlação entre os marcadores estudados e Ativação do Complemento.....	80
5.10 Manifestações Extracardíacas.....	83
5.10.1 Correlação entre as manifestações extra-cardíacas, ativação do sistema complemento e complexos imunes circulantes.....	83
5.10.1.1 Manifestações Renais.....	83
5.10.1.2 Manifestações Pulmonares.....	84
5.10.1.3 Esplenomegalia.....	85
5.10.1.4 Manifestações neurológicas.....	85
5.10.1.5 Presença de mais de uma manifestação extra cardíaca.....	86
5.11 Microorganismos envolvidos.....	87
5.11.1 Correlação entre microorganismos , ativação de complemento e imunocomplexos circulantes.....	88
5.12 Evolução.....	90
5.12.1 Correlação entre o tempo de evolução pré-internamento e as medidas de C3d, C3a desArg TCC, VC, VA e CIC.....	91

6 DISCUSSÃO.....	93
6.1 Complemento e Endocardite Infecciosa.....	93
6.2 Complexos Imunes Circulantes e Endocardite Infecciosa.....	99
6.3 Correlação entre manifestações extra-cardíacas ativação do complemento, presença de complexos imunes circulantes.....	105
6.4 Presença e tipo de agente etiológico, complexos imunes circulantes e ativação do complemento.....	109
6.5 Tempo de evolução prévio ao internamento , evolução favorável ou desfavorável, complexos imunes circulantes e ativação do complemento.....	110
7 CONCLUSÕES.....	113
 ANEXO 1 - Critérios diagnósticos para endocardite infecciosa.....	 115
ANEXO 2 - Lista dos pacientes	117
ANEXO 3 - Relação dos pacientes e critérios diagnósticos	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

RESUMO

No presente trabalho, foram investigados a ativação do complemento e a presença de complexos imunes circulantes (CIC) em um grupo de 20 pacientes com endocardite infecciosa, 15 controles valvares e 14 indivíduos normais. A ativação do complemento foi determinada através de diferentes ensaios enzimáticos (ELISA) para avaliação dos seguintes produtos de ativação do complemento : C3d, C3a desArg, TCC, C1rs-C1inh e C3bBbP, e imunoeletroforese de duplo produto foguete para determinação do fragmento C3d. Os níveis de C3 e C4 foram avaliados através de turbidimetria. Os CIC foram determinados através de ELISA para detecção de C1q e C3. Todos os pacientes com EI apresentaram aumento de pelo menos um marcador de ativação do complemento, sendo que na maioria dos casos (65%) todos os ensaios, com exceção de C3bBbP apresentaram valores significativamente maiores do que os controles (C3d $p < 0.00004$), C3a desArg ($p < 0.03$), TCC ($p < 0.01$), C1rs-C1inh ($p < 0.00007$). Os níveis de C3d e C3a desArg foram significativamente maiores nos pacientes com manifestações pulmonares (C3d $p = 0.0268$ e C3a desArg $p = 0.0301$) e de C3d nos pacientes que evoluíram com óbito ($p = 0.0196$). Os CIC (C3) estiveram presentes em 35% dos pacientes, sendo este resultado estatisticamente significativo quando comparado com os controles ($p = 0.0055$). Os níveis de C3 apresentaram-se diminuídos nos pacientes com EI quando comparados aos controles valvares ($p = 0.048$) e os níveis de C4 se relacionaram negativamente com a presença de CIC ($p = 0.037$). Não houve correlação entre os níveis de CIC e os produtos de

ativação do complemento. Estes achados demonstram que na EI ocorre ativação do complemento, principalmente pela via clássica mediada possivelmente por complexos imunes e sugerem que os marcadores C3d e C3a desArg possam ser possíveis indicadores de lesão de órgãos e gravidade da doença.

1 - INTRODUÇÃO

Muitos estudos tem sido realizados em relação as manifestações imunológicas da Endocardite Infecciosa(EI). No curso da EI os pacientes desenvolvem altos títulos de anticorpos contra o microorganismo causador da doença. Esta resposta porém não é suficiente para interromper a infecção, e devido a antigenemia contínua, a produção aumentada de anticorpos favorece a formação de complexos imunes que podem circular ou se depositar nos tecidos provocando lesão tecidual. [Bayer et al,1977; O'Connor et al,1979].

O sistema complemento exerce um papel importante nos processos infecciosos e nas doenças mediadas por depósitos de complexos imunes como é o caso da EI.

A formação de complexos imunes bem como a ativação do complemento fazem parte da resposta normal do hospedeiro contra agentes infecciosos. Porém em determinadas circunstâncias, tanto os complexos imunes como a ativação do complemento estão envolvidos nos mecanismos de lesão tissular e fisiopatologia de algumas doenças [Endo et al,1985].

No caso da EI o excesso de complexos imunes formados pode levar a uma exacerbação da ativação do complemento causando uma maior lesão tecidual.

Complexos imunes circulantes e depositados nos tecidos tem sido identificados em muitos pacientes com doenças infecciosas.

Na EI a presença de CIC tem sido demonstrada por vários autores [Bayer et al,1976; Bayer et al,1977; Bayer et al,1979; Cabane et al,1979; Kauffman et al,1981; Inman et al,1984; Maisch et

al,1983; Deck et al,1988; Petelenz et al,1988], a qual se relacionou com a presença de sinais cutâneos [Cabane et al,1979], resposta à terapêutica antimicrobiana [Bayer et al,1977; Bayer et al,1979; Cabane et al,1979; Kauffman et al,1981; Maisch et al,1983; Deck et al,1978], o comprometimento renal[Keslin et al,1973; Bayer et al,1977; Maisch et al ,1983; Lida et al,1985; Rovzar et al,1986], o tempo de evolução prolongado da doença [Kauffman et al,1981], a virulência do germe causador [Kauffman et al,1981] e a síndrome "like" purpura trombocitopênica trombótica [Bayer et al,1977].

De acordo com os dados desta literatura, a determinação de CIC passou a ter uma aplicação prática no diagnóstico e monitorização da EI [Kauffman et al,1981; Maisch et al,1983; Petelenz et al,1988].

Com o achado de depósitos glomerulares de complexos imunes e complemento na EI, estes componentes tem sido implicados na causa de muitas lesões extra-cardíacas da doença [Cabane et al,1979].

Várias alterações renais são descritas, algumas das quais podem levar à IR persistente [Keslin et al,1973;Bayer et al,1977; Lida et al,1985; Rovzar et al,1986]. Foi descrito um caso de EI associada a glomerulonefrite rapidamente progressiva que necessitou de tratamento com plasmaferese , corticoterapia e azatioprina para reverter a insuficiência renal, demonstrando a importância do quadro imunológico na EI [Rovzar et al,1982].

O processo pelo qual os CIC intravasculares na EI se depositam no tecido para iniciar algumas das lesões extra-cardíacas desta doença permanece como uma questão não respondida

[Bayer et al,1990]. É sabido que uma cascata do complemento intacta está criticamente envolvida na inibição da precipitação e solubilização dos CIC. O complemento portanto parece exercer um importante papel na EI, atuando por um lado no transporte e eliminação dos CIC e por outro mediando a reação inflamatória que leva a injúria tecidual.

Muitos dos trabalhos realizados, sobre o complemento na EI, têm obtido resultados divergentes pois somente têm avaliado os níveis protéicos dos seus componentes. Alguns autores encontraram valores diminuídos dos níveis do complemento sugerindo um consumo aumentado [Cabane et al,1979; Bayer et al,1977]. Outros verificaram valores normais e até aumentados, concluindo que sua função estivesse intacta na doença [Kee e Maisch et al, 1983]. Na realidade estas interpretações das medidas de componentes do complemento na infecção devem ser feitas com cuidado , já que os níveis protéicos dos componentes do complemento refletem o balanço entre a sua síntese, catabolismo e ativação [O'Connor et al,1978].

Poucos trabalhos porém foram realizados sobre a ativação do complemento na EI [Enriquez et al,1984; Pocidalo et al,1982]. Com a introdução de métodos que permitem a dosagem de produtos de degradação da ativação do complemento tornou-se possível estudar a ativação desse sistema mais adequadamente.

O presente estudo incluiu a dosagem dos fragmentos C3d e C3a desArg e dos complexos TCC, C1rs-C1inh e C3bBbP que são produzidos em vários níveis da cascata da ativação do complemento e a dosagem de CIC pelo método de ELISA Anti-C1q e Anti-C3. Buscando determinar a ativação do complemento, as suas vias

preferenciais de ativação e confirmar a presença de CIC na EI, como relata a literatura. Os achados deste estudo poderão contribuir para um melhor conhecimento da participação do sistema complemento na EI.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1 - Determinar a ativação das vias clássica e alternativa do complemento na EI.
- 2- Correlacionar os níveis e a via de ativação do complemento com a presença de manifestações extra-cardíacas, tempo de evolução prolongado, prognóstico e o agente etiológico
- 3 - Determinar os níveis de CIC em pacientes com EI e estabelecer o valor do CIC no diagnóstico da EI no nosso meio.
- 4 - Correlacionar as medidas da ativação do complemento com os níveis de CIC.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - ENDOCARDITE INFECCIOSA

A Endocardite Infecciosa (EI) é definida como doença decorrente da infecção de valvas cardíacas, das grandes artérias e próteses valvares, na qual o endotélio é o sítio inicial da infecção [Shively, 1995]. Muitos autores denominam a doença mencionando o agente etiológico e o estado cardíaco do paciente (por exemplo: Endocardite por *Streptococcus mutans* em portador de insuficiência mitral reumática) [Mansur,1994]. Sua incidência é baixa sendo estimada em 3,8 casos por 100.000 pessoas /ano [Griffin,1985]. No Instituto do Coração do Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, a EI foi responsável por uma em cada 110 internações, no período de 1978 a 1986. A frequência mensal foi de 2,51 casos até 1980 e nos anos seguintes de 3,41 casos [Grinberg e Décourt, 1995].

A primeira descrição de Endocardite foi registrada por Lazare Riviere em 1646 e a primeira classificação foi publicada em 1883 por Eichorst. Em 1885, Osler observou em cerca de 75% dos pacientes com EI, lesão subjacente em valvas cardíacas e descreveu as características clínicas e patológicas de modo pormenorizado. Em 1943, Florey e Loewe relataram a cura bem sucedida da EI pela penicilina, na sua forma subaguda. O surgimento de novos fatores influenciaram a evolução da EI, como o aparecimento de novos antibióticos, o aumento do consumo de drogas endovenosas e o desenvolvimento crescente da cirurgia cardíaca que abriu novas perspectivas como terapêutica decisiva na cura da infecção[Weistein,1987; Steckelberg e Wilson,1993],

porém, tem sido responsável por outro subgrupo de EI devido à infecção nas próteses valvares [Gevigney et al,1993].

Um grande espectro de microorganismos tem sido implicado no desenvolvimento da EI, porém 80% a 90% dos casos são decorrentes de infecção por bactérias do gênero estreptococo e estafilococo [Mendes et al,1995].

As manifestações clínicas são decorrentes do processo infeccioso (sintomas gerais, tais como: mal estar, febre, anorexia, emagrecimento), da repercussão anatômica cardíaca (disfunção valvar ou agravamento de disfunção preexistente), de embolias resultantes do desprendimento de fragmentos de vegetações e do estímulo antigênico prolongado (glomerulonefrite)[Mansur,1994]. O quadro clínico pode ser de longa duração, arrastado, ou ser abrupto e fulminante [Weinstein,1987]. Ao exame físico os achados específicos são infrequentes e os inespecíficos, que são a maioria, para o diagnóstico devem ser interpretados em conjunto com os achados de anamnese.

O diagnóstico da EI é um desafio na medicina, pois as manifestações clínicas são numerosas, geralmente inespecíficas envolvendo muitos órgãos, tendendo a mimetizar outras patologias e entrando no seu diagnóstico diferencial. Além disso, esta dificuldade aumenta no subgrupo de pacientes que tem hemoculturas negativas [Lukes et al,1993; Shively,1995].

Na última década a ecocardiografia tem sido utilizada como um importante método de detecção de vegetações em pacientes portadores de EI e com a evolução deste método e a introdução da ecocardiografia transesofágica em 1976 [Rohmann et al,1995], houve um aumento na sensibilidade e especificidade do diagnóstico

da EI. Entretanto, nas últimas duas décadas, este importante recurso complementar ficou à margem dos critérios diagnósticos utilizados. Porém, Durack et al [1994], recentemente propuseram um novo esquema para o diagnóstico da EI, com a inclusão da imagem ecocardiográfica.

O tratamento da EI visa a manutenção das condições gerais do paciente que inclui, o tratamento com antibioticoterapia específica e conseqüente esterilização da vegetação, a prevenção e tratamento das complicações. A prevenção da bacteremia na EI, na avaliação e tratamento odontológicos[Choutet,1995].

3.1.1 - PATOGÊNESE DA ENDOCARDITE INFECCIOSA

Numerosas e importantes observações em relação a patogênese da EI tem sido feitas, sendo muitas delas realizadas em modelos animais. Tanto as propriedades inerentes aos patógenos, bem como o substrato sobre o qual eles se instalam, são considerados como fundamentais para a determinação da endocardite.

As endocardites originadas no coração direito parecem ter uma evolução mais favorável, conforme documentam alguns estudos [Baddour et al,1989; Bayer,1990]. Tem sido proposto que a diferença na tensão de oxigênio, influência esta diferença pois alguns microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* do grupo *viridans* produzem materiais extracelulares(glicocalix) em presença de tensões mais elevadas de oxigênio, o que os tornam mais resistentes a penetração de antimicrobianos e também a opsonização por anticorpos ou complemento [Baddour et al,1989;Ramos,1995].

As doenças valvares, tanto congênitas como adquiridas, criam condições hemodinâmicas locais que podem levar a lesões do endotélio. A infecção usualmente aparece ao longo da superfície de coaptação dos folhetos, sugerindo que o pequeno trauma que inicia a endocardite pode estar relacionado à abertura e fechamento da valva [Steckelberg e Wilson,1993; Shively,1995]. A exposição da matriz subendotelial faz com que elementos da coagulação, como plaquetas e fibrina, se depositem levando à formação de trombos microscópicos na superfície do folheto [Davies,1992; Johnson,1993]. Na endocardite trombótica vários componentes não bacterianos, como as plaquetas e fibrina, se

depositam na superfície endocárdica lesada levando a formação de um trombo estéril. Os microorganismos implicados na EI além de ter a habilidade de interagir com os tecidos cardíacos diretamente, parecem ter uma tendência particular em aderir a estes depósitos [Baddour et al,1989; Johnson,1993] e se incorporar na camada de fibrina, ficando em um sítio protegido da ação dos neutrófilos fagocíticos [Davies,1992].

Apesar dos avanços nas técnicas da cirurgia cardiovascular e o uso de antimicrobianos profiláticos, a endocardite de valva protética continua complicando o curso de uma pequena percentagem de pacientes após a troca valvar. A etiologia microbiana nos casos de EI precoce é dominada pelos estafilococos, sendo que o *S.epidermidis* e *S.aureus* correspondem a 30% e 20% dos casos respectivamente [Chastre e Trouillet,1995].

As endocardites em próteses instaladas há mais de 1 ano têm como principais agentes etiológicos o *S.epidermiditis*, *S.aureus*, *Streptococcus* do grupo *viridans* e enterococos, sendo que as causas mais freqüentes são bacteremias produzidas por procedimentos dentários, manipulação e infecções do trato gênito-urinário [Horstkotte et al,1995]. Já a patogênese da EI de valvas previamente sadias parece estar relacionada com maior incidência em usuários de drogas endovenosas, sendo responsável por grande número de casos que acometem predominantemente a valva tricúspide [Ramos,1995]. Os mecanismos patogênicos destas infecções não estão ainda bem esclarecidos. Há alguns indícios de que o material particulado, que às vezes acompanha a injeção de drogas endovenosas(como talco), pode provocar lesões no endotélio valvular da tricúspide e o conseqüente depósito de fibrina e plaquetas que sempre acompanha o inicio das endocardites. A

freqüente introdução de patógenos na circulação devido a hábitos não assépticos quando da administração da droga endovenosa, podem explicar a colonização dessas lesões [Steckelberg e Wilson,1993].

3.1.2 - ASPECTOS IMUNOLÓGICOS .

A EI é geralmente o resultado da colonização endotelial por uma bactéria. Os microorganismos que escapam da destruição pelo sistema imune do hospedeiro são encarcerados dentro do "nidus" da válvula e devido a agregação plaquetária e de fibrina tornam-se encapsulados o que impede a ação dos fagócitos.

A resposta a invasão microbiana no hospedeiro intacto envolve o sistema celular, que constitui-se de linfócitos, macrófagos, e neutrófilos polimorfonucleares. A resposta imune específica inicialmente requer o processamento do antígeno por macrófagos. Uma resposta antigênica direta de células derivadas da medula (células B) e timo dependentes (células T). As imunoglobulinas (Ac) são secretadas pelas células B e células T mediando a imunidade celular em conjunto com os macrófagos através da produção de linfocinas e regula a função das células B através da atividade Helper e supressor. A aderência da bactéria à células fagocíticas, é o primeiro passo da ingestão e morte bacteriana, e é também ajudado por fatores humorais não específicos, que são os componentes iniciais da cascata do complemento. Investigações em relação ao papel dos fagócitos na EI demonstraram uma variabilidade dependendo do microorganismo, com conclusão geral de que os fagócitos circulantes, particularmente granulócitos, influenciam o curso da doença. Existem evidências de que o sistema fagocítico mononuclear é estimulado, a monocitose periférica tem sido observada [Phair e Clarke]. Sieling e Rijn (1991) demonstraram que os fagócitos circulantes estão envolvidos na proteção contra o *S. defectivus*.

A persistência da bactéria serve como uma fonte que libera continuamente antígenos bacterianos na corrente sangüínea [Keslin et al,1973; O'Connors et al,1978; Rovzar et al,1986]. Em resposta a esta contínua liberação antigênica existe um aumento na produção de anticorpos antibacterianos específicos e uma resposta generalizada não específica que é caracterizada pela presença de diferentes auto-anticorpos e de Complexos Imunes Circulantes (CIC) [Cabane et al ,1979; Kauffman et al ,1981; Enriquez e Reyes,1984; Garnier et al ,1984].

Entre os auto-anticorpos destaca-se o fator reumatóide (FR) que tem sido encontrado com uma freqüência de 18 a 60% em pacientes com EI [Williams and Kunkel,1962; Asherson et al,1990] estando a presença do mesmo relacionada com a resposta terapêutica [Bayer et al 1976; Carson et al,1978; Sheagren et al 1976; Maish et al,1983]. Kerr et al (1986) notaram que a maioria de seus pacientes tinham valores elevados de CIC e FR antes da terapia antimicrobiana e estudando a capacidade destes soros em inibir a solubilização de CIC pré-formados demonstraram uma relação significantemente inversa entre os níveis de FR e a capacidade de solubilizar os CIC. Estes autores sugeriram que o FR interfere na fixação do complemento por bloquear os sítios de ligação na molécula de IgG, interferindo no processo de solubilização de CIC mediado pelo complemento e no seu clareamento através da ligação com o CR1 eritrocitário[Yin et al,1988] .

Resultados positivos para anticorpos anti-nucleares foram também encontrados em 8% a 30% dos pacientes com EI os quais se tornaram negativos após a terapia antibiótica [Heffner,1979]. A presença de anticorpos anti-músculo liso, anti-mitocôndria, anti-

célula gástrica parietal e músculo-esquelético, foi também observada por diferentes autores [Heffner,1979; Weinstein,1987.].

Os CIC e o complemento também tem sido relacionados com a fisiopatologia da EI. A mais convincente evidência a respeito da possível natureza imune dos estigmas periféricos provem de análises histopatológicas do tecido renal de pacientes com glomerulonefrite relacionada a EI [Bayer et al,1977; Bayer e Theofilopoulos,1990]. A investigação imunopatológica destas formas de lesão renal, levam a crer que as mesmas são um contínuo da injúria mediada por IC.

Desde as primeiras descrições das manifestações periféricas extra-cardíacas da EI, numerosos estudos histopatológicos tem sido realizados, demonstrando a possibilidade de que estas manifestações extra-cardíacas como glomerulonefrite, artrite estéril, esplenomegalia e lesões óculo-cutâneas sejam resultantes mais provavelmente de uma vasculite necrotizante do que um envolvimento direto por micro ou macro embolizações [Bayer et al,1976; Bayer e Theofilopoulos,1990].

Ainda na virada do século, a ocorrência de lesões glomerulares focais durante o curso da EI levou à hipótese de que um mecanismo imune poderia estar envolvido nos pacientes com glomerulonefrite [Neugarten e Reyes,1984]. Posteriormente o achado de depósitos de imunoglobulinas e complemento nos glomérulos por estudos de imunofluorescência fortaleceram este conceito [Keslin et al,1973; Levy e Hong,1973, Bayer et al,1977; Schulze et al,1993]. A mais clara definição da anormalidade tissular tem sido o achado de depósitos com padrão granular de IgG e complemento na membrana basal glomerular, indicativos de depósito de CIC encontrada nos pacientes com glomerulonefrite(GN)

associada a EI[Gallo,1970, Keslin et al,1973; Bayer et al ,1976;Bayer et al ,1977; Lida et al,1985]. Estes achados tem sido usados para definir a natureza da lesão renal como imunológica bem como para verificar a participação dos anticorpos e do sistema complemento na injúria tecidual[Cabane et al,1979; Kaufman et al ,1981; Garnier et al,1984] .

Vários estudos em relação a este assunto tem documentado uma freqüente deposição de IgG (menos freqüentemente IgM,IgA) e componentes iniciais do complemento (C1q,C4 e C3) na membrana basal glomerular(MBG) numa distribuição granular típica de lesão por CIC [Gallo, 1970; Levy e Hong,1973; Bayer et al,1976; Lida et al,1985; Bayer e Theofilopoulos,1990]. Estas deposições granulares tem sido observadas principalmente em pacientes com doença de longa duração ou por *Streptococcus* do grupo *viridans*, apoiando o conceito de ativação do complemento mediada por CIC, bem como sua participação no mecanismo patogênico da doença. Em alguns casos porém de EI relacionada ao *S.aureus* não se demonstrou a presença de anticorpos, mas apenas a presença de complemento e antígeno sugerindo que este microorganismo tem a capacidade de ativar diretamente a via alternativa do complemento na ausência de anticorpos [Neugarten e Baldwin,1984; Bayer e Theofilopoulos,1990]. Devido a natureza e distribuição dos depósitos de imunoglobulinas na MBG na GN associada a EI por estreptococos, tem sido sugerido que estas lesões representam uma injúria devido a CIC formados intravascularmente na presença de excesso de anticorpos. Apoiando esta teoria tem sido freqüente a localização subendotelial de complexos imunes neste tipo de lesão renal, uma localização típica de complexos imunes formados em excesso de Ac, devido ao grande tamanho do complexo[Bayer e

Theofilopoulos,1990;]. Kauffman et al (1981) demonstraram também que pacientes com envolvimento renal na EI tinham níveis de CIC significativamente maiores dos que não apresentavam este tipo de complicação. Williams e Kunkel (1962) descreveram pacientes com comprometimento renal associado a presença de fator reumatóide, congulininas e hipocomplementemia, sugerindo uma lesão mediada por mecanismos imunológicos. Gutman et al(1972) encontraram hipocomplementemia e depósitos não lineares de imunoglobulinas nos glomérulos. Anticorpos específicos contra o microorganismo infectante foram identificados no eluato renal(pós-mortem ou biópsia) de pacientes com EI [Levy e Hong, 1973; Lida et al,1985] sugerindo o papel dos complexos Ag-Ac na lesão renal. A injúria renal mediada por CIC pode se manifestar por glomerulonefrite focal, segmentar difusa ou global [Neugarten e Baldwin,1984].

Os achados histopatológicos de biópsias de nódulos de Osler demonstrando a presença de vasculite necrotizante tem levado muitos a considerá-la também como uma complicação de origem imunológica [Heffner,1979]. Também o estudo de biópsias cutâneas em áreas de púrpura demonstraram a presença de vasculite[Garnier et al,1984].

A presença de CIC foi ainda relacionada com manifestações músculo esqueléticas, como artrite e artralgia [Bayer et al,1976; Heffner,1979; Thomas et al,1984].

A Crioglobulinemia do tipo misto ocorre em cerca de 90% dos pacientes com endocardite bacteriana subaguda, sendo que o grau de aumento tende a ser paralelo ao curso da doença, no entanto não apresenta valor prognóstico e não está relacionada com a lesão renal [Heffner,1979]

Controvérsias tem sido levantadas em relação a outras manifestações extra-cardíacas da doença como manchas de Roth e a síndrome de poliartrite já que os organismos bacterianos e fúngicos são raramente documentados dentro destas lesões [Bayer e Theofilopoulos,1990].

3.2 - SISTEMA COMPLEMENTO

3.2.1- HISTÓRICO.

A descoberta do sistema complemento foi atribuída à Jules Bordet em 1895, como um componente de atividade bactericida e termolábil. Este trabalho foi de tanta importância que honrou Bordet com o prêmio Nobel de Medicina em 1920 [Willians et al.,1988; Parcel e Vergani,1993 ; Glovsky,1994]. O termo complemento foi originalmente proposto por Ehrlich em 1899 para descrever a atividade sérica que , combinada com anticorpos específicos, iria causar a lise de bactérias [Roitt,1993; Liszewski e Atkinson,1993]. Trabalhos subsequentes demonstraram que o complemento clássico tinha múltiplos componentes que eram ativados na presença de complexos antígeno anticorpo. Em 1907, Ferrata demonstrou que o complemento poderia ser constituído de dois componentes cuja atividade só podia ser demonstrada na presença de ambas as frações C1 e C2. Posteriormente Sachs e Omorokow demonstraram que o veneno de cobra ativava outro componente (C3) enquanto que Gordon descobriu um componente a mais que era desnaturado pela amônia (C4). A ordem de descoberta destes componentes do complemento , não corresponde entretanto a sua ordem de reação na cascata [Rother e Till,1988].

A via alternativa de ativação foi primeiramente descrita por Pillemer e seus colaboradores no início da década de 50 como um sistema independente de anticorpo [Willians et al,1988]. Pillemer e seus colaboradores verificaram que a incubação de soro

não imunizado com polissacarídeos era capaz de consumir o complemento [Willians et al,1988; Roitt,1993], identificando o sistema properdina de ativação do complemento por certas bactérias e fungos. Embora esta via tenha sido descoberta em 1940, não foi prontamente aceita por outros cientistas até 1970 [Liszewski, Atkinson, 1993; Roitt,1993].

Igualmente, o papel das proteínas do complemento na mediação de reações de aderência de certas bactérias e parasitas a receptores em leucócitos e eritrócitos foi negligenciado por muitos anos, apesar de já ser conhecido por volta de 1930, que tripanossomas tratados com anticorpos e complemento fixavam-se a eritrócitos de primatas. Somente na década de 50 este fenômeno foi investigado apropriadamente, levando isto a descoberta dos receptores celulares para proteínas do complemento[Rother,1988; Roitt,1993].

Nos últimos 30 anos foram descritas aproximadamente 28 proteínas que fazem parte do sistema complemento, as quais incluem enzimas, cofatores, inibidores ou inativadores, receptores celulares e proteínas de membrana [Glovsky,1994] que estão demonstradas no Quadro 1.

3.2.2 - NOMENCLATURA.

As proteínas plasmáticas da via clássica e o complexo terminal de ataque a membrana (TCC-Terminal complemento complex) são definidos como componentes e cada um tem um número precedido do "C", logo C1-C9 são componentes da via clássica e do TCC. O TCC é composto do C5 ativado e dos componentes C6 a C9. Todos

estes componentes são glicoproteínas plasmáticas distintas, com exceção do C1 que é um complexo de 3 glicoproteínas: C1q, C1r e C1s . Duas das proteínas da via alternativa são designadas de fatores: fator B e fator D [Frank,1987;Rother,1988;Law,Reid,1988] e a terceira proteína é a properdina. Tem sido aceitas abreviações para estas proteínas da via alternativa, as quais são chamadas de B, D e P respectivamente. Duas das proteínas controladoras são também designadas como fatores (fator I e fator H), enquanto outras proteínas de controle são usualmente designadas por abreviações ou seus nomes comuns , por exemplo C1inh para o inibitor de C1.

As formas enzimaticamente ativas dos componentes e complexos geralmente tem uma barra acima do símbolo . Os fragmentos gerados por proteólise são indicados por letras minúsculas, por exemplo C4a e C4b para os fragmentos ativados do C4 e C4c e C4d para os fragmentos de degradação do C4b. Os receptores são também denominados por abreviações de seus nomes comuns , por exemplo, receptor do complemento tipo 1 (receptor para C4b e C3b) é denominado de CR1 [Law e Reid,1988; Parcel e Vergani,1993.].

QUADRO 1. PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO

PROTEÍNAS	VIAS DE ATIVAÇÃO	PROT. REGULADORAS	RECEPTORES
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, B, D	C1-INH, C4b-BP, J, I, H, P, S, SP-40/40, CARBOXYPEPTIDASE N,	
PROTEÍNAS DE MEMBRANA		DAF, MCP, HRF/C8bp, CD59	CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, C3eR, C3aR, C5aR, C1qR, HR

C1-INH = INHIBITOR DE C1; C4bBP = PROTEÍNA FIXADORA DE C4b; DAF = FATOR ACELERADOR DE DECAIMENTO; MCP = COFATOR PROTÉICO DE MEMBRANA; HRF/C8bp = FATOR DE RESTRIÇÃO HOMÓLOGA OU PROTEÍNA FIXADORA DE C8; HR = RECEPTOR DE FATOR H; CR = RECEPTOR DE COMPLEMENTO.
PORCEL E VERGANI, 1993.

3.2.3- ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.

Existem duas vias principais de ativação do complemento, a clássica e a alternativa que convergem em uma via comum de ataque à membranas, a partir de C3. Ambas as vias funcionam pela interação em cascata de suas proteínas. FIG 1. [Liszewski, Atkinson, 1993; Parcel e Vergani, 1993]

A ativação da cascata do complemento é importante para a manutenção da homeostase do organismo conferindo proteção contra bactérias, parasitas e vírus, este mecanismo porém, quando descontrolado ou exacerbado pode causar destruição dos vasos sanguíneos (vasculite), da membrana basal glomerular (nefrite), da sinóvia (artrite) e de eritrócitos (hemólise) [Gardinali et al, 1992; Glovsky, 1994].

3.2.3.1. VIA CLÁSSICA

A via clássica é o principal mecanismo de ativação do complemento através de complexos antígeno-anticorpo. Se inicia quando o C1q se liga a imunocomplexos que contêm IgM e IgG [Frank,1987; Parcel e Vergani,1993; Glovsky,1994]. A via clássica pode também ser ativada por interação direta de C1 com certos lipopolissacarídeos bacterianos, retrovírus, proteína C reativa, mielina, heparina e DNA [Parcel e Vergani,1993; Roitt,1993].

O C1 é um complexo pentamolecular dependente de cálcio que se compõe de uma subunidade de C1q, duas de C1r e duas de C1s(C1q,r2,s2). A ligação de C1q com a região Fc CH2 da IgM e IgG, produz uma alteração na conformação do C1q e lhe confere uma atividade enzimática através de C1s [Parcel e Vergani,1993]. O C1s cataliza a conversão do C4 em C4a e C4b e do C2 em C2a e C2b. O fragmento menor C4a é uma fraca anafilatoxina, o fragmento maior C4b em 95% dos casos reage com a água em frações de segundos levando a formação de uma molécula funcionalmente inativa (iC4b), ou é inativado por proteínas reguladoras [Liszewski e Atkinson,1993; Parcel e Vergani,1993]. O C4b que escapa da hidrólise pode ligar-se covalentemente a superfícies celulares funcionando como opsonina ou a C2 formando um complexo enzimático que é capaz de gerar milhares de moléculas de C3a e de C3b a partir de C3 [Liszewski e Atkinson,1993; Parcel e Vergani,1993]. O C2 ligado ao C4b também é clivado pelo C1s em 2 fragmentos, o menor C2a que se difunde na fase fluida, enquanto que o maior C2b forma o complexo C4b2b que é a C3 convertase da via clássica [Williams,1988; Liszewski e Atkinson,1993.].

3.2.3.2- REGULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA

Diversas proteínas reguladoras controlam a cascata em diferentes níveis, entre elas participam o C1inh, C4b-BP, DAF, MCP, CR1 e o Fator I [Parcel e Vergani,1993]. O inibidor de C1 (C1inh)liga-se ao sítio catalítico do C1r e C1s, (formando o complexo C1rs-C1inh) bloqueando sua atividade enzimática sobre C4 e C2 [Willians,1988].

O C1inh interage reversivelmente com o complexo C1 nativo prevenindo a sua espontânea ativação. Após a ativação de C1, por exemplo através da ligação à complexos imunes, o C1inh forma complexos com C1r e C1s ativados, resultando na liberação do complexo C1inh-C1r, C1s-C1inh para a fase fluida.Fig.1

O complexo C4b2b é controlado pela proteína ligadora de C4 (C4b-BP) que acelera a dissociação deste complexo e também aumenta a sua vulnerabilidade ao ataque do fator I o qual pode então clivar o C4b em 2 fragmentos C4c e C4d [Glovsky,1994; Willians,1988]. O fator I também cliva o C3b de maneira similar.

O fator de aceleração de decaimento (DAF) facilita a dissociação do complexo C4b2b [Roitt,1993].

3.2.3.3- VIA ALTERNATIVA

A via alternativa é filogeneticamente mais antiga do que a via clássica e pode ser ativada independentemente de anticorpo [Liszewski e Atkinson,1993; Parcel e Vergani ,1993; Law e Reid, 1988].

Quatro proteínas plasmáticas estão diretamente envolvidas na ativação da via alternativa : C3, fator B , D e Properdina . Este grupo de proteínas proporciona ao hospedeiro a capacidade de reconhecer imediatamente e responder a agentes infectantes (polissacarídeos insolúveis, lipopolissacarídeos de parede celular bacteriana e a agregados de imunoglobulinas A e E), na ausência de anticorpos específicos.

Esta resposta é iniciada pela deposição da forma ativa do C3(C3b) no alvo estranho [Liszewski e Atkinson,1993]. A ativação da via inicia-se com uma hidrólise espontânea de C3 no plasma. O C3 é um componente tanto da via clássica quanto da alternativa que consiste de duas cadeias polipeptídicas interligadas sendo o componente do complemento mais abundante no plasma. A ativação de C3 seja por hidrólise espontânea (no caso da via alternativa) ou por clivagem através de uma enzima C3 convertase é o passo pivô no processo de ativação do complemento [Liszewski, Atkinson, 1993; Law e Reid,1988]. É estimado que a deposição de uma molécula de C3b pode se tornar em 4 milhões de moléculas de C3b em 4 min [Liszewski ,Atkinson , 1993; Willians,1988]. O C3 possui uma ligação tioéster interna que consiste de um resíduo de glutamina que é instável e eletrofílica (aceptor de elétrons) e suscetível ao ataque de grupos nucleofílicos (doadores de elétrons) próximos. Esta propriedade permite que os resíduos da glutamina se liguem covalentemente a outras moléculas (via hidroxil ou grupo amina) de proteínas adjacentes ou carboidratos formando ligação éster ou amida. Por este mecanismo o C3 hidrolisado ataca o alvo. O C3 nativo no plasma sofre continuamente uma hidrólise espontânea, e de baixa velocidade da ligação tioester interna que leva a formação de C3(H₂O) que

são moléculas com propriedades similares ao C3b [Parcel,Vergani,1993; Law e Reid 1988.] e que agem como um sítio ligador para o fator B. Esta é a base do mecanismo "tickover" de ativação do C3. E quando o tioester é exposto por este processo isto confere ao C3 circulante (poucos milisegundos) uma transitória capacidade de ligar-se covalentemente a qualquer molécula hidroxila ou grupo amino (basicamente qualquer superfície biológica).

O Fator B(FB), liga-se ao C3(H₂O) e é clivado pelo fator em Ba e Bb. O complexo C3b(H₂O)Bb na fase fluida é uma enzima C3 convertase que cliva C3 em C3a e C3b [Law e Reid,1988; Parcel e Vergani, 1993; Roitt,1993]. Os fragmentos C3b gerados ligam-se covalentemente à superfícies adjacentes e são suscetíveis a nova ligação com o FB, formando assim uma alça de amplificação da reação. A ativação de C3 é importante na geração de mais convertase, opsonização de partículas e formação do complexo enzimático que cliva o C5, o componente de entrada para a via terminal do complemento [Liszewski e Atkinson,1993].

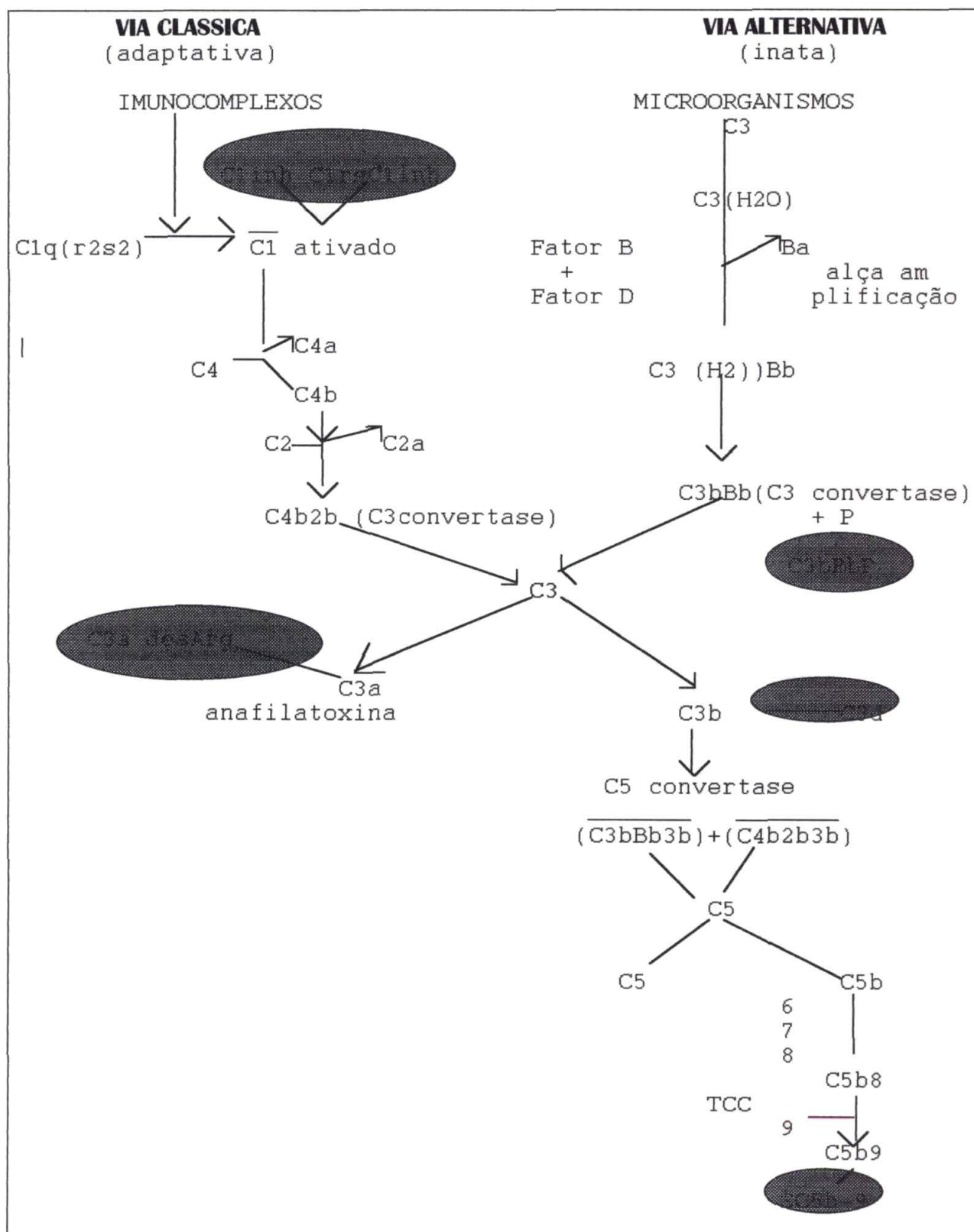
3.2.3.4- REGULAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA.

Embora a hidrólise espontânea de C3 aconteça em baixos níveis e a reatividade do grupo tioester seja um processo auto limitado, esta reação pode ser extremamente danosa se ocorrer em células do próprio hospedeiro [Law e Reid,1988; Liszewski e Atkinson,1993]. Isto pode ser prevenido de duas formas, primeiro o C3b ativado pode ligar-se a pequenas moléculas como a água que é abundante no plasma o que limita a extensão da sua ação,

segundo se moléculas de C3 ativadas depositam-se nas células do hospedeiro existem , proteínas reguladoras de membrana que podem inativá-las .

Na via alternativa a dissociação da C3 convertase é regulada pelo fator H [Parcel e Vergani,1993] que compete com o Bb, formando o C3bH que leva a posterior degradação em fragmentos menores pelo fator I. Nas membranas celulares, ambos DAF e CR1 aceleram a dissociação de C3bBb. O CR1 e MCP atuam como cofatores para a clivagem de C3b pelo fator I [Willians,1988; Glovski,1994; Roitt,1993].

FIGURA 1. Esquema de ativação das vias Clássica e Alternativa do complemento



3.2.4- COMPLEXO DE ATAQUE DE MEMBRANA

A fase final da cascata de ativação do complemento é a formação de um complexo de ataque de membrana composto por C5, C6, C7, C8 e C9. [Roitt,1993; Liszewski e Atkinson,1993].

A união do C3b a C4b2b e na via alternativa ao C3bBb forma as C5 convertases, C4b2b3b e C3bBb3b da via clássica e alternativa respectivamente. Estas enzimas clivam o C5 em um pequeno fragmento C5a com atividade de anafilatoxina e outro maior, C5b que inicia a via de ataque a membranas. O C5b se liga seqüencialmente ao C6 e C7 formando complexos C5b67 que se aderem diretamente a membrana celular da célula alvo. A incorporação do C8 produz uma ruptura na membrana celular podendo causar a lise de células metabolicamente inertes. Finalmente moléculas polimerizadas (1 a 18) de C9 se unem ao complexo C5b678 constituindo o complexo de ataque de membrana (TCC), uma estrutura cilíndrica que forma poros na membrana lipídica e que permite a passagem de íons com conseqüente lise osmótica celular. A lise pelo TCC é um mecanismo de eliminação importante de certas bactérias, parasitas e vírus [Parcel e Vergani,1993; Roitt,1993].

3.2.4.1- Regulação do complexo de ataque de membrana

A proteína plasmática S inibe a função do C5-9 provavelmente por ligar-se ao C5b67 formando o complexo SC5b67 solúvel que é incapaz de inserir-se nas camadas bi-lípídicas celulares [Willians,1988; Parcel e Vergani,1993]. As células do

hospedeiro possuem proteínas que as protegem da ação lítica do TCC, fato que explica porque eritrócitos são pobremente lisados por complemento homólogo. Duas proteínas de membrana que previnem a ação lítica do TCC sobre as células homólogas tem sido caracterizadas, o CD59 e o HRF ou fator de restrição homóloga [Lachmann,1993]. O CD59 inibe a inserção e a polimerização do C9 nas membranas contendo C5b-8 depositados. O HRF provavelmente tem uma atividade similar ao CD59 inibindo a ligação de C8 e C9 nas membranas celulares, o seu modo de atuação entretanto não está ainda esclarecido. [Lachmann,1993].

3.2.5- RECEPTORES DE COMPLEMENTO

Muitos dos fragmentos produzidos durante a ativação do complemento se ligam à receptores específicos na superfície de células imunologicamente competentes. Este é um mecanismo importante de mediação dos efeitos fisiológicos do complemento, incluindo à captação de partículas opsonizadas pelo complemento e ativação das células portadoras dos receptores. Os receptores e suas funções estão demonstrados nos quadros 2 e 3.

QUADRO 2. PROTEINAS PLASMÁTICAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO

PROTEINAS	PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
PLASMÁTICAS	
C1-INH	Impede a ativação de C1. Dissocia o C1q do C1r2c1s2 formando o complexo C1rc1sC1INH em fase fluida. Impede a ligação de C1q com C1r2C1s2
Fator C4b-Bp	Se liga a C4b impedindo sua interação com C2. Acelera a inativação das convertases da via clássica. Cofator de I no catabolismo de C4b.
Fator I (C3b-INa)	Fragmento C3b e C4b
Fator H	Acelera a inativação das convertases da via alternativa. Cofator de I no catabolismo de C3b.
Properdina	Estabiliza as convertases da via alternativa.
Proteína S	Impede a união de C5b67 à membrana, sua incorporação ao C8 e C9 forma o complexo inativo SC5b-9.
SP40,40	Ação similar à proteína S
Carboxipeptidase N	Elimina a arginina carboxi-terminal das anafilatoxinas e as inativa

Bishof et al,1990.

QUADRO 3. PROTEÍNAS DE MEMBRANA REGULADORAS DO COMPLEMENTO

PROTEÍNAS DE MEMBRANA	PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
CR1	Acelera a inativação das convertases de ambas as vias Cofator de I na degradação de C3b e C4b. Transporte eritrocitário de imuno-complexos.
CR2	Ativação de linfócitos, Imunorregulação do complemento.
CR3	Aumento da fagocitose, ativação celular
Receptor para C5a	Secreção de mediadores inflamatórios, ativação celular, quimiotaxia.
Receptor para C3a	Secreção de mediadores inflamatórios ativação celular
DAF (CD55)	Acelera a dissociação das convertases de ambas as vias.
MCP (CD46, gp45/70)	Cofator de I na degradação de C3b e C4b
HRF/C8bp	Impede a inserção de C8 no complexo C5b67
CD59 (MIRL, MACIF, HRF20, protectina)	Impede a polimerização de C9 e inserção de C9 na membrana celular

Bishof et al, 1990.

3.2.6- ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO.

O sistema complemento é uma das principais vias efetoras do processo inflamatório. Suas atividades fisiológicas "in vivo" são melhor ilustradas pelos efeitos deletérios das

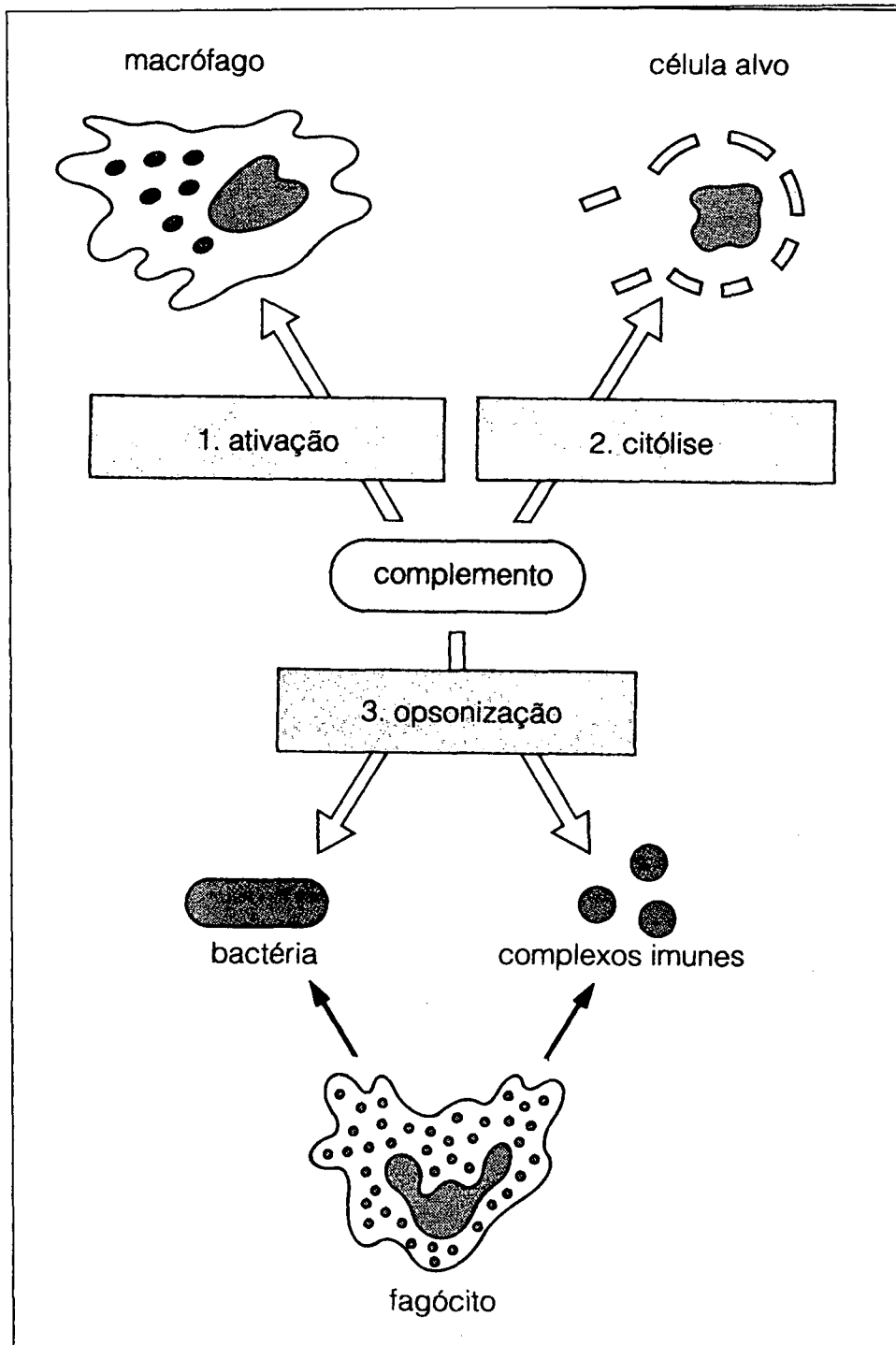
deficiências hereditárias ou adquiridas de suas proteínas individuais. Indivíduos com tais deficiências tem uma maior suscetibilidade a infecções recorrentes por bactérias piogênicas [Bishof et al,1990] e doenças caracterizadas pela produção de auto anticorpos e complexos imunes, o que sugere um papel do complemento na defesa contra bactérias e no manejo dos complexos imunes. Estes achados foram confirmados também por estudos "in vitro" [Fearon,1988; Parcel e Vergani,1993]. Como principais conseqüências fisiológicas da ativação do complemento temos a opsonização de microrganismos, a ativação de fagócitos, a solubilização de complexos imunes e a lise celular [Parcel e Vergani,1993].

Os fragmentos C3a,C4a e C5a são anafilatoxinas que se ligam a receptores específicos celulares e desencadeiam a liberação de mediadores vasoativos(ex. histamina), que promovem aumento da permeabilidade vascular e a contração da musculatura lisa [Law,Reid,1988; Liszewski e Atkinson,1993]. O C5a é a anafilatoxina mais potente além disso é um fator potente quimiotático leucocitário [Parcel e Vergani,1993.].

O complemento possui um papel importante na indução das respostas humorais. Facilita a localização do antígeno e dos complexos Ag-Ac para as células apresentadoras de antígenos e linfócitos B, nos centros germinativos dos linfonodos induzindo eficientemente a resposta imune [Gardinali et al,1992].

Muitos dos efeitos biológicos do complemento são mediados por sua interação com receptores celulares específicos os quais estão demonstrados no quadro 4.

FIGURA 2.Principais funções biológicas do Complemento



As três principais atividades biológicas do sistema complemento
1- A ativação dos fagócitos incluindo macrófagos e neutrófilos
2- Citólise das células alvo
3- Opsonização de microorganismos e complexos imunes para as células expressando receptores para complemento.
Retirado de Roitt,1992.

QUADRO 4. Atividades biológicas geradas pela ativação do complemento .

ATIVIDADE	MEDIADORES E FUNÇÕES
Anafilatoxina	C3a e C5a estimulam a quimiotaxia e degradação de basófilos e mastócitos levando à contração e aumento da permeabilidade vascular. Migração de neutrófilos e monócitos.
Opsonização	C3, C4 auxiliam na fagocitose
Quimiotaxia	C5a, atração dos fagócitos ao sítio inflamatório.
Inflamação	C3, C4 estimulam a exocitose de grânulos contendo enzimas proteolíticas potentes.
Indução da resposta imune	C3, facilita a localização do antígeno para as células apresentadoras de antígenos e linfócito B contribuindo para memória imunológica.
Solubilização de complexos imunes	C3b, C4b. Inibe a formação e deposição de IC, participa na solubilização de IC formados.
Liberação de IC ligados à célula	C3b, favorece o desprendimento do IC do receptor CR1 eritrocitário no fígado.
Neutralização viral	C4, Deposita-se junto com os ac na superfície viral mascarando estruturas necessárias para o ataque celular

Theofilopoulos e Dixon ,1980; Rother,1988; Roitt,1993; Parcel e Vergani,1993

3.3 - COMPLEXOS IMUNES

Após o estímulo antigênico, os anticorpos produzidos se combinam com os determinantes antigênicos, formando então complexos imunes. Este processo é fisiológico e constitui um processo essencial da resposta imune normal do homem, usualmente para o benefício do hospedeiro, desde que os resultados sejam a neutralização ou eliminação dos antígenos. Entretanto os complexos imunes em determinadas condições, podem depositar-se nas estruturas vasculares incitando uma resposta inflamatória e levando à lesão tecidual.

Esta localização pode ser o resultado da formação do complexo no local ou pela deposição de CIC. Esta última circunstância, onde os complexos da circulação produzem lesões em múltiplos sítios, é referida genericamente como doença por complexos imunes [Theofilopoulos e Dixon,1980; Endo et al,1985; McDougal e McDuffie,1985; Taylor, 1989].

3.3.1- FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS IMUNES:

O entendimento da imunoquímica dos complexos imunes solúveis é importante por duas razões: primeiro , a composição molecular e o tamanho dos complexos imunes influenciam nos métodos para sua detecção; e segundo, o destino dos complexos imunes e seu significado patogênico são afetados pelo seu tamanho e composição [Reed et al,1977; Barnett et al,1979; Endo et al,1985].

Os complexos grandes são insolúveis e são rapidamente clareados pelo sistema reticulo-endotelial, enquanto que os pequenos complexos circulam sem provocar respostas inflamatórias. Os complexos de tamanho intermediário é que mais comumente causam injúria tecidual. Como são de tamanho intermediário e solúveis, estes complexos imunes podem circular e se disseminar e são grandes o suficiente para fixar complemento .[Bayer e Theofilopoulos ,1979; Endo et al ,1985].

O tamanho do complexo imune é determinado por uma série de fatores, como : valência do antígeno e do anticorpo, afinidade do anticorpo pelo antígeno e concentração relativa do antígeno e do anticorpo. Anticorpos oligovalentes tendem a formar pequenos complexos solúveis enquanto que os anticorpos polivalentes de classe IgM tendem a formar complexos grandes [Endo et al ,1985]. Os complexos imunes podem se formar localmente ou sistemicamente na circulação. Quando formados em excesso de antígenos são pequenos, e não fixam complemento e geralmente não iniciam processos inflamatórios. Por outro lado, os complexos imunes formados em excesso de anticorpos, embora capazes de ativar complemento, são grandes e insolúveis sendo rapidamente fagocitados, tendo então uma patogenicidade limitada.

A magnitude e duração de exposição ao antígeno são importantes na determinação e desenvolvimento da doença por complexos imunes. Se os antígenos permanecem por longo tempo na circulação ou se existe um contínuo suprimento de material antigênico, como nas infecções crônicas ou auto imunes, existe a formação contínua de complexos imunes [Theofilopoulos e Dixon,1980].

QUADRO 5. Fatores que influenciam os níveis dos Complexos Imunes Circulantes (CIC)

ANTICORPOS

Classe
Quantidade
Afinidade
Valência
Capacidade de ativar o complemento
Reatividade com receptores celulares

ANTÍGENOS

Tamanho
Quantidade
Valência
Propriedades físico-químicas(carga, solubilidade)
Distribuição espacial dos determinantes antigênicos

DISPONIBILIDADE

Concentração relativa dos reagentes(relação antígeno-anticorpo)
Concentração absoluta dos reagentes
Síntese de anticorpos
Entrada de antígenos solúveis na circulação
Remoção de CIC por fagócitos mononucleares do sistema retículo-endotelial , ou por deposição nos tecidos
Catabolismo não imune do antígeno e anticorpo

INTERAÇÕES INESPECÍFICAS ENTRE ANTÍGENO E ANTICORPO

Ligação hidrofóbica
Carga
Tamanho do complexo
Propriedades de solubilização
Capacidade de fixar complemento

VELOCIDADE DE FORMAÇÃO

Disponibilidade de antígenos
Velocidade de síntese de Ac.

VELOCIDADE DE CLAREAMENTO

Grau de formação da estrutura de ligação
Natureza do antígeno
Habilidade do complexo reagir com o complemento
Habilidade do complexo reagir com receptores celulares
Estado do sistema fagocítico

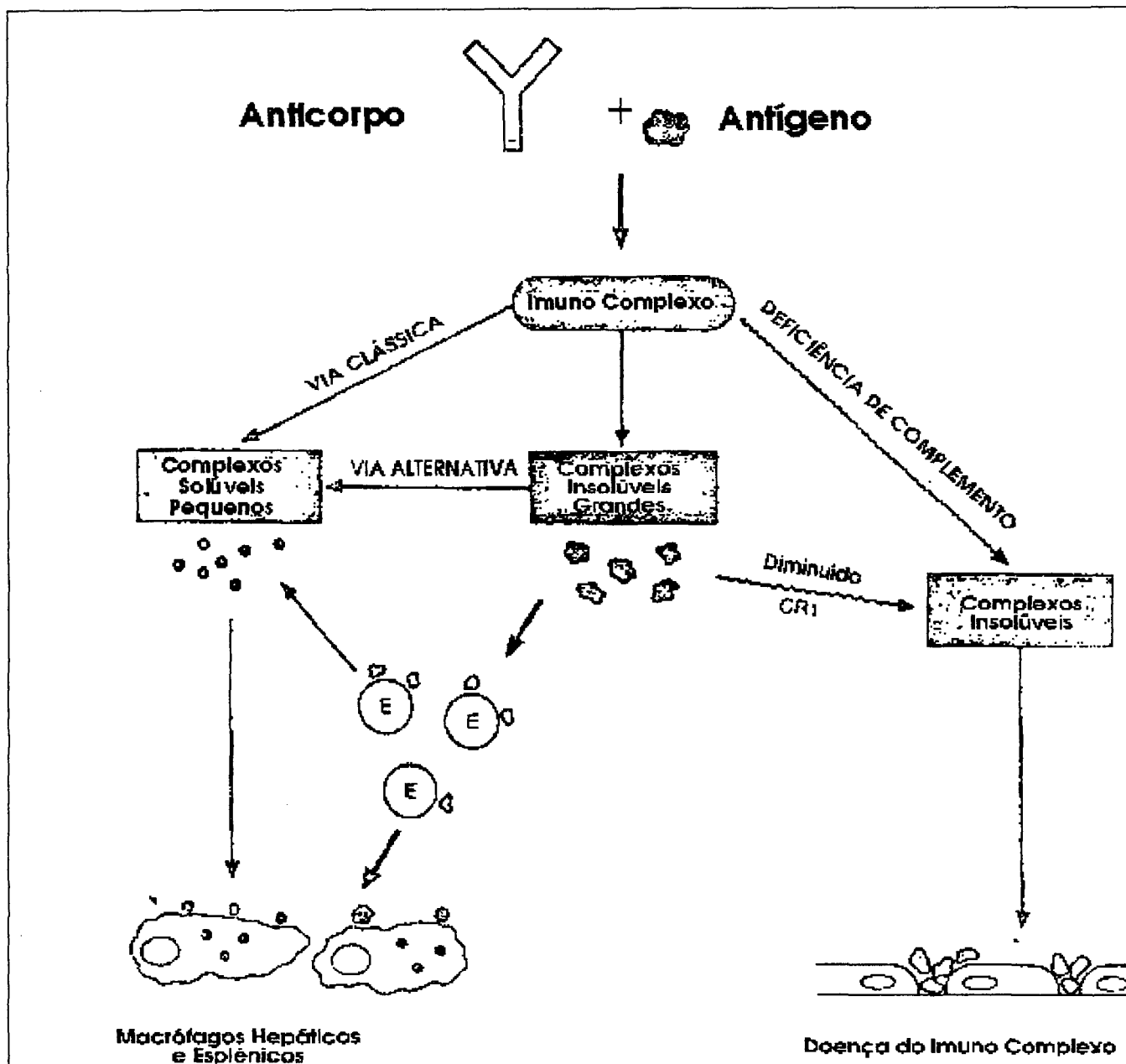
3.3.2- SOLUBILIZAÇÃO E ELIMINAÇÃO DOS CIC .

A formação dos complexos imunes é seguida por mecanismos de clareamento que previnem sua deposição tecidual. Este processo dinâmico é muito eficiente, pois sob circunstâncias normais, o organismo está sendo constantemente exposto a uma variedade de agentes estranhos [Schifferli e Taylor,1989]. Estudos de deficiências do complemento têm verificado que a deficiência dos componentes da via clássica está associada à uma maior incidência de doenças que cursam com depósito de complexos imunes [Morgan e Walport,1991]. Existem evidências que a via clássica tem um papel fundamental na prevenção da formação e precipitação de complexos imunes grandes e de que a via alternativa é importante na solubilização de complexos imunes pré-formados [Law e Reid,1988; Roitt,1993].

A interação dos CIC com o complemento pode alterar as suas propriedades biofísicas mediando a inibição de sua precipitação. Após a formação dos complexos imunes, inicia-se a ativação do C através da ligação de C1q ao complexo imune com subsequente clivagem de C3 em C3a e C3b. Neste processo um grande número de moléculas de C3b é gerado que vai ligar-se ao alvo ou aos CIC. Uma porção da molécula de C3b liga-se à região N-terminal da cadeia pesada do anticorpo no complexo imune, esta região em parte contribui para a ligação do anticorpo ao antígeno. Este fato pode ser de grande importância na ruptura da rede de complexos ag-ac e provavelmente também interfere na interação Fc-

Fc que tem um papel na precipitação dos complexos imunes [Fearon,1988].

FIGURA 3. Participação do complemento na solubilização dos CIC.



Participação do complemento no manejo dos CIC. Pequenos complexos são clareados pelos macrófagos, os grandes complexos se ligarão aos eritrócitos, via CR1, mas se o CR1 estiver diminuído ou se houver uma deficiência do complemento são formados IC insolúveis. Retirado de Law e Reid,1988.

A ligação covalente dos fragmentos C3b e C4b aos CIC permite que estes se liguem a várias células que contem receptores para C3b e C4b(CR1), em particular os eritrócitos.

Recentes evidências tem demonstrado que o complemento e seus receptores nos eritrócitos, oferecem um sistema eficiente para o processamento e transporte de CIC [Yin et al,1988; Schiferli e Taylor,1989]. Aproximadamente 90% do CR1 no sangue humano e de outros primatas é eritrocitária. As alterações na interação com o complemento e eritrócitos podem afetar significativamente este mecanismo de clareamento [Yin et al,1988; Schiferli e Taylor,1989; Fearon,1988]. A importância do CR1 eritrocitário na eliminação dos CIC, tem sido demonstrada em trabalhos experimentais [Liszewski e Atkinson,1993].

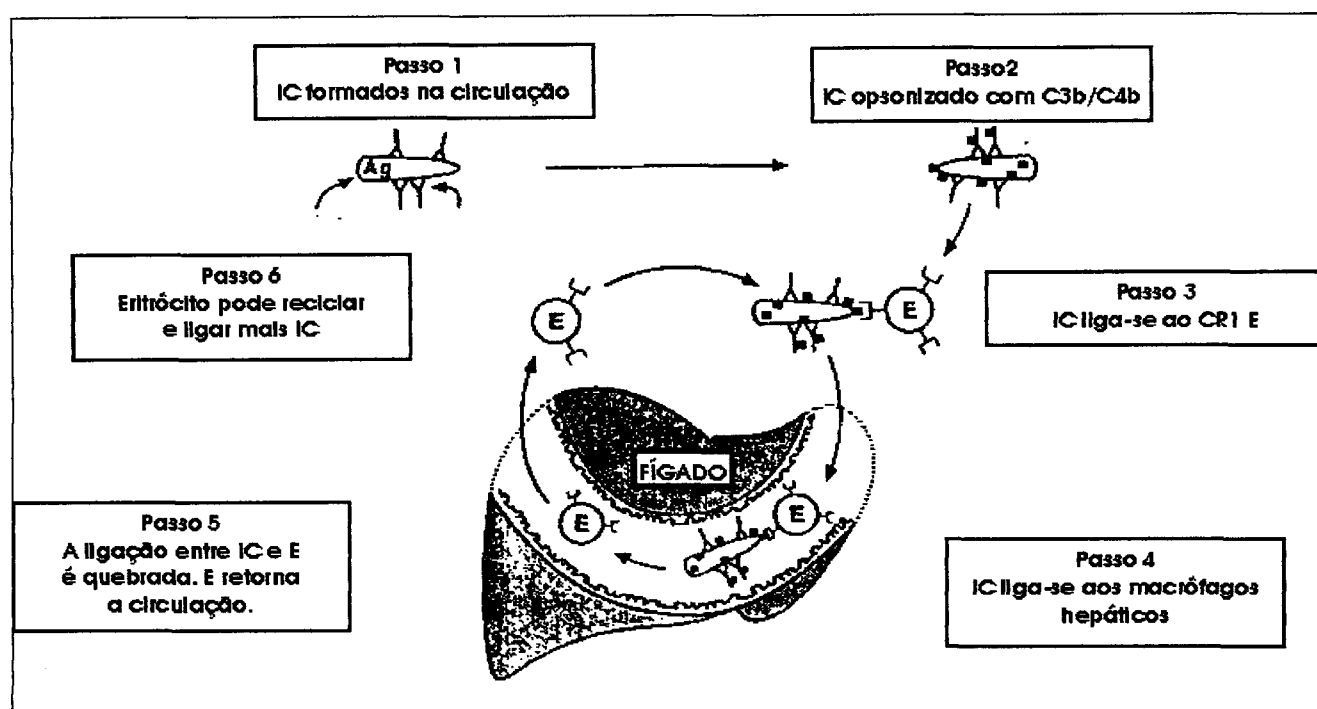
Em condições normais os CIC com complemento ativado se ligam aos eritrócitos através de CR1 e são conduzidos através da circulação até o fígado e em menor intensidade ao baço onde são eliminados pelos monócitos e macrófagos tissulares.

3.3.3- LESÃO TECIDUAL MEDIADA POR DEPÓSITO DE COMPLEXOS IMNES.

As propriedades biológicas dos complexos imunes são determinadas por sua habilidade em ativar o sistema complemento e interagir com um número considerável de células efetoras [Hoiby et al, 1986]. A maioria da injúria tecidual associada aos complexos imunes parece ser mediada pelo complemento e leucócitos polimorfonucleares. Estes agregados de complexos imunes podem

ativar o complemento pela via clássica e alternativa, acionando seus processos líticos e inflamatórios.

FIGURA 4. Representação esquemática do mecanismo de processamento dos complexos imunes.



Retirado de: Liszewski e Atkinson, 1993.

O depósito de complemento pode ocorrer simultaneamente ou após a deposição dos CIC na membrana basal ou área subintimal das paredes vasculares. Os eventos que se seguem a ativação do complemento servem de base para muitas das respostas

inflamatórias desencadeadas pelos complexos imunes depositados. Fatores quimiotáticos liberados como C5a atraem leucócitos polimorfonucleares, que se acumulam no sítio da injúria. Estas células se ligam ao complexo através de receptores para complemento e anticorpo o que leva à sua degranulação e a liberação de proteínas vasoativas capazes de aumentar a permeabilidade vascular e de várias enzimas capazes de destruir a membrana basal [Reed et al,1977; Endo et al,1985].

A liberação de aminas vasoativas pode ocorrer também através da interação das plaquetas com os complexos imunes ou com o fator ativador de plaquetas (PAF, um produto liberado pelos basófilos após interação destas células com os complexos antígeno-anticorpo). Também como consequência da ativação do C, há formação do TCC que pode causar inespecificamente a lesão de membranas celulares do hospedeiro. O leito vascular também é uma variável importante na deposição de complexos imunes, que parece depender grandemente de fatores hemodinâmicos e da anatomia de sítios particulares. O glomérulo, plexo coróide, sinóvia, pele e úvea, tem alto grau de fluxo sanguíneo por unidade de massa tecidual e são estruturas particularmente sujeitas à desordens por complexos imunes por estarem expostas e poderem captar grandes quantidades de complexos imunes no seu leito vascular [Theofilopoulos e Dixon,1980; Endo et al ,1985; Rother,1988].

3.4 - COMPLEXOS IMUNES e COMPLEMENTO NA ENDOCARDITE INFECCIOSA

A EI é em princípio uma enfermidade infecciosa resultante do implante bacteriano sobre uma lesão endocárdica. Posteriormente a isto, desenvolve-se uma resposta imune do organismo com predomínio humoral, gerando complexos imunes circulantes com capacidade pró-inflamatória. Esta fase imunológica da EI se compara a uma enfermidade por complexos imunes que se caracteriza por vasculite e glomerulonefrite [Enriquez e Reyes,1984]. Muitos autores tem encontrado a presença de complexos imunes, em grande percentagem nos pacientes com EI variando sua freqüência de acordo com o método utilizado [De Carvalho,1983]. Bayer et al realizaram diferentes estudos sobre CIC na EI: Em 1976, estudaram, seriadamente, 29 pacientes com EI e compararam os resultados com indivíduos normais, sépticos sem endocardite e dependentes em drogas endovenosas. Os níveis iniciais de CIC, dosados pelo técnica Raji-cell, foram significativamente maiores entre os pacientes com EI (97%) quando comparados com os sépticos (31%), normais (10%) e dependentes em drogas endovenosas (40%). Neste mesmo estudo dosagens de CIC foram relacionadas às manifestações extra-cardíacas, duração dos sintomas e resposta terapêutica, demonstrando-se níveis de CIC significativamente maiores nos pacientes com sinais extra-cardíacos (64%) quando comparados com pacientes sem estes sinais (7%). Em todos estes pacientes o declínio dos valores de CIC foi acompanhado do desaparecimento dos sinais extra-cardíacos. Em relação a duração dos sintomas, os níveis de CIC

foram significativamente maiores nos pacientes com longa duração da doença. Em 1977 Bayer et al, estudaram dois pacientes com EI e síndrome like purpura trombocitopênica trombótica que apresentaram níveis elevados de CIC (Técnica Raji-cell) e que retornaram aos valores normais após a terapêutica. Em 1979, Bayer et al, realizaram um estudo experimental com 42 coelhos nos quais foi induzida EI por *Streptococcus salivarius*. Neste estudo foi verificado um aumento significante dos níveis de CIC (Raji-cell) no início do tratamento. Em coelhos tratados com sucesso, os níveis de CIC caíram significativamente na primeira semana de tratamento, em contraste, nos animais com EI refratária não houve queda dos valores de CIC. No mesmo ano Bayer et al (1979) avaliaram 50 pacientes com EI e 52 com sepsis sem endocardite analisando a utilidade das dosagens de CIC como método para diagnóstico diferencial entre estas duas entidades, verificando níveis significativamente maiores de CIC nos pacientes com EI. Em 1981, Kauffman et al com o mesmo objetivo estudaram 40 pacientes com EI, 34 com defeitos endocárdicos e febre não séptica, 25 com septicemia sem endocardite e 14 com lesões valvulares não complicadas utilizando a técnica de ^{125}I -C1q. Na admissão 63% dos pacientes com EI tiveram valores de CIC positivos em comparação com 9%, 12% e 7% dos outros grupos respectivamente ($p < 0,001$). Entre os pacientes com EI observou-se valores maiores de C1C nos pacientes com EI subaguda quando comparados a EI aguda. Em 1980 Kee et al estudaram 22 pacientes com o objetivo de identificar os componentes dos CIC na EI, verificando a presença de IgA, IgG e C1q nos CIC destes pacientes. Deck et al em 1988 estudaram 10 pacientes com EI e determinaram a presença de CIC através da técnica de congulinina e C1q em fase sólida, e demonstraram

níveis mais altos de CIC nos pacientes com maior tempo de evolução da doença.

Devido a presença significativa de CIC nos pacientes com EI tem sido sugerido que a sua dosagem poderia ser útil no diagnóstico, diagnóstico diferencial e controle terapêutico da doença.

Numerosos trabalhos tem demonstrado que uma das funções principais do sistema complemento é a proteção contra a doença por imunocomplexos, que se dá pelo clareamento dos complexos da corrente sangüínea [Fearon,1988]. Estes sugerem que deficiências de certos componentes da via clássica ou de receptores de complemento permitem que os CIC se depositem em locais inapropriados como os rins pela inabilidade nos mecanismos de solubilização, transporte e eliminação dos CIC. O papel do complemento nas lesões teciduais mediadas por CIC é também de considerável importância na EI e foi discutido no item anterior. Na EI existem poucos trabalhos relacionados ao complemento, a maioria deles refere-se à dosagem protéica dos seus componentes. Em 1962 Willians e Kunkel estudaram 51 pacientes com EI avaliando os níveis de CH50, demonstrando na maioria dos pacientes valores normais a elevados. Dentre 8 pacientes que apresentaram diminuição nos valores de CH50, 3 tinham envolvimento renal. Em 1980 Kee et al avaliaram os níveis de C3 e CH50, em 22 pacientes, encontrando valores anormais em apenas 8 amostras, 6 com valores abaixo do normal e 2 acima.

Em 1976 Bayer et al, dosaram CH50 em 18 pacientes com EI durante a fase aguda e de convalescência, demonstrando níveis significativamente menores após o sucesso terapêutico.

O'Connors et al em 1978, estudaram 24 pacientes com EI, analisando a relação entre o germe causador e o grau de insuficiência renal com o complemento. Estes autores verificaram que 10 entre os 14 pacientes com EI por *Staphylococcus aureus* apresentavam hipocomplementemia, com valores normais de C4 e baixos de C3 sugerindo ativação pela via alternativa. Neste estudo o grau de insuficiência renal correlacionou-se com a hipocomplementemia. Outro estudo realizado por Kauffmann et al 1981 demonstrou que 16 de 40 pacientes com EI tinham valores diminuídos de C3 e CH50.

Todos estes trabalhos avaliaram os níveis dos componentes do complemento e a função da cascata através do CH50. Entretanto, a concentração protéica dos componentes do complemento não constitui-se em parâmetro fidedigno para avaliar o consumo e a ativação do sistema, uma vez que um aumento no catabolismo destas proteínas pode incitar a sua síntese, levando a níveis séricos normais [Charlesworth et al, 1989]. Portanto, produtos decorrentes da ativação do complemento, como fragmentos e complexos enzimáticos refletem com maior fidelidade o estado de consumo do mesmo. São escassos os trabalhos que avaliam produtos de ativação do complemento na EI. Em 1982 Pocidalo et al dosaram o fragmento C3d em 21 pacientes com EI e 9 com sepsis encontrando valores positivos em 27 pacientes, em 1984 Enriquez e Reyes determinaram C3d em 7 pacientes com EI e 19 com Febre Reumática aguda. Os últimos autores verificaram a presença de C3d somente nos pacientes com EI (57%), sugerindo que esta avaliação poderia ser útil no diagnóstico diferencial entre estas duas patologias.

Estudos imunopatológicos em biópsias renais de pacientes com EI através de imunofluorescência tem demonstrado a presença

de depósitos de imunoglobulinas (IgG,IgA e IgM) e complemento, demonstrando que a lesão renal está associada com a deposição de complexos imunes e ativação do complemento [Levy e Hong,1973; Keslin,1973; Boulton e Jones,1974; Thorig et al,1988]. Outros trabalhos sugerem que pode haver outro tipo de mecanismo fisiopatológico de lesão renal principalmente nos casos de EI por *Staphylococcus aureus*, onde a ausência de imunoglobulinas sugere que a lesão renal possa ser desencadeada por ativação direta da via alternativa do complemento pelo antígeno bacteriano [Pertschuck et al,1976; Thorig et al,1988].

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - PACIENTES

O presente estudo incluiu 20 pacientes que foram internados no Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná, entre novembro de 1992 a maio 1995 .

4.1.1 - SELEÇÃO DOS PACIENTES

Amostras sanguíneas foram coletadas em um total de 20 pacientes com diagnóstico de EI, sendo 14 do sexo masculino e 6 do feminino , com idade variando entre 15 à 76 anos (média 37,9 anos). Foram incluídos no trabalho, somente os pacientes que tiveram o diagnóstico de EI preenchendo os critérios da Duke University [Durack et al,1994] apresentados no anexo 1.

Foram excluídos os pacientes que tiveram hemólise das amostras sanguíneas, aqueles que durante o internamento tiveram o diagnóstico mais provável de Febre Reumática aguda e não EI e os que apesar de terem sido tratados como endocardite não preencheram os critérios diagnóstico de EI

4.1.1.1 - GRUPO CONTROLE

Os controles foram constituídos de 2 grupos distintos: o primeiro por 14 indivíduos adultos saudáveis sem história de

dependência em drogas endovenosas ou história prévia de patologia envolvendo o sistema imune. Sendo 7 do sexo feminino e 7 do sexo masculino com idade entre 20 e 53 anos com uma média de 33 anos.

O segundo grupo foi constituído de 15 pacientes portadores de lesão valvar, 11 com comprometimento de valva mitral e 4 de valva aórtica, clinicamente estáveis, sem história de dependência em drogas endovenosas, sem sinais de infecção, sem sinais sugestivos de cardite reumática aguda e sem história de outras patologias associadas. Sendo 6 do sexo feminino e 9 do sexo masculino com idade entre 25 anos e 79 anos com uma média de 42 anos.

4.1.2 - AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Foram coletados 20 ml de sangue venoso de cada indivíduo, que foram divididos em 2 tubos de ensaio, para obtenção de plasma EDTA e soro. Dez ml foram adicionados a um tubo contendo 1 ml de EDTA a 0,2M pH 7,2, para obtenção de plasma, sendo mantido sempre em um recipiente com gelo. Os 10 ml restantes foram colocados no segundo tubo para soro. Após a coleta, o sangue com EDTA permaneceu no gelo até a chegada ao laboratório. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min à 4 °C. O soro e o plasma obtidos foram separados em diferentes alíquotas que foram armazenados à temperatura de -70 °C até serem utilizadas. Para evitar a ativação do complemento, tomou-se o cuidado de manter as amostras sanguíneas em baixas temperaturas durante todo o seu manuseio.

4.2 - ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

4.2.1 - C3 e C4.

As dosagens de C3 e C4 foram realizadas no laboratório de Sorologia do Hospital de Clínicas, da Universidade Federal do Paraná, utilizando-se o método de turbidimetria (Behring TurbiTimeSystem), conforme instruções do fabricante.

Este método baseia-se no princípio de que numa reação imunoquímica, as proteínas presentes na amostra, formam imunocomplexos com os anticorpos específicos presentes no reagente e a turbidez produzida na reação é então medida fotometricamente. As concentrações presentes são determinadas quantitativamente por medida turbidimétrica da máxima velocidade da reação (V_{max}). A velocidade máxima da reação para formação do precipitado e o tempo gasto para atingi-la são medidos simultaneamente. A determinação dos valores se efetua pela comparação dos valores obtidos comparando-se com os padrões da firma Behringwerke (Alemanha).

Os soros foram diluídos na proporção de 1:20 e incubados com 500 μ l de reativo contendo anti-C3c e Anti-C4. Para a dosagem de C3 o soro foi previamente tratado com Inulina para a transformação completa do C3 em C3c.

Os resultados das determinações protéicas foram obtidos automaticamente pelo turbidímetro e os resultados expressos em mg/dl conforme as informações obtidas do fabricante.

4.2.2 - DOSAGEM DE IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES.(CIC)

A determinação dos imunocomplexos circulantes foi realizada no Laboratório de Investigação em Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, utilizando-se a técnica de ELISA para fixação de C3 e de C1q. Anticorpos policlonais anti-C3 e C1q humanos (Sigma Chemical Company,USA) foram adsorvidos a placa de ELISA e os CIC fixadores de C3 e de C1q foram avaliados através de reação enzimática utilizando-se um anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma).Os resultados forma expressos em microgramas/Ml.

4.2.3 - DOSAGEM DE C3d

A dosagem do C3d foi realizado no laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná.

A presença do fragmento C3d no plasma dos pacientes e controles foi detectada por imunoeletroforese de difusão dupla de C3d de acordo com Brandeslund et al (1981).

Esta técnica baseia-se no princípio de que proteínas carregadas eletricamente percorrem uma placa de gel contendo anticorpo anti-C3c e anti-C3d onde as moléculas de C3c são retidas na primeira metade da placa que contem anticorpo Anti-C3c, permitindo que apenas o C3d alcance a outra metade da placa contendo anti-C3d onde o mesmo será imunofixado.

Utilizou-se uma placa de vidro de 10 x 2,5 cm onde foram colocados dois tipos de gel de agarose (Seakem ME, Marine Colloids, USA) a 0,8% em tampão tris-barbital pH 8,6 contendo 3% de anticorpo anti C3c humano (Rabbit Immunoglobulin to human C3c Complement) e 0,5% de anti C3d (Rabbit Immunoglobulin to human C3d) (Dakopatts, Dinamarca) .

Após completa polimerização do gel, 5ul de plasma/EDTA diluído 1:3 em tampão tris-barbital pH 8,6 foram aplicados na altura do primeiro gel contendo anti-C3c. A placa foi submetida a eletroforese por 16 hs à 160V e 10 mA.

As concentrações de C3d foram estimadas através de uma curva padrão obtida pela ativação de um pool de soro normal com zimosan durante 5 dias à 37 C. Para este soro ativado foi atribuído o valor arbitrário de 1000 unidades/ml. Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias por ml (UA/ml)

4.2.4 - TCC

As dosagens plasmáticas do complexo de ataque a membrana (TCC) foram realizadas no Laboratório de Complemento do Instituto de Imunologia da Universidade de Heidelberg, Alemanha, utilizando-se a técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), e anticorpo monoclonal contra o neoantígeno expresso no complexo SC5b-9 de acordo com Mollnes et al (1985).

As placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Copenhagen, Dinamarca), foram pré-incubadas com 50 ul de anti-SC5b-9 (1 mg/ml), diluídos 1:500 em tampão carbonato pH 9.6, e incubadas por uma noite à 4 °C. Os passos seguintes de bloqueio e lavagem foram feitos com

PBS contendo gelatina 0,25% (Sigma) e PBS contendo 0,1% Tween 20, respectivamente. Os plasmas diluídos 1:3 em PBS-EDTA foram aplicados em duplicatas e incubados por 60 min a temperatura ambiente. A placa foi tratada após lavagem com PBS-Tween com anti- C5 humano de coelho (Dakopatts) e em seguida com anti- IgG de coelho conjugado com peroxidase (Dakopatts). Como substrato utilizou-se tabletes de OPD do Laboratório Organon . Esta reação foi interrompida com uma solução de HCL 2N. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro à 492-620 nm . Os resultados foram expressos em ng/ml e calculados comparando-se com uma curva padrão obtida com soro ativado por zimosan (25mg/ml por 30 min à 37 C), o qual continha uma concentração de 528 ug/ml de SC5b-9. Esta concentração foi determinada através de uma curva padrão do complexo SC5b-9 purificado.

4.2.5 - C3a-desArg

A dosagem do fragmento C3a-desArg foi realizada utilizando-se um Kit comercial para imunoensaio enzimático da firma Progen Biotechnik (Alemanha), de acordo com as informações do fabricante. Este Kit detecta o fragmento C3a desArg utilizando anticorpos monoclonais. Placas de ELISA são pré-tratadas com anticorpo monoclonal anti-C3a-desArg. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 em tampão e colocadas nos poços e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir as proteínas nativas de C3 não ligadas foram lavadas pelo menos 3 vezes com tampão de lavagem e adicionou-se então o anticorpo monoclonal anti-C3a conjugado com peroxidase e incubou-se por mais 1 h à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi removido através de 3

lavagens e 100ul do substrato (TMB) foi incubado por 10 a 15 min. A reação foi interrompida com 100ul de 1N H₂SO₄ e a leitura feita em espectrofotômetro a 450-550 nm. Os resultados foram expressos em ng/ml.

4.2.6 - DOSAGEM DO COMPLEXO C1rs-C1inh.

O complexo C1rs-C1inh é formado e liberado no plasma após ativação de C1 pela ativação da via clássica. A sua dosagem foi realizada através da técnica de ELISA como descrito por Zilow et al (1990).

As placas de ELISA (Nunc) foram pré-incubadas com anticorpos de coelho anti- C1inh humano (Dakopatts) por 16 horas à 4 °C. Após duas lavagens, a placa foi bloqueada com tampão PBS contendo 1% de albumina bovina (Serva, Alemanha). Depois de nova lavagem, 50ul de plasma EDTA diluídos 1:200 em tampão PBS com 0,1% de Tween e 10 mM de EDTA foram aplicados em duplicata e incubados por uma hora à temperatura ambiente. O segundo anticorpo utilizado foi anti-C1s humano de cabra diluído 1:200 (Atlantic Antibodies, USA). Após incubação de uma hora à temperatura ambiente e três lavagens, adicionou-se o terceiro anticorpo : anti-IgG (Fab2) de cabra produzido em coelho e conjugado com peroxidase (Dianova, Alemanha). Como substrato utilizou-se 12 mg de ABTS diluídos em 6 ml de ácido cítrico 0,1 M (0,2M Na₂HPO₄ pH=4,6 e diluído 1:2 em água destilada). A reação foi bloqueada e lida à 405/492 nm. Como curva padrão utilizou-se o complexo C1rsC1inibidor purificado e os resultados foram expressos em unidades por ml (U/ml).

4.2.7 - DOSAGEM DO COMPLEXO C3bBbP

A dosagem do complexo C3bBbP, que é a enzima C3 convertase da via alternativa foi realizada através do método de ELISA como descrito por Zilow et al em 1990. As placas de microtitulação (Nunc) foram pré-incubadas com anticorpo anti-Propetina humana (Atlantic Antibodies) por 16 horas à 4 C. Após bloqueio com PBS/1% albumina bovina e lavagem, 50ul de plasma EDTA diluídos 1:25 foram aplicados e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Como anticorpo secundário utilizou-se anti-C3c humano marcado com biotina (Dakopatts). Após incubação com Streptavidina-peroxidase (Amersham, Inglaterra), adicionou-se o substrato (OPD-Dakopatts). A reação foi interrompida com H₂SO₄ 12,5% e lida à 490/620 nm. O complexo purificado C3b(Bb)P foi utilizado como curva padrão. Os resultados foram expressos em unidades por ml (U/ml).

As dosagens de TCC, C3a-desArg, C1rs-C1inh e C3bBbP foram realizadas no Laboratório de Complemento do Instituto de Imunologia da Universidade de Heidelberg, Alemanha.

4.2.8 - Fator Reumatóide

O Fator Reumatóide foi dosado no laboratório de Sorologia da Universidade Federal do Paraná. Através do método do Latex.

4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A metodologia estatística aplicada na análise dos dados foi a seguinte:

1 - Verificou-se a questão da Gauseanidade da população da amostra por meio do teste de Filliben [Bartman] e do gráfico de probabilidade normal.

2 - Quando a Gauseanidade era aceita aplicou-se na comparação de grupos, o teste "t" na versão clássica, se as variâncias das duas populações eram aceitas como iguais. E o teste "t" na versão de Aspin-Welch [Armitage,1971] quando as variâncias eram distintas. A igualdade de variâncias foi também testada, usando-se o teste F [Brown e Hollander,1977].

3 - Quando a Gauseanidade não era aceita, aplicou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney [Brown e Hollander,1977] na comparação entre os grupos.

4 - Calculou-se a correlação entre as várias variáveis usando-se a correlação linear de Pearson [Armitage,1971].

5 - Contrui-se para melhor descrição das variáveis, comparação e interpretação dos resultados o histograma de resultados de Box-Whisker.

5 - Resultados

Os resultados obtidos nos pacientes com EI para todos os marcadores investigados estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1. Resultados das dosagens de C3, C4, CIC, C3d, C3a desArg, TCC, VC e VA obtidos nos pacientes com EI

Pacientes	C3 mg/dl	C4 mg/dl	CIC ug/ml	C3d UA/ml	C3ade ng/ml	TCC ng/ml	VC U/ml	VA U/ml
L.J.M	42.3	19.5	77	255	704.8	1136.	355	12.0
M.M.M	43.7	14.6	0	108	100.3	1459	178	25
O.B.	26.6	30.5	0	189	427.9	682.5	232.3	11.33
D.R.O	17.1	25	0	360	523.9	1566	477.9	7.65
M.A.	17.1	7.89	248	360	882.3	2668	473.4	10.41
J.P.	42.6	15.9	0	202	1057	1268	300.3	23.71
O.S.	45.7	110.4	47	114	271	1087	377.2	12.6
A.C.M	59.4	31.8	0	330	391.6	738.4	552.7	8.81
J.A.A	53.2	21.9	0	360	1489	2770	426.9	50.43
L.G.	50.2	19.7	0	70	138.2	258	143.6	9.76
J.B.S	44.3	11.7	0	300	nd	nd	nd	nd
M.I.D	86.5	28.5	100	216	202	1115	264	13.43
M.AOD	49.8	17.3	140	144	633	990.3	378	15.91
J.C.S	nd	nd	204	0	1002	794	143.6	34.98
L.AAD	74.4	20.4	144	138	704.8	1136	355.4	12.6
R.M.	95.3	41.3	48	300	79.7	2537	312.9	14.92
J.APF	64.6	34.9	0	144	142.3	816.5	171.9	15.08
N.L.O	81.1	43.8	0	189	nd	nd	nd	nd
L.S.C	98.3	40.3	0	189	131	177.7	163.8	6.35
J.C.L	nd	nd	nd	nd	1689	1092	470.1	81.61
Média	55.12	29.7	53	208	587.2	1238.4	320	20.36

nd= não determinado

A comparação dos valores de C3d, C3A-desArg, TCC, VA, VC e CIC, C3 e C4 entre os pacientes com EI, valvopatas e normais demonstrou uma diferença estatisticamente significativa para todos os marcadores de ativação do complemento ($p < 0.05$), exceto para C3BbB(P), marcador de ativação da via alternativa. Os resultados mais significantes foram obtidos para C3d (EI/normais e EI/valvares), C3a desArg(EI/normais), TCC(EI/normais) e VC (EI/normais e EI/valvares), vide tabela 2.

TABELA 2. Comparação dos valores médios de CIC (Anti-C3 ELISA), C3, C4, C3d, C3a desArg, TCC, C1rs-C1inh (VC) e C3bBbP (VA) entre controles normais, valvares e EI.

ENSAIO	CONTROLES	EI	p
C3 mg/dl	N=61.9(14)	56.9(26.6)	0.2625
	V=74.2(26.6)		0.048
C4 mg/dl	N=28.68(9.68)	72.2(16.6)	0.3141
	V=23.44(7.5)		0.0676
CIC ug/ml	N=0	52.57(16)	0.00552
	V=6.7(4.8)		0.00407
C3d UA/ml	N=0	226(25)	0.000015●
	V=46.6(10.8)		0.000035●
C3adesArg ng/ml	N=156.08(36.6)	615.083(109)	0.00049
	V=279.37(49.8)		0.0291
TCC ng/ml	N=258.51(29)	1238.19(175)	0.000145
	V=662.68(93)		0.0135
VC U/ml	N=119.3(7.3)	321.08(30)	0.000025●
	V=125.1(4.3)		0.000069●
VA U/ml	N=15.74(1.2)	20.36(4.4)	0.43
	V=18.45(1.4)		0.143

N= controles normais

V= controles valvares

●= Teste "t"

() Erro padrão da média

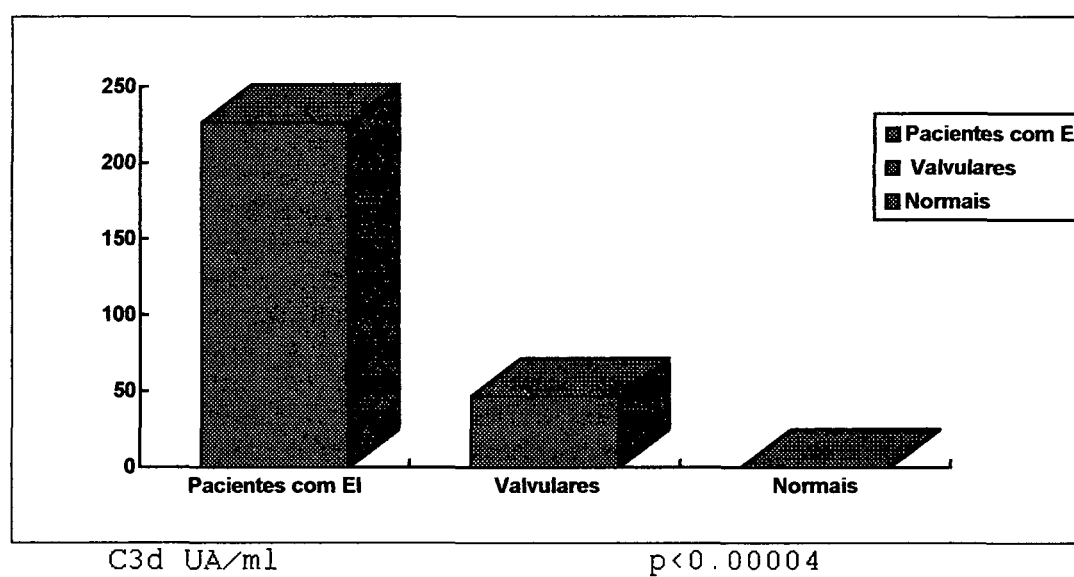
p=nível de significância

Demais marcadores= Teste Wilcoxon Mann Whitney.

5.1 - C3d

Os pacientes com EI apresentaram valores superiores de C3d em relação aos grupos controles. Esta diferença foi estatisticamente significativa quando comparados com os controles valvares ($p=0.000035$) e normais ($p=0.000015$) .

GRÁFICO 1 - Comparação entre os níveis médios de C3d observados nos pacientes com EI, controles valvares e normais.

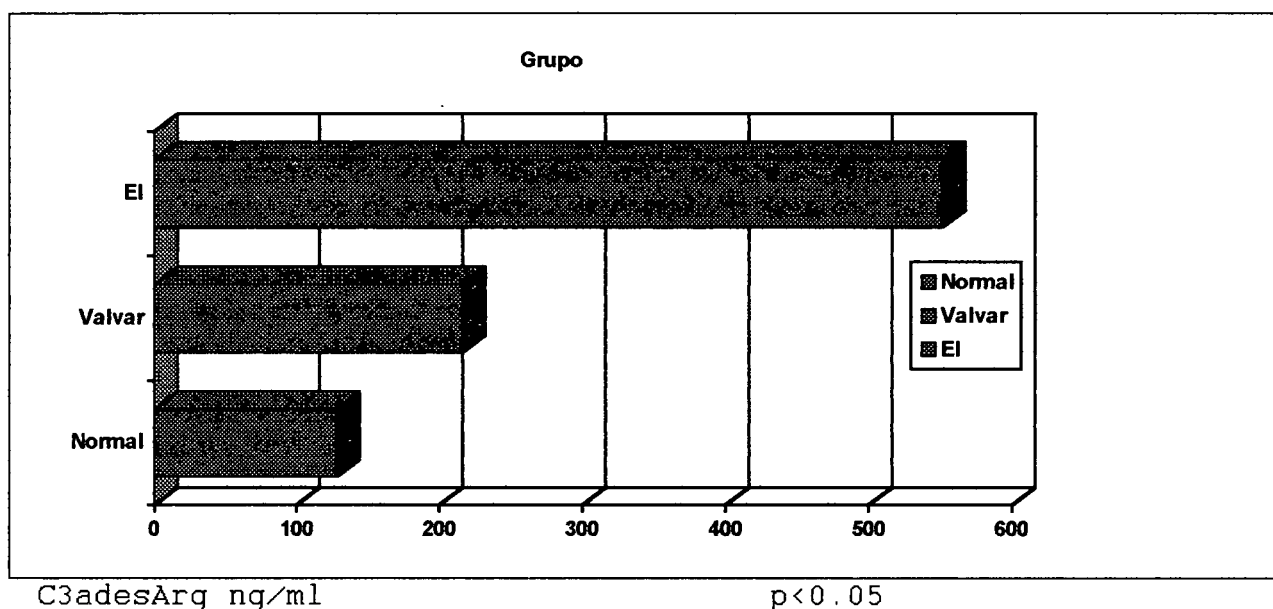


5.2 - C3a-desArg.

Os níveis de C3a-desArg foram significativamente maiores nos pacientes com EI em relação aos controles normais ($p=0,00049$) e valvares ($p=0,029$) (teste Wilcoxon Mann Whitney).

Observou-se também, que os pacientes valvares apresentaram níveis significativamente maiores do que os controles normais ($p=0,0004$) .

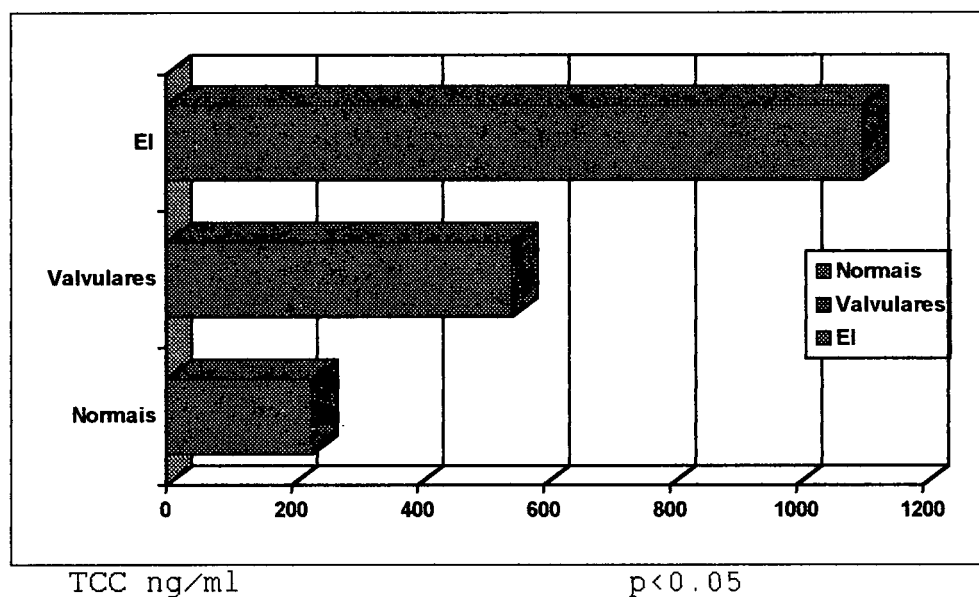
GRÁFICO 2. Comparação entre os níveis médios de C3adesArg observados nos pacientes com EI, controles valvares e normais.



5.3 - TCC

Os pacientes com EI, apresentaram níveis médios de TCC superiores aos encontrados nos controles normais ($p=0.00014$) e controles valvares ($p=0.013$) (teste de Wilcoxon Mann Withney). Os pacientes portadores de lesões valvares também apresentaram níveis de TCC mais elevados do que o grupo normal ($p=0.0008$).

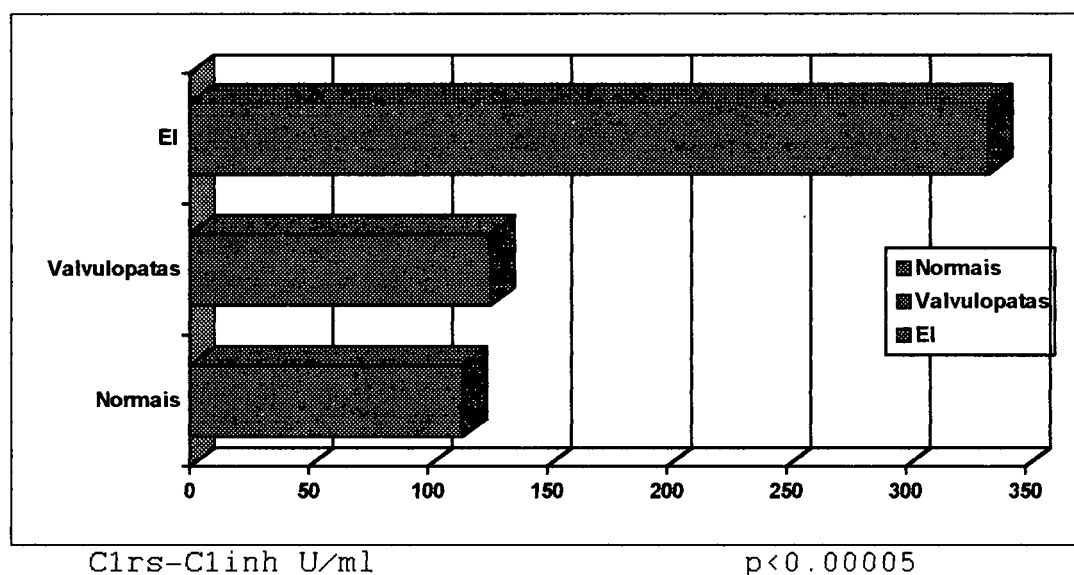
GRÁFICO 3. Comparação dos níveis de TCC entre os pacientes com EI, controles valvares e controles normais.



5.4 - VIA CLÁSSICA (C1rs-C1inh)

Os valores de C1rs-C1inh marcador de ativação da via clássica (VC), foram significativamente maiores nos pacientes com EI em relação aos controles normais ($p=0.000025$) e valvares ($p=0.000069$), demonstrando uma ativação preferencial do complemento pela via clássica, entre os pacientes com EI.

GRÁFICO 4. Comparação dos níveis de C1rs-C1inh entre os pacientes com EI, controles valvares e controles normais.



5.5- VIA ALTERNATIVA (C3bBbP)

Entre os 20 pacientes com EI, apenas 5 (25%) apresentaram níveis de C3bBbP (VA) superiores à média dos controles. A análise estatística dos dados demonstrou não haver diferença entre os pacientes com EI e os controles normais ($p=0,43$) e valvares ($p=0,14$). Não houve também, diferença entre o grupo normal e o valvar.

5.6 - CIC

Entre os pacientes com EI, 35% (7 entre 20) apresentaram níveis detectáveis de CIC pelo método de C3. Porém apenas 5% (1 entre 20) apresentou positividade pelo método de Clq, sendo este paciente também positivo para CIC pelo método de C3. Nenhum dos controles normais apresentou níveis detectáveis de CIC, em ambos os métodos utilizados (Clq e C3). Entre os controles valvares, apenas 2 (13%) pacientes apresentaram níveis detectáveis de CIC pelo método de ELISA anti-C3, porém com valores baixos.

A comparação destes resultados apresentou diferença estatisticamente significativa entre pacientes com EI e valvares ($p=0,004$) e pacientes com EI e controles normais ($p=0,0055$).

5.7 - C3 e C4.

A média dos valores de C3 nos indivíduos normais foi de 61,9 mg/dl e C4 de 28,69 mg/dl, nos pacientes valvares C3 foi de 72,2 mg/dl e 23,44 mg/dl e nos pacientes com EI foi de 56,9mg/dl e 25,5mg/dl, respectivamente.

Entre os pacientes com EI 66% tiveram valores de C3 e 44% de C4 abaixo da média dos controles. Os resultados da análise estatística, demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa somente dos níveis de C3 nos pacientes com EI quando comparados com os controles valvares ($p=0.048$).

5.8 - FATOR REUMATÓIDE

Entre os 20 pacientes com EI 6(30%) apresentaram FR positivo. Entre estes, 3 (50%) apresentaram CIC positivo. Os valores médios de C3d, C3a desArg, TCC, VA e VC foram superiores nos pacientes com presença de FR em relação aos pacientes com FR negativo, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.9 - CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES ESTUDADOS.

Os resultados da análise de correlação nos pacientes com EI entre os diferentes marcadores estudados estão demonstrados na tabela 3.

As seguintes correlações significantes foram observadas:

I - Os níveis de C3d se correlacionaram positivamente com os níveis de TCC ($p=0.019$).

II - Os níveis de C3a desArg apresentaram correlação positiva com TCC ($p=0.029$) e com os níveis de ativação da via alternativa, complexo C3bBbP ($p=0.029$).

III - Os níveis de CIC se relacionaram inversamente com C4 ($p=0.037$) e positivamente com a creatinina (0.006)

Os níveis de TCC se correlacionaram positivamente com os valores de Cirs-Clinh, marcador de ativação da via clássica, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes ($p=0.058$) bem como o C3a desArg com C3d ($p=0.059$)

Não observamos nenhuma relação entre os níveis de C3 e C4 com uma maior ou menor ativação do complemento, corroborando com a idéia de que as dosagens de C3 e C4 não são um parâmetro seguro para avaliar a ativação do complemento

Não houve também, correlação entre os níveis de C3 e C4 e a via de ativação do complemento. Não havendo portanto correlação entre os baixos níveis de C3 com a ativação da via alternativa e de C4 com a ativação da via clássica.

Os valores de CIC e C3 também não se correlacionaram entre si ($P=-0.433$). Porém uma correlação inversa entre os níveis de C4 e CIC foi observada ($p=0.013$). Sugerindo um consumo de complemento na presença de CIC ,principalmente pela via clássica

As demais análises de correlação não demonstraram resultados estatisticamente significantes

TABELA 3. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS DOS DIFERENTES MARCADORES ESTUDADOS NOS PACIENTES COM EI.

MARCA DORES	C3	C4	C3d	C3a des	TCC	VC	AV	CIC	CREAT ININA
C3			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C4			NS	NS	NS	NS	NS	0.037	NS
C3d	NS	NS		NS	0.019			NS	NS
C3adesArg	NS	NS	NS		0.029 	NS	0.029	NS	NS
TCC	NS	NS	0.019	0.029		0.058	0.028	NS	NS
VC	NS	NS		0.022 	0.058		NS	NS	NS
VA	NS	NS		0.029	NS	NS		NS	NS
CIC	NS	0.037 	NS	NS	NS	NS	NS		0.006
Creat inina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
T.Evo lução	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Teste de: Correlação linear de Pearson, valores expressos do nível de significância (p)
NS=não significante

Entre os pacientes que tiveram valores detectáveis de CIC (n=7) todos apresentaram valores superiores aos controles do complexo Cirs-Clinh e nenhum deles apresentou níveis aumentados de C3bBbP, indicando que a ativação do complemento foi preferencialmente pela via clássica. Dos 13 pacientes com CIC negativo, 5 apresentaram ativação aumentada pelas duas vias. A análise estatística destes resultados porém não demonstrou correlação

significante entre os valores de CIC (C3) e VA ($p=0.33$) e VC ($p=0.12$)

5.10 - MANIFESTAÇÕES EXTRACARDÍACAS.

Entre os 20 pacientes estudados 19 (95%) apresentaram manifestações extra-cardíacas, as quais estão representadas na tabela 4. Observou-se uma maior incidência de manifestações renais 50%, pulmonares 35%, S.N.C. 25% e esplenomegalia 30%

5.10.1 - CORRELAÇÃO ENTRE AS MANIFESTAÇÕES EXTRA-CARDÍACAS, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E CIC.

5.10.1.1 - MANIFESTAÇÕES RENAIIS

Entre os 20 pacientes, 3 (15%) apresentaram valores elevados de creatinina, acompanhados de alterações no parcial de urina e 6 (30%) tiveram alteração apenas da creatinina, totalizando 9 (45%) pacientes com alterações nos valores de creatinina.

Todos os pacientes, que apresentaram níveis aumentados de creatinina tiveram evidências de ativação do complemento pela via clássica com exceção de 2 pacientes que apresentaram níveis elevados da VA. Três destes pacientes com valores elevados de creatinina tiveram CIC positivo (33.3%).

A análise estatística não demonstrou correlação entre os níveis de creatinina e C3a-desArg ($p=0.84$), TCC (0.55), VC (0.94) e VA ($p=0.22$). Porém houve correlação entre os níveis de

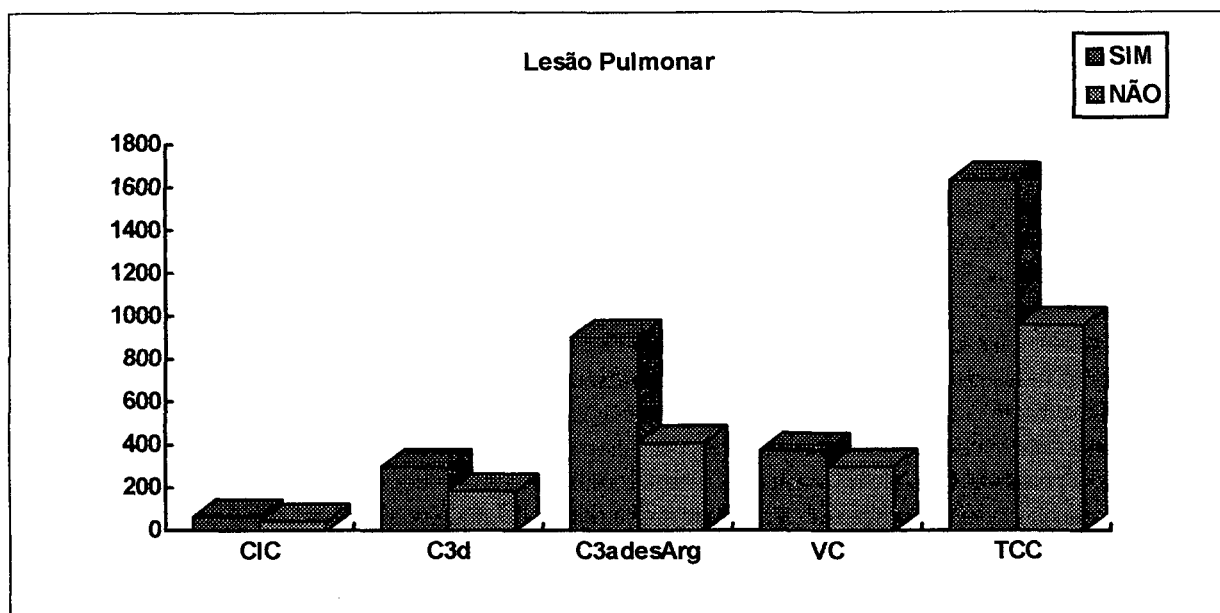
creatinina e os valores de CIC ($p=0.006$), este dado entretanto deve ser interpretado com cuidado pelo fato de ter sido obtido com poucas amostras.

5.10.1.2 - MANIFESTAÇÕES PULMONARES

Entre os 7 pacientes(35%) com manifestações pulmonares, todos demonstraram evidências de ativação do complemento, 5 deles (71%) tiveram ativação exclusivamente pela via clássica e 2(28%) por ambas as vias. Três pacientes (42%) apresentaram CIC detectável.

Como demonstra o gráfico 5 a média dos valores de C3d, C3a-desArg, TCC, C1rs-C1inh e C3bBbP foram maiores nos pacientes com comprometimento pulmonar, sugerindo haver uma maior ativação do complemento nos pacientes com esta manifestação clínica. Porém somente os níveis de C3d ($p=0.00268$) e C3adesArg ($p=0.0301$) demonstraram resultados estatisticamente significantes

GRÁFICO 5. Comparação entre os níveis médios de CIC , C3d, C3adesArg, TCC, VC e VA entre os pacientes com manifestação pulmonar e sem esta manifestação.



C3d $p(0.0026)$ C3a desArg $p(0.030)$

5.10.1.3 - ESPLENOMEGALIA

Dos seis pacientes(30%) com EI que cursaram com esplenomegalia, todos apresentaram indícios de ativação do complemento, e apenas 3 tiveram CIC detectável. As médias dos valores de C3d, C3a desArg, TCC, VC e VA não foram superiores ao grupo sem esplenomegalia.

5.10.1.4 - MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS

Dos 20 pacientes com EI estudados, 5 (25%) tiveram acidente vascular cerebral. Quatro destes pacientes apresentaram ativação pela via clássica e um pela via alternativa. Apenas um paciente apresentou CIC detectável. Os níveis médios de CIC,

C3d, C3a-desArg, TCC e VC não foram superiores aos observados nos pacientes sem lesão de S.N.C..

TABELA 4. Manifestações extra-cardíacas mais frequentes, ativação do complemento e CIC em EI

O.Afe tado	N.paci entes	CIC	C3d	C3ades Arg	TCC	VC	VA
Creat.	9	3 (33%)	7 (77%)	6 (66%)	7 (77%)	8 (88%)	2 (22%)
Pulmão	7	3 (42%)	6 (85%)	6 (85%)	6 (85%)	7 (100%)	2 (28%)
Baço	6	3 (50%)	5 (83%)	3 (50%)	4 (66%)	6 (100%)	0 (0%)
S.N.C.	5	1 (20%)	4 (80%)	4 (80%)	4 (80%)	5 (100%)	1 (20%)
P.Urin	8	6 (75%)	7 (87%)	4 (50%)	8 (100%)	8 (100%)	1 (12%)
Total	19	7	16	13	16	18	5

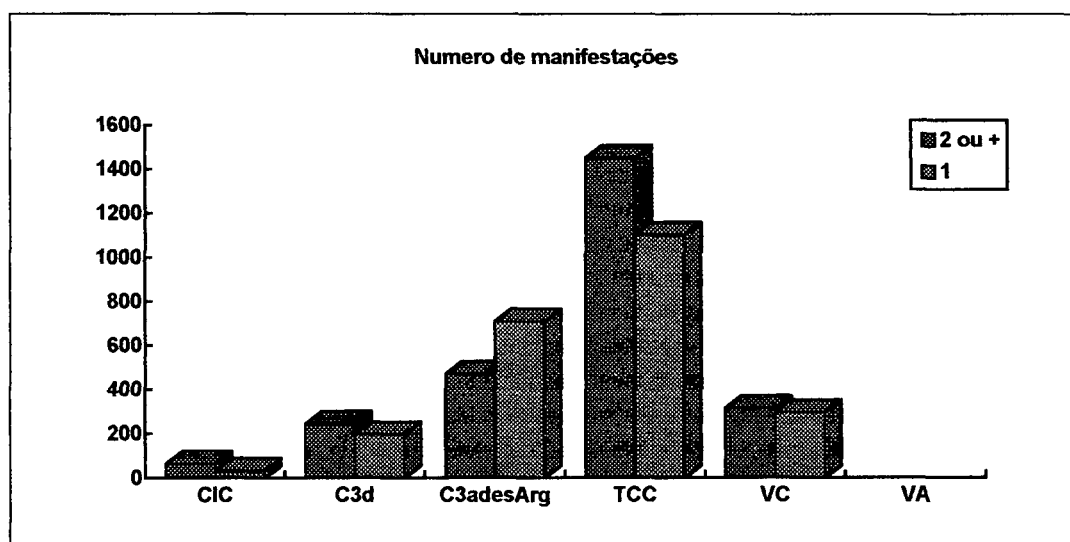
Entre as manifestações extra-cardíacas as que apresentaram maior incidência de CIC foram as alterações de sedimento urinário(33.3%), manifestações pulmonares (42.8%) e esplenomegalia (50%).

5.10.1.5 - PRESENÇA DE MAIS DE UMA MANIFESTAÇÃO EXTRA-CARDÍACA

Entre os 20 pacientes estudados, 7(35%) apresentaram mais de uma manifestação extra-cardíaca, entre estes 3(42%) tiveram CIC positivo. Os níveis médios de CIC, C3d, TCC e VC foram superiores no grupo que apresentou mais de uma manifestação extra-cardíaca, quando comparados com os pacientes com somente

uma manifestação extra-cardíaca. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

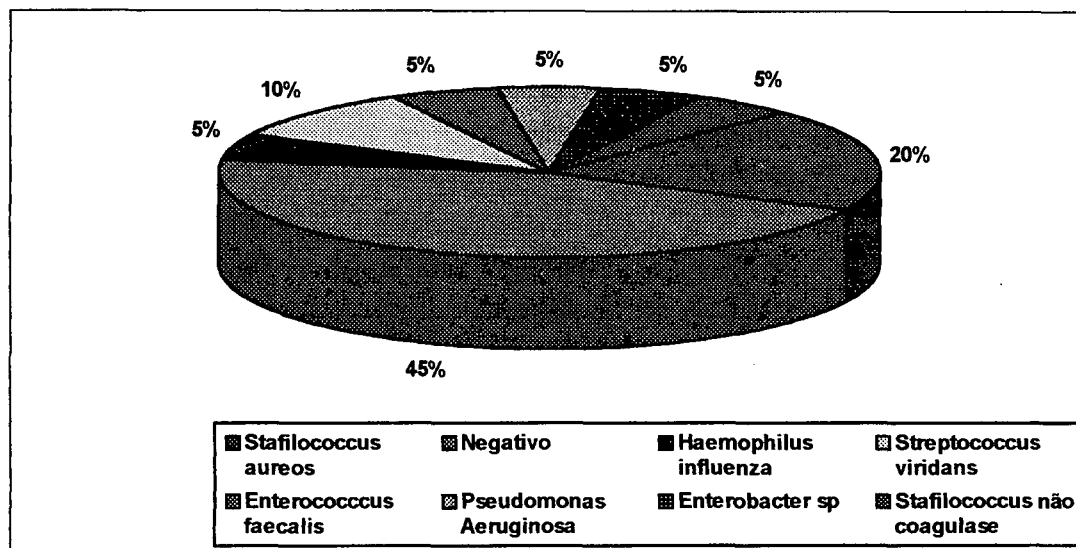
GRÁFICO 6. Comparação dos níveis médios de CIC, C3d, TCC e VC entre os pacientes com mais de uma manifestação extra-cardíaca e pacientes com manifestação única.



5.11 - MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS

A análise bacteriológica dos 20 pacientes com EI, demonstrou que 4(20%) deles tiveram infecção por *Staphylococcus aureus*, 1(5%) por *Haemophilus influenza*, 2(10%) por *Streptococcus* do grupo *viridans*, 1(5%) por *Enterobacter sp.*, 1(5%) por *Enterococcus faecalis*, 1(5%) por *Pseudomonas aeruginosa*, 1(5%) por *Staphylococcus* não produtor de coagulase e 9(45%) tiveram hemoculturas negativas. Portanto o microorganismo mais frequentemente encontrado foi o *Staphylococcus aureus*.

GRÁFICO 7. Frequência dos microorganismos encontrados nas hemoculturas positivas dos pacientes com EI.



5.11.1 - CORRELAÇÃO ENTRE os MICROORGANISMOS, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E CIC.

Não houve diferença nos níveis de ativação do complemento entre os grupos com hemocultura positiva e negativa.

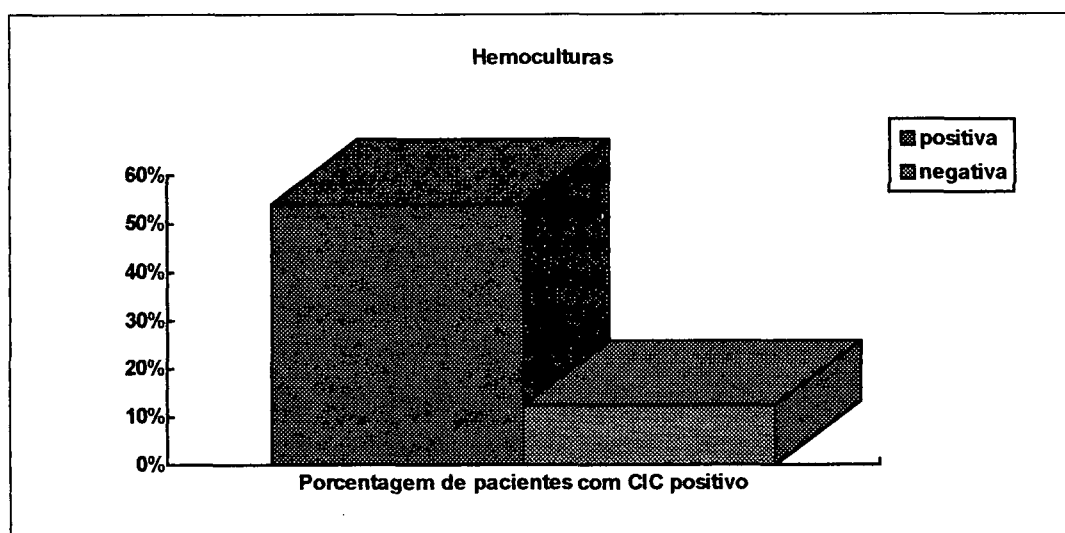
Dos 9 pacientes com hemoculturas positivas, todos tiveram valores somente da via clássica (VC) aumentados. Nenhum apresentou evidências de ativação pela via alternativa, inclusive aqueles positivos para *Staphylococcus aureus*.

Os pacientes com infecção por *Staphylococcus aureus* apresentaram em média valores superiores de C3d, C3a desArg, TCC e VC quando comparados com o grupo infectado com outras bactérias. Entretanto não foi possível realizar a análise estatística devido ao pequeno número da amostra.

Os pacientes que tiveram hemoculturas positivas apresentaram uma maior positividade de CIC em relação ao grupo com hemoculturas negativas, sugerindo uma relação positiva entre a presença de bactéria e a produção de CIC. 54% dos pacientes com hemoculturas positivas tiveram valores positivos de CIC (C3) em relação à 12,5% dos pacientes com hemoculturas negativas. Não foi possível entretanto a realização de teste estatístico devido ao pequeno número da amostra.

Entre os 7 pacientes que tiveram valores positivos de CIC, 3 eram portadores de EI por *Staphylococcus aureus*, um por *Enterobacter sp.*, um por *Enterococcus faecalis*, um por *Pseudomonas aeruginosa* e um tinha hemocultura negativa. Nenhum dos dois pacientes com EI por *Streptococcus* do grupo *viridans* apresentaram níveis de CIC elevados. Apenas um entre 7 pacientes com hemocultura negativa apresentou valores positivos de CIC.

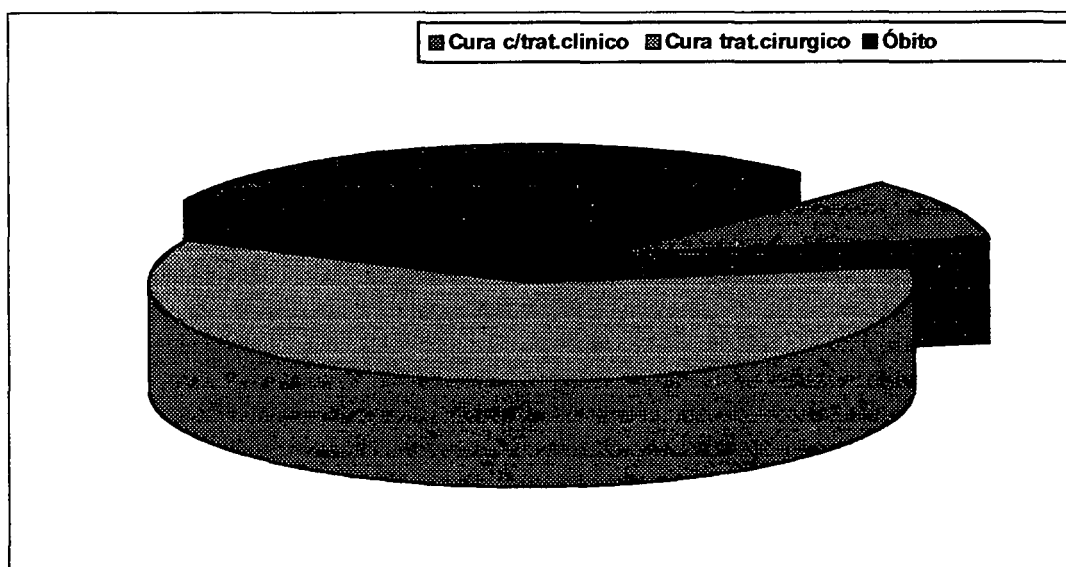
GRÁFICO 8. Comparação entre os pacientes com EI com hemocultura positiva e negativa e a presença de CIC.



5.12 - EVOLUÇÃO

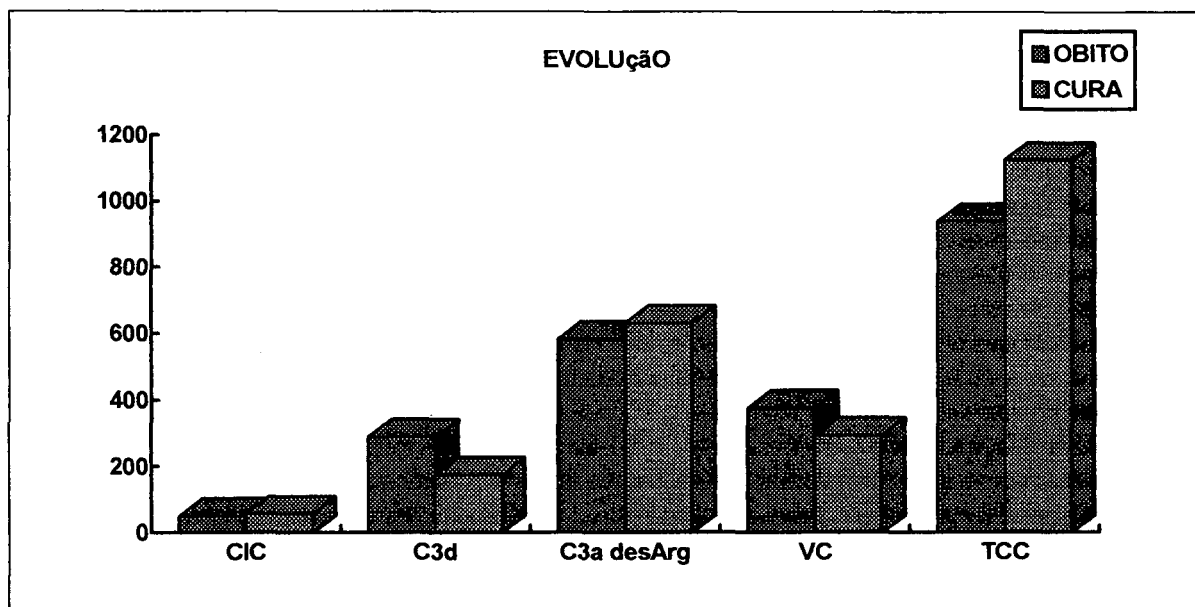
Houve três tipos de evolução para os 20 pacientes com EI estudados: 2 pacientes tiveram cura com tratamento clínico, 12 tiveram cura após tratamento cirúrgico e 6 foram à óbito. Observou-se portanto que a maioria dos pacientes evoluiu com cura após tratamento cirúrgico.

GRÁFICO 9. Distribuição dos pacientes com EI quanto à evolução final.



Entre os 6 pacientes que evoluíram com óbito, apenas 1 apresentou níveis detectáveis de CIC, entretanto estes apresentaram em média níveis superiores de C3d, e VC em relação aos pacientes que apresentaram boa evolução sendo que o resultado dos níveis de C3d foram estatisticamente significantes ($p=0.0196$).

GRÁFICO 10. Valores médios de CIC, C3d, C3a desArg, TCC ,VC entre os pacientes que foram à óbito e os que tiveram cura cirúrgica ou clínica.



C3d $p=0.019$

5.12.1 - CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPO PROLONGADO DE EVOLUÇÃO PRE-INTERNAMENTO E OS NÍVEIS DE C3d, C3adesArg,TCC, VC, VA E CIC.

Em relação ao tempo de evolução anterior ao tratamento, 8 (40%) pacientes tiveram um tempo de doença inferior à 4 semanas variando entre 4 à 20 dias, e 12 (60%) pacientes tiveram evolução superior à 4 semanas variando de 30 dias à 180 dias. Os valores médios de CIC, foram maiores nos pacientes com evolução crônica porém os níveis de ativação do complemento foram maiores naqueles que tiveram evolução mais aguda. Entretanto a análise

estatística destes dados não demonstrou diferenças significantes entre os dois grupos (CIC $p=0.42$, C3d $p=0.40$, VC $p=0.75$, C3adesArg $p=0.63$, TCC $p=0.56$, VA $p=0.75$)

6 - DISCUSSÃO

6.1 - COMPLEMENTO E ENDOCARDITE INFECCIOSA.

Nos processos infecciosos a ativação do complemento é necessária para uma adequada resposta imune e inflamatória. Sob circunstâncias normais, a ativação do complemento é benéfica para o organismo entretanto quando descontrolada ou exacerbada, pode causar lesão ao tecido do hospedeiro [Gardinali et al,1992; Michael,1987; Glovsky,1994].

Sendo a endocardite uma doença infecciosa que cursa com depósitos de complexos imunes, a participação do complemento na sua patologia pode ocorrer de várias formas. A deficiência na ativação do complemento poderia levar a um prejuízo na solubilização e eliminação dos CIC e conseqüente deposição nos tecidos. Por outro lado, os CIC poderiam exacerbar a ativação do complemento intensificando a resposta inflamatória e a lesão tissular [Law e Reid,1988; Kinoshita,1991].

Embora os CIC estejam presentes na EI, este achado não indica necessariamente lesão por complexos imunes, já que o efeito patológico dos mesmos inicia-se somente com sua deposição e o desencadeamento da reação inflamatória.

A análise da ativação do complemento na EI, portanto é de utilidade para um melhor conhecimento da fisiopatologia e dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença.

Vários estudos foram realizados com o objetivo de correlacionar os níveis individuais dos componentes do complemento (C1q,C2,C3,C4,C9 e CH50) com a atividade da EI, porém

os resultados obtidos tem sido variáveis. A tabela 5 demonstra a variabilidade dos resultados encontrados no diferentes trabalhos

TABELA 5. Estudos prévios analisando componentes do complemento em EI.

AUTOR	N.PCTES	COMPONENTE	RESULTADO
CABANE(1979)	64	C3 E C4	DIMIN 64%
CABANE(1979)	64	C3	NORMAL
KEE(1980)	22	CH50 E C3	NORMAL
BAYER(1976)	29	CH50	DIMIN 41%
O'CONNOR(1978)	24	CH50,C3,C4	DIMINUÍDO
MAISCH(1983)	23	C3,C4	NORMAL
WILLIANS(1962)	51	CH50	NORMAL 50%
WILLIANS(1988)	8	CH50	DIMINUÍDO
POCIDALO(1982)	54	CH50	DIMINUÍDO 72%

Estas medidas estáticas porém não são adequadas para avaliar o consumo de complemento, pois os níveis de C3, C4 e de CH50 não refletem com fidelidade a ativação ou consumo do mesmo, devido as variações na velocidade de síntese e catabolismo de seus componentes, limitando o seu uso no acompanhamento da atividade das doenças que cursam com ativação do complemento [MacDougal e MacDuffie,1985; Charlesworth et al,1989; Gawryl et al] ; Michael,1987].

Charlesworth et al (1989), utilizando C3 e C4 marcados com I 125 e 131, verificaram que pacientes com altos níveis de

CIC tinham um hipercatabolismo de C3 e C4 porém as suas concentrações sanguíneas não se alteravam. Como estes estudos de turnover são tecnicamente difíceis, uma abordagem mais simples para a detecção de consumo de complemento, seria a medida de produtos decorrentes de sua ativação [Glovsky,1994]. A avaliação dos produtos de ativação do complemento tem sido de maior fidedignidade para a medida "in vivo" da ativação do complemento.

Métodos para avaliação da ativação do complemento, baseados na detecção de produtos da clivagem de componentes, de complexos entre os componentes ativados, ou complexados à proteínas controladoras tem sido desenvolvidos [Gawryl et al,1988; Rother e Till,1988]. Muitos trabalhos tem sido realizados utilizando estes métodos, Salama et al (1988) utilizou o método de ELISA para detecção de TCC avaliando a ativação do complemento durante o Bybass cardiopulmonar. Níveis de TCC foram relacionados com a atividade do LES, sendo sugerido como um importante marcador de atividade da doença [Gawryl et al,1988; Messias,1995]. Gardinali et al(1992) estudaram a ativação do complemento em pacientes sépticos, através da dosagem de C3a desArg encontrando uma correlação entre os níveis de ativação do complemento e a severidade da sepsis.

Na EI poucos estudos foram realizados com relação a ativação do complemento. Pocidaló em 1982 dosou o fragmento C3d em 30 pacientes, 21 com EI e 9 com sepsis, encontrando uma positividade de 90% para C3d, porém este autor não referiu quantos pacientes com EI e quantos com sepsis tiveram níveis elevados de C3d. Em 1984, Enriquez estudando 19 casos de Febre Reumática aguda e 7 de EI encontrou níveis mais elevados de C3d

em pacientes com EI (57%) do que em pacientes com Febre Reumática aguda (0%), sugerindo a possível utilização desta dosagem no diagnóstico diferencial entre estas duas patologias .

O presente trabalho demonstrou a ativação do complemento na EI através de 5 ensaios diferentes que permitiram a verificação da ativação do complemento em diferentes estágios da cascata.

Através da dosagem de TCC, que avalia o complexo final de ataque de membranas; os fragmentos C3d e C3a desArg que são gerados durante a ativação de C3, cujo papel é central na ativação do complemento; o complexo C1rs-C1inh (VC) formado pela inativação de C1, no início da ativação da via clássica e C3bBbP (VA) que é a convertase da via alternativa.

Estes métodos são bastante sensíveis para detectar a ativação do complemento e na sua maioria foram realizados através de ELISA , utilizando-se anticorpos monoclonais. No caso da dosagem de TCC utilizamos um anticorpo monoclonal que reconhece um neoantígeno expresso somente no complexo C5b-9 ativado.

Os resultados do corrente trabalho demonstraram ativação do sistema complemento na EI, principalmente pela via clássica. Todos os marcadores de ativação, com exceção do complexo C3bBbP indicador de ativação da via alternativa, demonstraram níveis significativamente aumentados quando comparados com os controles valvares (C3d $p=0.0003$, C3a desArg $p=0.0291$, TCC $p=0.0135$ e VC $p=0.00006$) e normais (C3d $p=0.000015$, C3a desArg $p=0.00049$, TCC $p=0.000145$ e VC $p=0.000025$), sugerindo a possibilidade do uso destes ensaios como coadjuvante no diagnóstico da EI.

Os pacientes que cursaram com maior número de manifestações extra-cardíacas apresentaram em média níveis

aumentados de C3d, TCC e VC ($p=ns$). Aqueles com manifestações pulmonares tiveram em média valores aumentados de C3d ($p=0.0268$) e de C3a desArg($p=0.0301$) e os que foram à óbito apresentaram níveis aumentados de C3d ($p=0.0196$). Estes resultados sugerem que os fragmentos C3d e C3a desArg podem ser importantes indicadores de lesão de órgãos e gravidade da doença na EI.

Todos os pacientes com CIC positivo apresentaram níveis aumentados de C1rs-C1inh, confirmando a ativação preferencial pela via clássica na EI. Porém os níveis de ativação do complemento não se correlacionaram com os valores de CIC.

Os níveis de C3 e C4 não se correlacionaram com os níveis dos produtos da ativação do complemento, o que corrobora o conceito de que as dosagens destes componentes não refletem o estado de ativação do complemento. Entretanto os níveis de C4 mostraram-se inversamente correlacionados com a presença de CIC ($p=0.037$), sugerindo um consumo de C4 pela ativação da via clássica.

Estes achados indicando ativação do complemento principalmente pela via clássica, fortalecem o conceito de que a ativação do complemento na EI é mediada essencialmente via complexo imune e que ambos complexos imunes e complemento podem exercer um papel importante na fisiopatologia da EI.

Os mecanismos envolvidos no deficiente clareamento de complexos imunes na EI ainda são pouco entendidos. Kerr et al(1986) verificaram que o soro de pacientes com EI foram deficientes em solubilizar complexos imunes pré formados artificialmente. As deficiências do complemento fornecem fortes indícios sobre o seu papel no clareamento dos complexos imunes, sendo que uma maior incidência de doenças por complexos imunes

tem sido observada em pacientes com deficiência dos componentes iniciais da via clássica [Law e Reid,1988].

A inibição da precipitação de complexos imunes, é uma propriedade da via clássica enquanto a solubilização de complexos imunes pré-formados envolve a via alternativa [Miller e Nussenzweig,1975; Takahashi et al,1977; Kerr et al,1986;]. A solubilização mediada pelo complemento parece ocorrer como consequência da incorporação do fragmento de C3b ao complexo imune, que aparentemente diminui a estabilidade de ligações específicas Ag\Ac [Law e Reid,1988; Rother e Till,1988]. Esta ação pode ser iniciada diretamente pela ativação da via alternativa, ou pela ação da alça de amplificação da via clássica. Logo as duas vias de ativação do complemento são necessárias para solubilização adequada principalmente dos agregados contendo IgG e IgM. Embora a deposição de C3 pela via clássica aumente a velocidade da solubilização, a via clássica não é suficiente para esta função [Takahashi et al,1978; Pereira et al,1980].

A inibição da precipitação de complexos imunes, por outro lado, depende principalmente da via clássica. Provavelmente esta ação seja devido à ligação covalente de C3b e C1q ao complexo imune, tornando-o hidrossolúvel, perdendo assim sua capacidade de formar uma estrutura de ligação infinita de antígenos e anticorpos alternados [Paccaud e Schifferli,1989].

Consequentemente a ativação de ambas as vias são necessárias para se evitar a formação e deposição dos complexos imunes que levam à doença.

Devido ao fato de não ter sido realizado estudos de deposição de complexos imunes, não podemos retirar conclusões

sobre este assunto no presente trabalho. Mas existe a possibilidade que pela quantidade excessiva de CIC formados na EI haveria um consumo excessivo da via clássica que poderia levar ao depósito de complexos imunes e uma vez que a via alternativa não está sendo ativada apropriadamente a solubilização dos complexos imunes estaria prejudicada na EI. Uma provável deficiência adquirida ou congênita de componentes ou receptores do complemento também poderia ser uma causa para a transitória falha na eliminação dos complexos imunes na EI.

6.2 - COMPLEXOS IMUNES CIRCULANTES E ENDOCARDITE INFECCIOSA

A EI é uma enfermidade infecciosa resultante do implante de microorganismos sobre o endocárdio. Posteriormente a este evento desenvolve-se pela resposta imune do organismo, com predomínio humoral, a geração de complexos imunes circulantes com capacidade pró-inflamatória. Esta "fase imunológica" da EI se compara a uma enfermidade por complexos imunes que se caracteriza por vasculite e glomerulonefrite [Enriquez e Reyes,1984]

Inúmeros estudos concluíram que a determinação dos CIC era de valor diagnóstico e prognóstico em pacientes com EI, e que a presença de CIC estava relacionada com a presença de algumas manifestações extra-cardíacas. Alguns autores entretanto não encontraram correlação entre os níveis de CIC, os achados clínicos e a evolução clínica da EI [Pocidalo et al,1982].

No corrente trabalho verificou-se a presença de CIC em apenas 35% dos pacientes, uma percentagem inferior à relatada na literatura. Petelenz (1988) e Bayer (1976) encontraram uma

freqüência de 98%, Maisch (1983) e Cabane (1979) de 84% e Kauffman (1981) de 63%. Aqueles que encontraram uma menor freqüência foram Pocidaló (1982) e Kaufmann (1981) 53%. A tabela 6 demonstra os vários trabalhos realizados dosando CIC na EI.

TABELA 6. DOSAGENS DE CIC NA ENDOCARDITE INFECCIOSA

AUTOR	N PCTES	TÉCNICA	% CIC POS
CABANE	64	PEG	84%
KAUFFMANN	40	Clq	63%
		CONGLUTININA	53%
BAYER	29	RAJI CELL	97%
McKENZIE(1980)	24	Clq	58%
		CONGLUTININA	13%
		PEG	46%
MAISCH	41	Clq	85%
POCIDALO	54	Clq	53%

As possíveis razões para esta menor freqüência no presente estudo, podem estar relacionadas ao tempo da coleta que variou entre 1 à 17 dias após o internamento com uma média de 4 dias, e ao método utilizado para dosagem dos CIC.

Em relação ao tempo médio de coleta, Bayer et al(1979) verificaram que em 50 pacientes com EI o pico máximo de CIC pelo método de Raji cell, desenvolveu-se dentro de 2 semanas após a inclusão no trabalho, sendo que 58% deles foi positivo na amostra inicial. No atual estudo, as coletas foram realizadas no início do tratamento, além do que entre os 20 pacientes, 8 tinham pouco

tempo de evolução da doença e entre estes, 6 tiveram valores indetectáveis de CIC. Este é um fator que pode ter colaborado para o baixo índice de positividade de CIC nos pacientes estudados. Entretanto a principal razão da diferença na frequência dos CIC em relação à literatura provavelmente esteja relacionada aos métodos empregados pois os resultados na determinação de CIC são altamente influenciados pelos diferentes métodos utilizados.

Apesar da dosagem de CIC no diagnóstico e acompanhamento de algumas patologias ter sido considerada útil por vários autores, os métodos até agora utilizados não oferecem uma completa segurança. Por este motivo muitas controvérsias e críticas tem sido levantadas em relação à utilidade diagnóstica da dosagem de CIC [Pereira et al,1980; Levinson e Goldman,1987].

As medidas de CIC dependem muito da sua formação e deposição que pode ser influenciada por vários fatores como a solubilidade, natureza, tamanho, quantidade de antígenos, a resposta dos anticorpos e o estado dos sistemas envolvidos no seu clareamento (complemento, receptores celulares tanto para os componentes do complemento quanto para a região Fc das imunoglobulinas).

Os métodos de maior utilização para dosagem dos mesmos são baseados nas propriedades biológicas e físico-químicas dos CIC independente do fator antigênico. Estes métodos tem variado na sua especificidade, sensibilidade e aplicabilidade e não detectam todos os tipos de CIC [Theofilopoulos e Dixon,1980; McDougal e McDuffie,1985; Hoiby et al,1986].

Como existe uma variedade de agentes potencialmente antigênicos (desde organismos completos à pequenos peptídios), e

como a resposta dos anticorpos pode variar de acordo com a classe, subclasse, afinidade, além de outros fatores, as características dos CIC são extremamente variáveis. Portanto a análise baseada em um modelo de CIC não pode ser aplicada adequadamente a todos [Theofilopoulos e Dixon,1980; Hoiby et al,1986]. Além disso muitos CIC circulam ligados à eritrócitos e não podem ser detectados na maioria dos métodos empregados.

Estas considerações sugerem que embora vários métodos tenham sido desenvolvidos para a medida de CIC no sangue, é improvável que a fração determinada no soro ofereça um bom perfil dos CIC presentes na circulação [Schifferli e Taylor,1989]. A própria existência de inúmeros métodos de dosagem de CIC sugere que nenhum, isoladamente é extremamente eficiente e que a combinação de 2 ou 3 métodos seria o ideal [McDougal e McDuffie,1985; Hoiby et al,1986].

Devido ao grande número de técnicas que tem sido desenvolvidas para análise dos CIC discutiremos apenas aquelas mais utilizadas nos trabalhos realizados com EI.

Bayer et al (1979) utilizaram o método de Raji cell que se baseia na capacidade destas células (derivadas de pacientes com linfoma de Burkitt) de se ligarem à componentes do complemento como C3 e Clq. Trata-se de um método sensível e reprodutível porém tem causas de falsos positivos, pois estas células também reagem com auto-anticorpos como anti-DNA.

Cabane e McKenzie utilizaram a técnica de precipitação com polietilenoglicol (PEG) que se baseia na propriedade do PEG em precipitar, na concentração de 3,5% à 4,0%, CIC que contem IgG sem precipitar IgG livre. Apesar de ser um método de fácil realização pode ser afetado pela quantidade de IgG no soro que

em alguma quantidade pode também se precipitar. Assim a principal desvantagem deste método é a falta de especificidade para CIC.

Deck e Kauffman utilizaram a técnica da congulinina, que é uma proteína normalmente encontrada no sangue de bovinos e tem a capacidade de se ligar ao C3. Este é um método sensível porém só detecta CIC ligados à C3, e como o C3 tem meia vida curta, apenas uma porção do C3 que ainda permanece ligada pode ser detectada.

A grande maioria dos trabalhos realizados (Cabane, Deck, Kauffman, Mckenzie, Maisch e Pocidalo) utilizaram métodos relacionados ao Clq, pela sua capacidade de ligar-se a IgG das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e IgM. Todos os testes utilizando Clq tem a desvantagem de que podem ser afetados pela presença de Clq não complexado, e por substâncias que também podem reagir com o Clq como DNA, heparina e endotoxinas bacterianas e proteína C reativa que podem estar presentes no sangue. [Eisenberg et al,1977; Pereira et al,1980].

Nos últimos anos tem sido desenvolvidas técnicas para dosagem de CIC, que são os ensaios de captura com anticorpos que parecem oferecer um bom potencial para uma medida mais segura dos CIC [Levinson e Goldman,1987]. Entre eles, destaca-se a técnica de ELISA utilizando anticorpos monoclonais anti Clq e anti-C3 que reconhecem especificamente alterações conformacionais que ocorrem no Clq após ligação ao CIC e não se ligam ao Clq livre [MacDougal e MacDuffie,1985]. O uso de anti-Clq e anti-C3 permite a verificação dos complexos que ativam tanto a via clássica quanto a alternativa e parecem ter a vantagem de não reagir com outras substâncias como fator reumatóide e DNA e por

não ativar o complemento, diminuindo os falsos positivos. [Pereira et al, 1980; Larsson et al, 1988].

Neste estudo utilizou-se dois métodos na dosagem de CIC através de ELISA com anticorpo policlonal anti-C1q e anti-C3 para capturação de CIC fixadores de C1q e C3. Apesar destas técnicas serem consideradas de boa aplicabilidade pela literatura [McDougal et al, 1982] obtivemos apenas um (5%) resultado positivo com anti C1q e 7(35%) com anti-C3.

Os resultados de C1q são compatíveis com os achados de Levinson e Goldman (1987) que notaram uma baixa sensibilidade no método de *C1q* para dosagem de CIC. Nesse estudo os autores compararam 4 métodos para dosagem de CIC, PEG-IgG, C1q-IgG, C1q binding e Raji-cell, encontrando uma sensibilidade muito menor com o método C1q-IgG. Uma das justificativas para esta baixa sensibilidade seria que os sítios de C1q nos CIC sejam menos acessíveis à captura pelo anticorpo do que os sítios de C3. Kilgallon et al, 1982 sugeriram que a ativação dos componentes do complemento após a ligação de C1q faz uma ponte entre o C1q e o CIC, interferindo na ligação entre a fase sólida anti-C1q e o C1q ligado ao complexo. Estes autores obtiveram uma sensibilidade muito maior para a detecção de CIC utilizando anti-C3.

Como todos os pacientes apresentaram níveis elevados de ativação do complemento é de se imaginar que se uma vez os CIC estão presentes na EI, os mesmos são fixadores de complemento. A baixa positividade de CIC dos nossos resultados entretanto pode estar relacionada a uma baixa sensibilidade dos métodos aqui utilizados. Além disso não se pode excluir a possibilidade de que com a utilização de métodos adicionais, que se baseiam em outras propriedades dos CIC, a positividade nos pacientes

estudados possa ser alterada. Isto entretanto não foi possível de ser realizado pois os mesmos não são disponíveis no nosso meio.

Para podermos concluir sobre a utilidade diagnóstica das dosagens de CIC na EI, seria interessante a realização de outros métodos adicionais em amostras seriadas, para termos um parâmetro mais fidedigno da presença de CIC neste grupo de pacientes. Entretanto, apesar de todos estes fatores a análise estatística para a presença de CIC nos pacientes com EI demonstrou uma diferença significativa em relação aos grupos controles ($p=0.0069$).

6.3 - CORRELAÇÃO ENTRE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO , A PRESENÇA DE CIC A AS MANIFESTAÇÕES EXTRA-CARDÍACAS

Vários trabalhos foram realizados relacionando as manifestações extra-cardíacas da EI e a presença de CIC. Bayer et al (1976) verificaram que a presença de artrite(34%), esplenomegalia(10%) glomerulonefrite(7%) em 29 pacientes com EI estavam relacionadas com a presença de CIC. Cabane (1979) estudando 66 pacientes com EI verificou a presença de CIC em 92% dos pacientes com manifestações cutâneas, em 80% com artralgia e em 78% com nefropatia. Kauffman et al (1981) demonstraram uma correlação entre a presença de manifestação renal e vasculite cutânea e as dosagens de CIC. McKenzie et al (1980) fizeram um trabalho bastante abrangente envolvendo dosagens de CIC por três métodos, várias coletas, comprovação com estudos de biópsia por imunofluorescência e verificaram uma relação entre a presença de CIC e o comprometimento renal, músculo-esquelético e cutâneo.

Uma maior frequência de CIC no presente estudo foi observada nos pacientes com esplenomegalia (50%) e comprometimento pulmonar (42%). Os pacientes com manifestação renal apresentaram uma positividade de 33% de CIC e com alterações do S.N.C 20%.

Entre os pacientes que apresentaram mais de uma manifestação extra-cardíaca, 42% apresentaram CIC positivo e os níveis de C3d, TCC, e VC nestes pacientes mostraram-se aumentados em relação ao grupo com apenas um órgão comprometido porém a análise estatística não mostrou uma diferença significativa. Os pacientes com comprometimento pulmonar apresentaram níveis aumentados de ativação do complemento sendo os níveis de C3d significativamente aumentados ($p=0.026$) em relação ao grupo sem manifestação pulmonar.

As manifestações pulmonares geralmente são associadas à infecções do lado direito ocorrendo mais frequentemente em indivíduos usuários de drogas endovenosas. Em dependentes de heroína a EI pode ter como manifestação maior o comprometimento pulmonar [Heffner,1979]. Entre os 7 pacientes deste estudo que tinham comprometimento pulmonar 4 deles envolviam a valva tricúspide.

Com relação à elevada ativação do complemento nestes indivíduos, estudos tem demonstrado que o complemento tem um papel importante na fisiopatologia da síndrome da angústia respiratório (SARA) do adulto [Rabinovici et al,1992] e que pacientes sépticos com SARA tem maiores níveis de ativação do complemento [Gardinali et al, 1992]. É possível que este fato esteja relacionado com a capacidade de produção dos componentes do complemento pelas próprias células pulmonares como pneumócitos

II e fibroblastos pulmonares [Rothman et al,1989], além de que mecanismos locais possam intensificar a sua ativação.

Os estudos renais em pacientes com EI tem o problema de subestimar sua incidência quando utilizam critérios clínicos mais rígidos para o seu diagnóstico, como o comprometimento da função renal, pois lesões leves e sub-clínicas não são consideradas. Por outro lado os estudos que utilizam as alterações de sedimento urinário, tendem a superestimar esta incidência por abrangerem pacientes com outros tipos de lesões renais que não por complexos imunes. Já os estudos imunopatológicos, também apresentam problemas, pois algumas lesões já podem estar resolvidas nos casos de biópsias ou das necrópsias [Neugarten e Baldwin,1984].

No atual trabalho também tivemos dificuldades em definir qual o critério a ser utilizado para a freqüência da lesão renal, já que não foram realizadas biópsias renais. Decidimos utilizar os níveis de creatinina como um critério de comprometimento renal, e não a alteração do sedimento urinário pelo fato deste último teste não apresentar as informações necessárias para comprovar o comprometimento renal. Portanto, a incidência da manifestação renal aqui pode ter sido subestimada por um lado por ter apenas valorizado os níveis de creatinina e superestimado por outro, devido a possível inclusão de pacientes com prováveis lesões renais de outra etiologia como as causadas pela antibioticoterapia.

Embora existam várias evidências de hipocomplementemia na EI com comprometimento renal, no presente estudo não houve um aumento estatisticamente significativo da ativação do complemento nos pacientes com alteração de creatinina.

A presença de CIC também foi correlacionada com manifestações músculo esqueléticas, como artrite e artralgia [Bayer et al,1976; Heffner,1979; Thomas et al,1984; Doube e Calin,1988]. Neste estudo apenas 2 pacientes apresentaram manifestação musculo-esquelética e nenhum teve CIC positivo mas apresentaram níveis elevados de C1rs-C1inh e C3bBbP indicando ativação pelas duas vias do complemento.

A esplenomegalia ocorre em 23% a 57% dos pacientes com EI, sendo que os infartos esplênicos resultantes da embolia arterial são a causa principal de esplenomegalia [Heffner,1979]. No presente estudo observamos esplenomegalia em 30% dos pacientes, sendo que estes não apresentaram níveis aumentados de ativação do complemento em relação ao grupo sem esta manifestação. Três (50%) destes pacientes apresentaram CIC positivo.

Com relação as manifestações neurológicas, 5 (25%) pacientes tiveram quadro de acidente vascular cerebral embólico, não apresentando níveis aumentados de ativação do complemento e de CIC, sendo estes resultados compatíveis com a origem embólica e não imunológica desta manifestação.

Os achados histopatológicos de biópsias de nódulos de Osler demonstrando a presença de vasculite necrotizante tem levado muitos autores a considerá-las também como uma complicação de origem imunológica. Cabane et al(1979) encontrou uma correlação entre a presença de CIC e as lesões cutâneas. Entre os pacientes que foram estudados, somente um apresentou lesões de pele representada por nódulos de Osler, o qual teve níveis elevados de ativação do complemento mas CIC negativo.

Os achados de que os pacientes que evoluíram com mais de uma manifestação extra-cardíaca apresentaram níveis aumentados de CIC, C3d, TCC e VC, em conjunto com os achados pulmonares, indicam que estes marcadores podem estar envolvidos no mecanismo de lesão tecidual de outros órgãos na EI.

Pelo fato de que no presente estudo foram avaliadas apenas uma amostra sangüínea de cada paciente, e de que não foram realizadas biópsias de nenhum órgão aparentemente comprometido, uma conclusão mais precisa sobre as manifestações extra-cardíacas e sua correlação temporal, com a presença de CIC e ativação do complemento fica prejudicada.

6.4 - PRESENÇA E TIPO DE AGENTE ETIOLÓGICO , CIC E ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.

Observou-se uma correlação positiva entre os casos com hemocultura positiva, independente da bactéria identificada, e a presença de CIC. Entre os 11 pacientes que apresentaram hemoculturas positivas, 7 (63.6%) tiveram CIC positivo em comparação nenhum no grupo com hemoculturas negativas, teve CIC positivo, não sendo possível a análise estatística devido ao pequeno número da amostra. Este fato foi também observado por Jayapal et al(1989) e Maisch (1983) que encontraram valores positivos de CIC com maior freqüência nos pacientes com hemoculturas positivas, corroborando com a idéia de que na EI ocorra um estímulo antigênico contínuo levando a formação de CIC. Não observamos porém, nenhuma relação entre a presença de CIC e o

tipo de bactéria isolada, como relatado também por Kerr et al (1986).

Os pacientes com hemoculturas positivas apresentaram evidências de ativação do complemento somente pela via clássica, corroborando com o conceito da ativação do complemento mediada por complexos imunes na EI.

Os pacientes com EI por *Staphylococcus aureus* (36%) apresentaram níveis aumentados de ativação do complemento em relação ao outro grupo de bactérias. Devido ao pequeno número da amostra não foi possível fazer a análise estatística destes dados.

O'Connor et al (1978) encontrou níveis baixos de C3 em pacientes com EI por *Staphylococcus aureus* sugerindo que estes microorganismos ativassem a via alternativa do complemento. No presente trabalho 3 dos 4 pacientes com EI por *S.aureus* apresentaram níveis baixos de C3 e dois de C4 porém não foi evidenciada ativação da via alternativa.

Estes resultados indicando uma maior ativação do complemento pelo *S.aureus* quando comparado com as outras bactérias podem estar relacionados à diferente capacidade das bactérias em ativar o complemento, dependendo provavelmente da constituição de sua parede celular [Law e Reid, 1988] .

6.5 - TEMPO DE EVOLUÇÃO PRÉVIO AO INTERNAMENTO, EVOLUÇÃO FAVORÁVEL OU DESFAVORÁVEL , CIC E ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

Os estudos de Bayer (1976), Kauffman (1981) e Deck (1988) demonstraram correlação entre o tempo de evolução prolongada e a presença de CIC. Cabane em 1979 entretanto, estudando 66 pacientes com EI não verificou relação entre o tempo de evolução pré-internamento e a presença de CIC, porém os pacientes que apresentaram boa resposta terapêutica tiveram queda dos níveis de CIC. Este resultado também foi encontrado por Bayer no mesmo ano em estudo experimental[Bayer et al,1979].

No atual estudo verificou-se que os pacientes com evolução superior a 4 semanas apresentaram valores aumentados de CIC. Sendo que a presença de CIC foi positiva em 44% dos pacientes com mais de 4 semanas de evolução e em 25% dos pacientes com evolução aguda.

A ativação do complemento por outro lado mostrou-se aumentada no grupo com evolução inferior à 4 semanas. A análise estatística porém não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Outros autores tem relatado um estado de hipocomplementemia na fase inicial da EI [Bayer et al,1976; Maisch et al,1984]. Estes achados podem estar relacionados com o fato do complemento ser um reagente da fase aguda da infecção, cuja ação está mais exacerbada na fase inicial da doença.

Em relação à mortalidade, entre os 20 pacientes estudados 6 (30%) evoluíram com óbito. Os níveis médios de CIC, C3d e VC apresentaram-se aumentados neste grupo de pacientes em comparação com o grupo que teve boa evolução. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa para os valores de C3d ($p=0.0196$). Gardinali et al[1992] estudando pacientes sépticos também encontrou níveis superiores de ativação do complemento nos indivíduos que foram à óbito.

Estes resultados sugerem que o C3d pode ser um marcador de pior prognóstico na EI e corroboram com prévios estudos [Gardinali et al,1992] que demonstraram que a ativação do complemento pode estar relacionada com a gravidade da doença.

7 - CONCLUSÕES.

1 - Os pacientes com EI apresentaram níveis significativamente aumentados de ativação do complemento em vários níveis da cascata, quando comparados aos controles normais e valvares (C3d $p=0.000015$ e $p=0.000035$, C3a des Arg $p=0.0004$ e $p=0.029$, TCC $p=0.0004$ e $p=0.0135$ e C1rs-C1inh $p=0.000025$ e $p=0.000069$ respectivamente), C3d e C1rs-C1inh mostraram-se como os marcadores de maior sensibilidade na determinação da ativação do complemento na EI.

2 - Os pacientes com EI apresentaram uma frequência significativamente aumentada de CIC, pela técnica de ELISA anti-C3 em relação aos controles normais e valvares ($p=0.005$ e $p=0.0069$ respectivamente). Os níveis de CIC se relacionaram inversamente com os níveis de C4, sugerindo um consumo do complemento pela ativação da via clássica na EI.

3 - Os níveis de C3d e C3a desArg apresentaram-se aumentados nos pacientes com complicações pulmonares (C3d $p=0.0268$ e C3a desArg $p=0.0301$). O fragmento C3d também apresentou-se significante mente aumentado no grupo de pacientes que evoluíram para óbito ($p=0.0196$). Estes resultados sugerem que C3d e c3a desArg possam ser marcadores de lesão tecidual e gravidade da doença na EI.

4 - Todos os pacientes apresentaram ativação aumentada da via clássica avaliada através do complexo C1rs-C1inh ($p=0.000025$),

indicando que a ativação do complemento na EI é mediada essencialmente pela via clássica.

5 - Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os CIC e a ativação do complemento desempenham um importante papel nos mecanismos imunopatológicos da EI e abrem perspectivas para novos estudos relacionados ao diagnóstico, atividade, gravidade e prognóstico da EI.

ANEXO 1

Critérios da Duke University para o diagnóstico de EI.

DEFINITIVO

1-Critério patológico

Microrganismos :demonstrados por cultura ou por análise histologica em vegetação,êmbolo séptico ou abscesso cardíaco ou

Lesões patológicas:vegetação ou abscesso cardíaco confirma por análise histológica demonstrando endocardite ativa.

2-Critério clinico

Usando definições específicas:

A-Dois critério maiores

B-Um critério maior e três menores

C-Cinco critérios menores

POSSIVEL

Achados consistentes com endocardite infecciosa que não se classificam nos critérios Definitivo ou Rejeitado.

REJEITADO

Diagnóstico alternativo sólido

Resolução do quadro com 4 dias ou menos de antibioticoterapia

Nenhuma evidência de endocardite infecciosa na cirurgia ou necropsia com antibioticoterapia por quadro dias ou menos.

Quadro 2-Definição dos critério da Duke University para o diagnóstico de endocardite infecciosa.

CRITÉRIOS MAIORES

Hemocultura positiva

Microrganismos típicos para endocardite infecciosa em duas amostras separadas:

-Streptococcus viridans,S.bovis do grupo HACEK

ou

-Staphylococcus aureus ou enterococos comunitários,em ausência de oco primário

ou

-Hemocultura persistentemente positiva, definida como como microrganismo compatível com endocardite infecciosa isolado a partir de:

-amostras sanguíneas colhidas em intervalos de 12 hs

ou

-todas de 3, ou maioria de 4 ou mais amostras sanguíneas separadas, com intervalo de pelo menos uma hora entre a primeira e a última colheita.

Evidência de envolvimento endocárdico

Ecocardiograma positivo para endocardite infecciosa:

-massa cardíaca oscilante em valva ou estruturas de su porte, ou em trajeto de jato regurgitante,ou em material implantado, e ausência de explicação anatômica alternativa.

ou

-abscesso

ou

-nova deiscência parcial de prótese

Nova regurgitação valvar(aumento ou modificação em sopro preexistente não expressivo)

CRITÉRIOS MENORES

Predisposição: condição cardíaca ou vício em droga venosa

Febre: maior ou igual a 38 graus centígrados

Fenômeno vascular: embolia em grande artéria, infarto pulmonar séptico, aneurisma micótico, hemorragia intracraniana, hemorragia conjuntival, lesão de Janeway.

Fenômeno imunitário: glomerulonefrite, nódulo de Osler, mancha de Roth, fator reumatóide.

Evidência microbiológica: hemocultura positiva mas sem preencher os critérios maiores ou evidência sorológica de infecção ativa com microrganismo compatível com EI.

Ecocardiograma compatível com endocardite mas sem preencher os critérios maiores.

Durack et al ,1994.

ANEXO 2 - LISTA DOS PACIENTES UTILIZADOS NO ESTUDO

REGISTRO	IDADE E	DATA DE	DATA DA COLETA
	SEXO	INTERNAMENTO	
1266138-0	48 ANOS M	21/05/1993	28/05/1993
1342946-4	53 ANOS M	29/04/1994	11/05/1994
1285749-7	25 ANOS M	16/08/1993	23/04/1993
1252465-0	76 ANOS M	26/03/1993	02/04/1993
0153556-0	56 ANOS F	17/01/1995	25/01/1995
0348859-4	39 ANOS F	30/12/1993	09/01/1994
652495-8	43 ANOS M	05/09/1993	10/09/1993
1102969-8	27 ANOS M	06/01/1994	23/01/1994
12222790-6	29 ANOS F	22/11/1992	22/11/1992
1224262-0	30 ANOS M	01/12/1993	03/12/1993
1373345-7	34 ANOS M	21/01/1995	24/01/1995
0849667-6	34 ANOS M	10/04/1994	15/04/1994
1347505-9	15 ANOS F	09/05/1994	16/05/1994
1272068-8	31 ANOS F	25/10/1993	29/10/1993
1306190-4	24 ANOS M	12/11/1993	22/11/1993
1397052-1	33 ANOS M	28/05/1995	28/05/1995
1336240-8	69 ANOS M	03/05/1995	07/05/1995
1267519-4	39 ANOS M	25/05/1993	28/05/1993
1217957-0	29 ANOS F	03/08/1993	09/08/1993
1407584-4	23 ANOS M	09/02/1995	14/02/1995

ANEXO 3 - Relação dos pacientes e Critérios Diagnósticos

PACIENTE	CRITERIOS Diagnósticos
L.J.M.	DOIS CRITÉRIOS MAIORES
M.M.M	Critério PATOLÓGICO
O.B.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES
D.R.O.	DOIS Critérios MAIORES
M.A.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES
J.P.	CRITÉRIO PATOLÓGICO
O.S.	DOIS Critérios MAIORES
A.C.M.	CRITÉRIO PATOLÓGICO
J.A.A.	CRITÉRIO PATOLÓGICO
L.G.	DOIS Critérios MAIORES
J.B.S.	DOIS Critérios MAIORES
M.I.D.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES
M.A.O.D.	DOIS Critérios MAIORES
J.C.S.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES
L.A.A.D.	DOIS Critérios MAIORES
R.M.	DOIS Critérios MAIORES
J.A.P.F.	5 Critérios MENORES
N.L.O.	DOIS Critérios MAIORES
L.S.C.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES
J.C.L.	UM CRITÉRIO MAIOR E 3 MENORES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, P.. Statistical Methods in Medical Research ,London-Blacwel, 1971.

ASHERSON, R. A. ; TICKLY, M. ; STAUB, H. ; WILMSHURST, P. T. ;
COLDART, D. J ; KHAMASHITA, M. HUGHES, G. R. V.. Infective endocarditis,
rheumoid factor, and anticardiolipin antibodies. Annals of
Rheumatic Diseases, Vol. 49, P. 107-108, 1990.

BADDOUR, L. M. ; CHRISTENSEN, G. D. ; LOWRANCE, J. H. ; SIMPSON, W. A.. Pathogen
esis of Experimental Endocarditis. Reviews of Infectious
Diseases, Vol. 11, N. 3, P. 452-463, May-June, 1989.

BARNETT, E. V. ; KNUTSON, D. W. ; ABRASS, C. K. ; CHIA, D. S. ; YOUNG, L. S. ; LIEBLI
NG, M. R.. Circulating Immune Complexes: Their
Immunochemistry, Detection ,and Importance. Annals of Internal
Medicine, Vol. 91, P. 430-440, 1979.

BARTMAN, F. C. ; SOARES, J. F.. Métodos Estatísticos em Medicina e
Biologia - 14 colóquio Brasileiro de matemática - IMPA - Rio de
Janeiro.

BAYER, A. S. ; THEOPHILOPOULOS, A. N. ; DIXON, F. J. ; GUZE, L. B.. Circulating
immune complexes in Infective Endocarditis. The New England
Journal of Medicine, Vol. 30, Dec, P. 1500-1505, 1976.

BAYER, A. S. ; THEOPHILOPOULOS, A. S. ; EISENBERG, R. ; FRIEDMAN, S. G. ; GUZE, L. B. . Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-like Syndrome Associated With Infective Endocarditis. A Possible Immune Complex Disorder. *Jama*, Vol. 238, N. 5, P. 408-410, Aug, 1977.

BAYER , A. S. ; THEOFILOPOULOS, A. N. ; TILLMAN, D. B. ; DIXON, K. J. ; GUZE, L. B. . tion of Endocarditic and Nonendocarditic Septicemias. *The American Journal of Medicine* , Vol. 66, P. 58-62, Jan. 1979.

BAYER, A. S. ; THEOPHILOPOULOS, A. N. ; DIXON, F. J. ; GUZE, L. B. . Circulating Immune complexes in Experimental Endocarditis. A monitor of therapeutic efficacy. *The Jornal of Infectious Diseases*, Vol. 139, N. 1, Jan, 1979.

BAYER, A. S. ; THEOPHILOPOULOS, A. N. . Immunopathogenetic Aspects of Infective Endocarditis. *Chest*, Vol. 97, N. 1, Jan, P. 204-210, 1990.

BAYER, A. S. ; NORMAN, D. C. . Valve site-specific pathogenetic differences between right-sided and left-sided bacterial endocarditis. *Chest*, Vol. 98, P. 200-5, 1990.

BAYER , A. S. ; THEOFILOPOULOS, A. N. . Immunopathogenetic Aspects of Infective Endocarditis. *Chest*, Vol. 97, P. 204-212, Jan. 1990.

BESNIER, J. M. ; CHOUTET, P. . Medical treatment of infecive endocarditis: general principles. *European Heart Journal*, Vol. 16, P. 72-74, 1995.

BIESECKER, G. ; LAVIN, L. , ZISKIND, M. ; KOFFLER, D. . Cutaneous localization of the membrane attack complex in discoid and systemic lupus erythematosus. N.Engl.J.Med., Vol.306,P.264-270,1982.

BISHOP, N.A. ; WELCH, T.R. ; BEISCHEL, L.S. . C4b deficiency: A risk factor for bacteremia with encapsulated organisms. The Journal of Infectious Diseases, Vol.162, P.248-250, 1990.

BOULTON-JONES, J.M. ; SISSONS, J.G.P. ; EVANS, D.J. ; PETERS, D.K. . Renal Lesions of Subacute Infective Endocarditis. British Medical Journal, Vol.6, P.11-14, April 1974.

BRANDSLUND, I. ; SIERSTED, H.C. ; SVEHAG, S.E. ; TEISNER, B. . Double-decker rocket immunoelectrophoresis for direct quantification of complement C3 split products with C3d specificities in plasma. J.Immunol.Methods, Vol.44, P.63-71, 1981.

BROWN, B. ; HOLLANDER, M. . Statistics, a Biomedical Introduction, New York , Wiley, 1977.

CABANE, J. ; GODEAU, P. ; HERRERMAN, G. ; ACAR, J. ; DIGEON, M. ; BACH, J.F. . Fate of Circulating Immune complexes in Infective Endocarditis. The American Journal of Medicine, Vol.66, Feb, P.277-282, 1979.

CARSON, D.A. ; BAYER, A.S. ; EISENBERG, R.A. ; LAWRENCE, S. ; THEOFILOPOULOS, A. . IgG rheumatoid factor in subacute bacterial endocarditis: relationship to IgM rheumatoid factor and

circulating immune complexes. Clin. Exp. Immunol., Vol. 31, P. 100-103, 1978.

CAT, R.; ROSARIO, N. A.; TABORDA DE MESSIAS, I.; RESENER, T. D.; KIRSCHFINK, M.. Evaluation of complement activation in premature newborn infants with hyaline membrane disease. Eur. J. Pediatr., Vol. 152, P. 205-208, 1993.

CHARLESWORTH, J. A.; PEAKE, P. W.; GOLDING, J.; PUSSEL, B. A.; TIMMERMAN, V.; WICKS, I.; WAKEFIELD, D.. The metabolism of C3 and C4 in patients with immune complexes and normal complement levels. Aust. N. Z. J. Med, Vol. 19, P. 118-124, 1989.

CHASTRE, J.; TROUILLET, J. L.. Early infective endocarditis on prosthetic valves. European Heart Journal, Vol. 16, P. 32-38, 1995.

CHOUTET, P.; BESNIER, J. M.. Medical treatment of infective endocarditis: general principles. European Heart Journal, Vol. 16, P. 72-74, 1995.

COYLE, P. V.; THOMPSON, J.; ADGOY, A. A. J.; RUTHER, D. A.; FAREY, A.; MACNEILL, T. A.; CONNOLLY, J. H.. Changes in Circulating immune complexes concentrations and antibody titres during treatment of Q fever endocarditis. J. Clin. Pathol., Vol. 38, P. 743-748, 1985.

DECK, C. R.; GUARDA, E. S.; BIANCHIC, C.; ORTEGA, C. R.; GRISANTI, M. M.; VEGA, C.; MELENDEZ, T.. Complejos Inmunes Circulantes en Endocardite Infecciosa. Rev. Med. Chile, Vol. 116, P. 1101-1104, 1988. (17)

DOUBE, A.; CALI, A.. Bacterial endocarditis presenting as acute monoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, Vol. 47, P. 598-599, 1988.

DURACK, D. T.; LUKES, A. S.; BRIGHT, D. K.. The Duke Endocarditis Service. New criteria for the diagnosis of infective endocarditis: Utilization of specific echocardiographic findings. *Am. J. Med.*, Vol. 96, P. 200-9, 1994.

EISENBERG, R. A.; THEOFILOPOULOS, A. N.; DIXON, F. J.. Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes. *The Journal of Immunology*, Vol. 118, N. 4, P. 1428-1434, April 1977.

ENDO, M. D.; CORMAN, L. C.; PANUSH, R. S.. Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes. *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, N. 4, July, 1985.

ENRIQUEZ, M. M.; REYES, P. A.. Estudios Immunologicos en Fiebre Reumatica activa y Endocarditis Infecciosa. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, Vol. 54, P. 153-158, 1984.

FEARON, D. T.. Complement, C Receptors, and Immune Complex Disease. *Hospital Practice*, Vol. 15, P. 63-72, Aug. 1988.

FUGIGAKI, Y.; BATSFORD, S. R.; SWERMANN, D. B.; VOGT, A.. Complement System promoter transfer of immune complex across glomerular filtration barrier. *Laboratory Investigation*, Vol. 72, N. 1, P. 25-33, 1995.

GALLO, G. R.. Elution Studies in Kidneys with Linear Deposition of Immunoglobulin in Glomeruli. *Vol. 61, N. 3, P. 377-385, Dec. 1970.*

GARDINALE, M. ; PODALINO, P. ; VESCONI, . ; CALCAGNO, A . ; CIAPPELANO, ;
 CONCIATO, L. ; CHIARA, O. ; AGOSTINI, A ; NESPOLI, A. . Complement activation
 and polymorphonuclear Leukocyte Elastase in Sepsis. Arch. Surg., Vol
 127, October, 1992.

GARNIER, J. L. ; TOURAINE, J. L. ; COLON, S. . Immunology of Infective
 Endocarditis. European Heart Journal, N. 5, P. 3-9, 1984.

GAWRYL, A. S. ; CHUDWIN, D. S. ; LANGLOIS, P. F. ; LINT, T. F. . The terminal
 complement complex, C5b-9. A marker of disease activity in patients
 with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and
 Rheumatism, Vol. 31, N. 2, Feb, 1988.

GEVIGNEY, G. ; POP, C. ; DELAHAYE, J. P. . The risk of infective
 endocarditis after cardiac surgical and interventional
 procedures. European Heart Journal , Vol. 16, P. 7-14, 1993.

GLOVSKY, M. . Aplication of Complement determinations in human
 disease. Annals of Allergy, California, Vol. 72, June, P. 477-
 489, 1994. Revisao

GRIFFIN, M. R. ; WILSON, W. R. ; EDWARDS, W. D. . Infective
 endocarditis, Olmsted County, Minnesota, 1950 through
 1981. JAMA, Vol. 254, P. 1199-1202, 1985.

GRINBERG, M. ; DÉCOURT, L. V. . Princípios de Osler, critérios de Jones e
 métodos propedêuticos modernos no diagnóstico da endocardite

infecciosa.Rev.Soc.Cardiol Estado de São Paulo,Vol.5,N.4,Jul/Ago 1995.

GUTMAN,R.A.;STRIKER,G.E.;GUILILAND,B.C.;CUTLER,R.E..The immune complexes glomerulonephritis of bacterial endocarditis.Medicine(Blatimore),Vol.51,P.1-25,1972.

HEFFNER,J.E..Extracardiac Manifestations of bacterial endocarditis.West J.Med.,Vol.131,P.85-91,Aug.1979.

HOIBY,N.;DORING,G.;SCHIOTZ,P.O..The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections .Ann.Rev.Microbiolo,Vol.40,P.29-53,1986.

HORSTKOTTE,D.;PIPER,C.;NIEHUES,R.;WIEMER,M.;SCHULTHEISS,H..Late prosthetic valve endocarditis.European Heart Journal,Vol.16,P.39-47,1995.

INMAN,R.D.;REDECHA,P.B.;KNECHTLE,S.J.;SCHNED,E.S.;RIJN,I.V.SHRIST IAN,C.L..Identification of bacterial antigens in circulating immune complexes of infective endocarditis.J.Clin.Invest.,Vol.70,P.271-280,Aug.1982.

INMAN,R.D.;ROSEMBERG,R.A.;REDECHA,P.B.;CHRISTIAN,L..Characteriza tion of sequential Immune complexes in Infective Endocarditis By Western Blot analysis.The Journal of Immunology,Vol.133,N.1,July,1984.

JARVIS, J.N.; POUSAK, T.; KRENZ, M.; IOBIDZE, M.; TAYLOR, H.. Complement Activation and Immune Complexes in Juvenile Rheumatoid Arthritis. The Journal of Rheumatology, Vol. 20, N. 1, 1993.

JARVIS, J.N.; TAYLOR, H.; IOBIDZE, M.; KRENZ, M.. Complement Activation and Immune Complexes in Children with Polyarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis: A longitudinal Study. The Journal of Rheumatology, Vol. 21, N. 6, P. 1124-1127, 1994.

JAYAPAL, N.; SHANMUGASUNDARAM, N.; THOMAS, P.A.; THOMAS, P.R.T.; THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN, S.. A simple method to quantitate circulating immune complexes in different diseases. Indian J. Pathol. Microbiol., Vol. 32, N. 1, P. 33-39, 1989.

JOHNSON, C.M.. Adherence Events in Pathogenesis of Infective Endocarditis. Infectious Diseases Clinics of North America, Vol. 7, N. 1, P. 21-36, 1993.

JORGE, S.C.. Complicações da endocardite infecciosa. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo, Vol. 5, N. 4, P. 408-417, 1995.

KAUFFMAN, R.H.; THOMPSON, J.; VALENTIJN, R.M.; DAHA, M.R.; VANES, L.A.. The Clinical Implications and Pathogenetic Significance of Circulating Immune Complexes in Infective Endocarditis. The American Journal of Medicine, Vol. 71, P. 17-25, 1981.

KEE, J.B.; CAPNER, P.M.; MOMBRAY, J.F.. Nature of Circulating Immune Complexes in Infective Endocarditis. J.Clin.Pathol., Vol.33, P.653-659, 1980.

KERR, M.A.; WILTON, E.; NAAMA, J.K.; WHALEY, K.. Circulating immune complexes associated with decreased complement-mediated inhibition of immune precipitation in sera from patients with bacterial endocarditis. Clin.Exp.Immunol., Vol.63, P.359-366, 1986.

KESLIN, M.H.; MESSNER, R.P.; WILLIAMS, R.C.; ALBUQUERQUE, N.M..
Glomerulonephritis with Subacute Bacterial
Endocarditis. Immunofluorescent Studies. Arch Intern.
Med., Vol.132, P.578-581, Oct.1973.

KILGALLON, W.; AMLOT, P.L.; WILLIAMS, B.D.. Anti-C1q column: ligand specific purification of immune complexes from human serum or plasma. Analysis of the interaction between C1q and immune complexes. Clin.Exp.Immunol., Vol.48, P.705-714, 1982.

KINOSHITA, T.. Biology of Complement. Immunol.Today, Vol.12, P.291-292, 1991.

LACHMANN, P.J.. The control of homologous
lysis. Immunol.Today, Vol.12, N.9, P.312-45, 1991.

LARSSON, A.; JONSSON, L.; SJOQUIST, J.. Determination of circulating immune complexes by chicken anti-human C3 and anti-human C1q microELISA. Journal of Immunological Methods, Vol.113, P.93-99, 1988.

LAW, S.K.A.; REID, K.B.M.. Complement. III Series. England: IRL Press Limited, 1988.

LEVINSON, S.S.; GOLDMAN, J.O. Evaluation of Anti-C1q Capture Assay for detecting Circulating Immune Complexes and Comparison with Polyethylene Glycol-Immunoglobulin G, C1q-Binding, and Raji Cell Methods. Journal of Clinical Microbiology, P.1567-1569, Aug. 1987.

LEVY, R.L.; HONG, R.. The Immune Nature of Subacute Bacterial Endocarditis Nephritis. The American Journal of Medicine Vol. 54, P. 645-652, 1973.

LIDA, H. ; MIZUMURA, Y. ; URAOKA, T. ; TAKATA, M. ; SUGIMOTO, T. ; MIWA, A. ;
YAMAGISHI, T. . Membranous Glomerulonephritis Associated with
Enterococcal Endocarditis. Nephron, Vol. 40, P. 88-90, 1985.

LISZEWSKI, M. K. ; ATKINSON, J. P. . The Complement System. Fundamental
Immunology. Third Edition, Raven Press, Ltd, New York, 1993.

LUKES, A. S. ; BRIGHT, D. K. ; DURACK, D. T. . Diagnosis of Infective
Endocarditis. Infectious Diseases Clinics of North
America, Vol. 7, N. 1, P. 1-8, March 1993.

MCDUGAL, J. S. ; HUBBARD, M. ; STROBEL, P. L. ; McDUFFIE, F. C. . Comparison of
five assays for immune complexes in the rheumatic
diseases. Performance characteristics of the
assays. J. Lab. Clin. Med. , Vol. 100, P. 705-719, 1982.

McDOUGAL, J. S. ; McDUFFIE, F. C. . Immune complexes in man: detection and
clinical significance. Advances in Clinical Chemistry, Vol. 24, P. 1-
60, 1985.

McKENZIE, P. E. ; HAWKE, D. ; WOODROFFE, A. J. ; THOMPSON, A. J. ; SEYMOUR, A. E. ; C
LARKSON, A. R. . Serum and tissue immune complexes in infective
endocarditis. J. Clin. Immunol. , Vol. 4, P. 125-132, 1980.

MAISCH, B. ; MAYER, E. ; SCHUBERT, U. ; BREG, P. A. ; KOCHSIEK, K. . Immune
reactions in infective endocarditis. II. Relevance of circulating
immune complexes, serum inhibition factors, lymphocytotoxic

reactions, and antibody-dependent cellular cytotoxicity against cardiac target cells. Am.Heart J.,Vol.106,N.2,Aug.,1983.

MANSUR,A.J..Endocardite Infecciosa. In: SOCESP- Sociedade de Cardiologia do Estado de Sao Paulo ,Cardiologia -Atualizacao e Reciclagem : Livraria Atheneu Editora,P.455-464,1994.

MAROGER,L.M.;SRAER,J.D.;HERRERMAN,G.;GODEAU,P..Kidney in Subacute Endocarditis,Pathological and Immunofluorescence Findings.Arch.Path.,Vol.94,P.205-213,Sept.1972.

McGEE,J.O'D.;ISAACSON,P.G.;WRIGHT,N.A..Oxford Textbook of Pathology.Vol.2a,New York.Oxford University Press,1992.

MENDES,C.M.F.;ARAUJO,E.M.P.A.;MIMICA,I..O isolamento de agente etiológico em hemoculturas.Rev.Soc.Cardiol.Estado de São Paulo,Vol.5,N.4,Jul/Ago 1995.

MESSIAS,I.J.T.;CHIU,Y.Y.;NISHIHARA,R.M..Complement terminal complex proved to be the most sensitive marker in assesing disease activity in brazilian SLE patients.Não publicado.

MICHEL,P.L.;ACAR,J..Native cardiac disease predisposing to infective endocarditis.European Heart Jornal,Vol.16,P.2-6,1995.

MILLER,G.W.;NUSSENZWEIG,V..Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,Vol.72,P.418-422,Feb.1975.

MOLLNES, T.E.; LEA, T.; FROLAND, S.S.; HARBOE, M.. Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme - linked immunosorbent against a neoantigen of the complex. Scan. J. Immunol., Vol. 22, P. 197-202, 1985.

MORGAN, B.P.; WALPORT, M.J.; Complement deficiency and disease. Immunology Today, Vol. 12, N. 9, P. 301-306, 1991.

NEUGARTEN, J.; BALDWIN, D.S.. Glomerulonephritis in Bacterial Endocarditis. The American Journal of Medicine, Vol. 77, P. 297-304, Aug. 1984.

O'CONNORS, D.T.; WEISMAN, M.H.; FIERES, J.. Activation of Alternate Complement Pathway in Staph. Aureus Infective Endocarditis and its relationship to Thrombocytopenia, Coagulation abnormalities and Acute Glomerulonephritis. Clin. Exp. Immunol., Vol. 34, P. 179-187, 1978.

PACCAUD, J.P.; SCHIFFERLI, J.A.. Complement and Immune Complex Nephritis. Am. J. Nephrol., Vol. 9, P. 2-6, 1989.

PHAIR, J.P.; CLARKE, J.. Immunology of Infective Endocarditis. Progress in Cardiovascular Diseases, Vol. XXII, N. 3, 1979.

PEREIRA, A.B.; THEOFILOPOULOS, A.N.; DIXON, F.J.. Detection and partial characterization of circulating immune complexes with solid-phase anti-C3. The Journal of Immunology, Vol. 125, N. 2, P. 763-770, Aug. 1980.

PERTSCHUCK, L. P. ; WODA, B. A. ; VULETIN, J. C. ; BRIGATI, D. J. ; SORIANO, C. B. ; NICASTRI, A. D. . Glomerulonephritis Due to Staphylococcus aureus Antigen. A. J. C. P., Vol. 65, P. 301-307, March 1976.

PETELENZ, T. ; KOSIEL, M. ; FRIEDEK, T. PETELENZ, S ; TREZECIAK, J. ; DRAZKIEWICZ ; TUSTANOVSKI, E. ; NOLEWAJKA, E. ; ELERTOWICZ, M. Determination of immune complexes in patients with acquired valvular heart disease. Cor Vasa, Vol. 30, N. 4, P. 263-271, 1988. (15)

POCIDALO, M. A. ; GIBERT, G. ; VERROUST, P. ; GENITEAU, M. ADAM, C. ; MADEC, Y. ; GAUDEBOUT, C. ; MOREL-MAROGER, L. . Circulating immune complexes and severe sepsis: duration of infection as the main determinant. Clin. Exp. Immunol., Vol. 47, P. 513-519, 1982.

PORCEL, J. M. ; VERGANI, D. . El Sistema Complemento: Una fascinante cascada biologica. Medicina Clinica. Barcelona, Vol. 100, N. 10, P. 428-435, 1993. Revisao

RABINOVICI, R. ; YEH, C. G. ; HILLEGASS, L. M. ; GRISWOLD, D. E. ; DI MARTINO, M. J. ; VERNICK, J. ; FONG, K. L. ; FEUERSTEIN, G. . Role of complement in endotoxin/platelet-activation factor-induced lung injury. J. Immunol, Vol. 149, P. 1744-50, Sep. 1992.

RAMOS, M. C. . Patogênese das endocardites bacterianas. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo, Vol. 5, N. 4, P. 371-375, Jul/Ago 1995.

ROHMANN, S. ; ERBEL, R. ; MOHR-KAHALY, S. ; MEYER, J. . Use of transesophageal echocardiography in the diagnosis of abcess in

the infective endocarditis. European Heart Journal, Vol. 16, P. 54-62, 1995.

ROITT, I. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. . Immunologia. 2 ed. São Paulo: Editora Manole ltda, 1992.

ROITT, I. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. . Immunology. 3. ed. , 1993.

ROTHER, Klaus; TILL, Gerd O. The Complement System. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988.

ROTHMAN, B. L. ; MERROW, M. ; BAMBA, M. ; KENNEDY, T. ; KREUTZER, D. L. . Biosynthesis of third and fifth complement components by isolated human lung cells. Am. Rev. Respir. Dis, Vol. 139(1), P. 12-20, 1989.

ROVZAR, M. A. ; LOGAN, J. L. ; OGDEN, A. Z. ; GRAHAN, A. R. Immunosuppressive therapy and plasmapheresis in Rapidly Progressive Glomerulonephritis associated with Bacterial Endocarditis . American Journal of Kidney Diseases. Vol. VII, N. 5, P. 428-433, 1986.

SALAMA, A. ; HUGO, F. ; HEINRICH, D. ; HOGE, R. ; MULLER, R. ; KIEFEL, V. ; MUELLER, C. ; BHAKDI, S. . Deposition of terminal C5b-9 complement complexes on eritrocytes and leukocytes during cardiopulmonary bypass. The New England Journal of Medicine, Vol. 18, P. 108-112, Feb. 1988.

SCHIFFERLY, J. A. ; TAYLOR, R. P. . Physiological and Pathological aspects of Circulating Immune Complexes. Kidney International, Vol. 35, P. 993-1003, 1989.

SCHULZE, M. ; PRUCHNO, C. J. ; BURNS, M. ; BAKER, P. J. JOHNSON, R. J. ; CAUSER, W. G. . Glomerular C3c localization Indicates ongoing Immune deposit formation and complement activation in Experimental Glomerulonephritis. American Journal of Pathology, Vol. 142, N. 1, Jan. 1993.

SHEAGREN, J. N. ; TUAZON, C. U. ; GRIFFIN, C. ; PADMORE, N. . Rheumatoid Factor in Acute Bacterial Endocarditis. Arthritis and Rheumatism, Vol. 19, N. 5, Sept-Oct, 1976.

SHIVELY, B. K. . Infective Endocarditis. In: Diagnosis and Treatment in Cardiology. 1 ed. Albuquerque : Michael H. Crawford, 370-385, 1995.

SIELING, P. A. ; RIJN, I. U. . Evaluation of the immune response in protection against experimental *Streptococcus defectivus* endocarditis. J. Lab. Clin. Med, P. 402-409, May. 1991.

SON, W. J. ; BIJ, W. TEGZESS, A. M. ; ANEMA, J. ; GIESSEN, M. ; HEM, G. K. ; MARRINK, J. ; THE, T. H. . Complement Activation during an Active Cytomegalovirus Infection after Renal Transplantation: Due to Circulating Immune Complexes or Alternative Pathway Activation? Clinical Immunology and Immunopathology, Vol. 50, P. 109-121, 1989.

STECKELBERG, J. M. ; WILSON, W. R. . Risk factor for Infective Endocarditis. Infectious Disease Clinics of North America, Vol. 7, N. 1, March 1993.

TAKAHASHI, M. ; TACK, B. F. ; NUSSENZWEIG, V. . Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement: assembly of

factor B-dependent C3-convertase on the immune complexes. J. Exp. Med., vol. 145, P. 86-100, 1977.

TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, S.; BRADE, S.; NUSSENZWEIG, V.. Requirements for solubilization of immune aggregates by complement. The role of classical pathway. J. Clin. Invest., Vol. 62, P. 349-358, 1978.

THEOFILOPOULOS, A. N.; DIXON, F. J.. Immune Complexes in Human Diseases. A Review. American Association of Pathologists, Vol. 100, N. 2, P. 531-595, Aug. 1980.

THOMAS, J.; ALLAL, D.; BONToux; ROSSI, F.; POUPET, J. Y.; PETELALO, T.. Rheumatological Manifestations of Infective Endocarditis. Annals of Rheumatic Diseases, Vol. 43, P. 716-720, 1984.

THORIG, L.; DAHA, M. R.; EULDERINK, F.; KOOYBAUER, W.; THOMPSON, J.. Experimental Streptococcus sanguis endocarditis: immune complexes and renal involvement. Clin. Exp. Immunol., Vol. 40, P. 469-477, 1988.

TU, W. H.; SHEARN, M. A.; LEE, J. C.. Acute Glomerulonephritis in Acute Staphylococcal Endocarditis. Annals of Internal Medicine, Vol. 71, N. 2, P. 337-341, 1969.

WEISTEIN, L.. Endocardite Infecciosa. Em: BRAUNWALD, Eugene. Heart Disease : a text book of cardiovascular medicine. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. p. 1111-1149.

WILLIAMS, R. C.; KUNKEL, H. G.. Rheumatoid Factor, Complement, and Conglutinin Aberrations in patients with Subacute Bacterial

Endocarditis. Journal of Clinical Investigations
, Vol. 41, N. 3, P. 666-675, 1962.

WILLIAMS, L. W. ; BURKS, A. W. ; STEELE, R. W. . Complement: function and
clinical relevance. Annals of Allergy, Vol. 60, P. 293-302, April, 1988.

YIN, C. NG. ; PETERS, D. K. ; WALPORT, M. J. . Monoclonal Rheumatoid Factor-
IgG Immune Complexes . Poor fixation of Opsonic C4 and C3. Despite
efficient complement activation . Arthritis and Rheumatism,
Vol. 31, N. 1, Jan. 1988.

ZILOW, G. ; TURM, J. A. ; ROTHER, U. ; KIRSCHFINK, M. . Complement activation
and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult
respiratory distress Syndrome. Clin. Exp. Immunol. , Vol. 79, P. 151-
157, 1990.