KARINA RIBEIRO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA
IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA
C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Versão original

São Paulo
2014

KARINA RIBEIRO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA
IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA C3 DO
SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Karina Ribeiro da.

Investigação das bases moleculares da imunodeficiência primária da proteína C3 do sistema complemento humano / Karina Ribeiro da Silva.
— São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Lourdes Isaac.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Sistema complemento.

Versão do título para o inglês: Investigation of molecular basis of the primary immune deficiency C3 protein of the human complement system.

1. Sistema complemento 2. C3 3. Imunodeficiência 4. Deficiência de C3 5. Deleção de éxon 6. Mutação I. Isaac, Profa. Dra. Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0139/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Ribeiro da Silva.

Título da Dissertação Investigação das bases moleculares da imunodeficiência primária da proteína C3 do sistema complemento humano.

Orientador(a): Profa. Dra. Lourdes Isaac.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) Aprovado(a)

(☐) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PARECER 1080/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data APROVOU o projeto intitulado: "*Investigação das bases moleculares da imunodeficiência primária da proteína c3 do sistema complemento humano*" dos autores Profa. Dra. LOURDES ISAAC e aluna KARINA RIBERIO DA SILVA.

Cabe os Pesquisadores executantes elaborarem e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c,

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 10.10.2013.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A.ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, a sra Eliana Chagas por ter me dado a vida, pelo apoio e paciência desde o início da faculdade até hoje, e por todas as orações para que tudo desse certo. A minha irmã Flávia Regina por todo apoio, ao meu namorado Rosemberg de Jesus Farias que esteve ao meu lado nos momentos difíceis e me fez sorrir deixando as coisas mais fáceis, obrigada pela compreensão. Tenho um agradecimento especial á professora, escritora, palestrante, vizinha, amiga, madrinha e segunda mãe, sra Dora de Amarante Romariz por estar presente na minha família, e na minha vida desde meu nascimento, por me ajudar no pior momento da minha vida me estendendo a mão e colaborando ativamente na minha formação, sem sua ajuda seria impossível realizar esse sonho, saiba que nunca vou te esquecer e que reside eternamente em meu coração.

Gostaria de agradecer a Profa Dra Lourdes Isaac pela orientação e pela confiança no desenvolvimento desse trabalho, por dividir seu conhecimento e parte de sua vida na minha formação profissional, foram três anos dos quais nunca me esquecerei, muitos momentos bons e alguns momentos ruins que fizeram parte do meu crescimento individual, afinal nas adversidades é que aprendemos, se você não cai não aprende a levantar, certo!

Agradeço também a todos os colegas do laboratório de complemento, Adriana Patrícia Martinez Granado, Íris Arantes de Castro, Leandro Dantas Breda, Lorena Bavia, Marlene Pereira de Carvalho Florido, Mônica Marcela Castiblanco Valencia, Tatiana Rodrigues Fraga. Eu aprendi muito com todos e esse trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês que me ajudaram e estiveram ao meu lado.

Meus agradecimentos também a todos os demais professores do Instituto de Ciências e Biomédicas da USP, pelas aulas e discussões de trabalhos que auxiliaram no meu aprimoramento e desenvolvimento profissional.

Agradeço também a Luci Deise Navarro e ao Instituto de Química pelo sequenciamento das minhas amostras e rápida prontidão na entrega dos resultados.

Aos colegas de trabalho e amigos do Instituto Pasteur como Adriana Candido Rodrigues por ouvir meus desabafos, a Juliana Galera Castilho Kawai pelo ajuda no sequenciamento das amostras, a Andreia de Cássia Rodrigues da Silva pelas inúmeras trocas de horário para conclusão desse trabalho.

Agradeço também as agências Fapesp e CNPq pelo auxílio financeiro fornecido durante toda a execução deste projeto.

Mais uma vez, muito obrigada a todos!

“Quando seus esforços forem visto com indiferença,
lembre-se que o sol dá um espetáculo todas as manhãs
e muitos continuam dormindo”. Autoria desconhecida.

RESUMO

Silva KA. Investigação das bases moleculares da imunodeficiência primária da proteína C3 do Sistema Complemento Humano. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências e Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema complemento participa da imunidade natural e da imunidade adquirida. Este sistema pode ser ativado por três diferentes vias: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas, desencadeando uma cascata proteolítica que irá resultar na possível eliminação de microorganismos e, por sua vez, no restabelecimento da homeostasia do indivíduo. A proteína C3 possui um papel central participando das três vias deste sistema. Sua clivagem gera fragmentos que estão associados a várias funções biológicas como opsonização, quimiotaxia, anafilatoxinas, além da formação da C3-convertases, que amplificam a via de ativação efetora contra patógenos. A completa deficiência de C3 é rara, está comumente associada a repetidas infecções, ao desenvolvimento de doenças mediadas por imunocomplexos e glomerulonefrite. Neste trabalho nós investigamos as bases moleculares desta deficiência em uma paciente com histórico de consanguinidade. Nosso estudo identificou uma mutação genética responsável pela completa deleção do éxon 27, implicando na perda de 99 nucleotídeos (região 3450 até 3549 correspondente ao cDNA do C3). O sequenciamento do gene C3 da região 6690313 até 6690961 mostrou uma troca de nucleotídeos T por um C (T→C) na posição 6690626, causando a exclusão do éxon 27 e deficiência da proteína C3 do complemento humano nessa paciente. Também confirmamos o padrão de herança autossômica recessiva desta deficiência. Verificamos ainda que os fibroblastos da paciente estimulados com LPS por 24 h foram incapazes de secretar a proteína C3, o que nos leva a suspeitar que esta proteína mutante seja rapidamente degradada ainda dentro da célula, impedindo sua liberação para o meio extracelular.

Palavras-chave: Sistema Complemento. Deficiência de C3. Exclusão de éxon.

ABSTRACT

Silva KA. Investigation of molecular basis of the primary immune deficiency C3 protein of the human complement system. (Mestrado em Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências e Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The complement system participates in the natural immunity and acquired immunity. This system can be activated by three different pathways: the classical pathway, the alternative pathway and the lectin pathway, triggering a proteolytic cascade that will possibly result in the elimination of microorganisms and, in turn, in restoring the homeostasis of the individual. The C3 protein has a central role in the activation of all pathways. Its cleavage produces fragments that are associated with various biological functions such as opsonization, chemotaxis, and production of anaphylatoxins. In addition, the C3 participates in formation of C3 convertase of the alternative pathway which amplifies the activation of effector against pathogens. The complete C3 deficiency is rare and commonly associated with recurrent infections, development of diseases mediated by immune complexes and glomerulonephritis. In this work, we investigated the molecular basis of this deficiency in a patient family with a history of consanguinity. Our study has identified a genetic mutation responsible for the complete deletion of exon 27, resulting in the loss of 99 nucleotides (region 3450 to 3549 of the cDNA corresponding to C3). The sequencing of the C3 region 6690313 to 6690961 showed a T nucleotide exchange to C (T → C) at position 6690626 causing deletion of exon 27 leading to deficiency of the human complement protein C3 in this patient. We also confirmed the autosomal recessive pattern of this patient deficiency in the family. We observed that patient fibroblasts stimulated with LPS for 24 h were unable to secrete C3, which leads us to suspect that this protein is degraded within the cell preventing its release into the extracellular.

Keywords: Complement system. C3 deficiency. Exon skipping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das três vias de ativação do sistema do complemento e a formação do MAC.....	17
Figura 2 – Representação da ligação tiól-éster encontrada e C3 e C4 do sistema complemento	19
Figura 3 – Formação do MAC.....	22
Figura 4 – Clivagem e regulação da proteína C3do complemento.....	29
Figura 5 – Reguladores do complemento.....	30
Figura 6 – Modelo baseado na estrutura cristalográfica de C3 humano.....	32
Figura 7 – Representação esquemáticadas regiões do cDNA de C3 que foram amplificadas e sequenciadas.....	54
Figura 8 – Heredograma da família objeto de estudo.....	58
Figura 9 – Análise por <i>Western blotting</i> da presença de C3 nos soros da família.....	60
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose (1%) com fragmentos amplificados por RT-PCR	62
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose (1%) com fragmentos amplificados por RT-PCR da região H (3308-3930 nt) do cDNA de C3.....	63
Figura 12 – Sequenciamentodos nucleotídeos do fragmento H de cDNA de C3.....	64
Figura 13 – Sequenciamento dos nucleotídeos da região 6690313 até 6690961 do gene <i>C3</i> correspondente aos limites do íntron 27- éxon 27 e éxon 27-íntron 28.....	65
Figura 14 – Análise por Western blotting do sobrenadante de fibroblastos estimulados com LPS por 24 h.....	66
Figura 15 – Modelo baseado na estrutura cristalográfica de C3 humano.....	71
Figura 16– Mecanismo de transcrição, <i>splicing</i> em RNAm e tradução para síntese proteica .	72
Figura 17 – Representação do mecanismo de <i>splicing</i>	74
Figura 20 – Formação de <i>splicing</i> alternativo em eucariotos.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação das concentrações sérica de C3, C4 e imunoglobulinas	45
Tabela 2 – Contagem diferencial de leucócitos no sangue da paciente A.S.S	46
Tabela 3 – Iniciadores e posição do nucleotídeos (nt) utilizados para as reações de RT-PCR e reação de sequenciamento	53
Tabela 4 – Quantificação da concentração de proteínas FB, FH, FI e C3 por imunodifusão radial	57
Tabela 5 – Atividade hemolítica mediada pela via alternativa do sistema complemento	59
Tabela 6 – Atividade hemolítica mediada pela via classica do sistema complemento.....	59
Tabela 7 – Análise densitométrica	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa -	aminoácidos
ANA -	domínio proteico anafilatoxina
AP50 -	ensaio hemolítico da via alternativa do complemento
Arg -	arginina
Ca ²⁺ -	cálcio
C1INH -	do inglês C1-inhibitor
C4BP -	do inglês C4b-binding protein
cDNA -	DNA complementar
CEPSH -	Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
CH50 -	ensaio hemolítico da via clássica do complemento
CPN -	carboxipeptidase
CR-1 -	receptor 1 do complemento
CR-2 -	receptor 2 do complemento
CR-3 -	receptor 3 do complemento
CR-4 -	receptor 4 do complemento
CUB -	domínio proteico de C3
Cys -	cisteína
DAF -	do inglês decay-accelerating factor
DEMEN -	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA -	ácido desoxirribonucléico
dNTP -	desoxirribonucleotídeo trifosfato
C3adesArg -	C3a que teve a arginina C-terminal removida por carboxipeptidase N
DC -	células dendríticas
DAF -	do inglês <i>Decay-accelerating factor</i>
EDTA -	do inglês ethylenediamine tetraacetic acid
ESE -	do inglês <i>exonic splicing enhancers</i>
ESS -	do inglês <i>Exonic splicing silencers</i>
FB -	Fator B
FD -	Fator D
FH -	Fator H
FI -	Fator I
Glu -	ácido glutâmico
Gln -	glutamina
hCGβ -	gonadotrofina coriônica humana β
HRF -	do inglês <i>Homologous restriction factor</i>
Ig -	imunoglobulina
IgG -	imunoglobulina G
IgM -	imunoglobulina M
ISE -	do inglês <i>intronic splicing enhancers</i>
kDa -	kilodalton
kb -	kilobase
kg -	Quilograma

LPS -	lipopolissacarídeo
MAC -	complexo de ataque à membrana
MASP 1/2/3 -	do inglês mannose-binding lectin associated serine protease – 1/2/3
MBL -	do inglês mannose binding lectin
MCP-	proteína cofactor de membrana
Mg -	miligrama
Mg ⁺⁺ -	magnésio
MG 1-8 –	domínios de macroglobulinas 1 - 8 da proteína C3
mL -	mililitro
N -	indivíduo normal
ng -	nanogramas
nt -	nucleotídeos
NaCl -	cloreto de sódio
NaHCO ₃ -	bicarbonato de sódio
NK -	do inglês <i>natural killer</i>
NO -	óxido nítrico
P -	paciente
pb -	pares de base
PBS -	do inglês phosphate buffer saline
PCR -	reação em cadeia da polimerase
PMN -	polimorfonuclear
RNA -	ácido ribonucleico
RNA _m -	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR -	do inglês real time polymerase chain reaction
SCR -	do inglês <i>short consensus repeat</i>
SDS -	dodecil sulfato de sódio
snRNA -	RNA nuclear
SLE -	lúpus eritematoso sistêmico
Ser -	serina
SFB -	soro fetal bovino
SFBi –	soro fetal bovino inativado
SR -	proteínas reguladoras
T -	timina
TCD8 ⁺ -	linfócito T citotóxico
TED -	<i>thioester - containing domain</i>
Tris -	Trizma base
µg -	micrograma
µL -	microlítro
µM -	micromolar
VEGFR-2 -	receptor 2 fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O Sistema Complemento	16
1.2 A Via Clássica	18
1.3 A Via Alternativa	18
1.4 A Via das Lectinas	20
1.5 MAC	21
1.6 Funções biológicas do complemento	23
1.6.1 Formação do MAC	23
1.6.2 Opsonização	23
1.6.3 Quimiotaxia	23
1.6.4 Solubilização e remoção de imunocomplexos	24
1.6.5 Efeito adjuvante e ativação de linfócitos B	24
1.6.6 Anafilatoxinas C3a, C4a e C5a	25
1.6.7 Remoção de células apoptótica	25
1.7 Reguladores plasmáticos do complemento	26
1.8 Reguladores de membrana do complemento	28
1.9 A proteína C3	31
1.10 Deficiências do C3 humano	35
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivo específico	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Histórico familiar	45
3.2 Biópsia da pele e coleta do soro	46
3.3 Determinação da concentração de proteínas por imunodifusão radial	47
3.4 Atividade hemolítica mediada pela via alternativa do sistema complemento	47
3.5 Atividade hemolítica mediada pela via clássica do sistema complemento	48

3.6 Cultura de fibroblastos e estímulo com LPS	49
3.7 Extração de RNA de fibroblastos e estímulo com LPS	50
3.8 Extração de DNA genômico de fibroblastos	50
3.9 Síntese de cDNA empregando transcriptase reversa e amplificação por reação em cadeia utilizando DNA polimerase (RT-PCR)	51
3.10 Purificação dos produtos da reação de RT-PCR.....	51
3.11 Sequenciamento do cDNA de C3 humano e DNA genômico do gene de C3.....	52
3.12 Concentração de sobrenadante de fibroblastos estimulado com LPS	55
3.13 Western blotting.....	56
4 RESULTADOS	57
4.1 Análise da concentração de proteínas por imunodifusão radial	57
4.2 Análise da atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento	58
4.3 Análise da atividade hemolítica da via clássica do sistema complemento.....	59
4.4 Análise por <i>Western blotting</i> da presença de C3 nos soros da família e análise densitométrica	60
4.5 Análise do gel de agarose com regiões do cDNA de C3 amplificadas por RT-PCR	62
4.6 Análise do gel de agarose do fragmento H amplificadas por RT-PCR.....	63
4.7 Análise do sequenciamento genético da região H do cDNA de C3 e do gene C3	63
4.8 Análise por Western blotting da presença de C3 no sobrenadante em cultura de fibroblastos estimulados com LPS da família	66
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Complemento

O sistema complemento é importante para defesa contra patógenos e participa tanto da resposta imune inata, quanto da resposta imune adquirida. Pesquisas realizadas durante a última década mostram como o complemento discrimina tecidos saudáveis do hospedeiro, restos celulares, células apoptóticas, células neoplásicas e patógenos e ainda sincroniza uma resposta imunológica eficiente (Ricklin et al., 2010).

Composto por aproximadamente 40 proteínas, este sistema está presente tanto no plasma quanto na superfície de vários tipos celulares (Trouw et al., 2011). Estas proteínas interagem entre si e com outras moléculas do sistema imunológico de forma altamente regulada para a eliminação do microorganismo, geralmente sem causar danos ao indivíduo. O principal local de síntese da maioria das proteínas do complemento é o fígado, embora algumas proteínas como C3 possam ser sintetizadas localmente por macrófagos, células dendríticas e fibroblastos (Katz et al., 1989; Reis et al., 2006; Reis et al., 2007; Trouw et al., 2011; Walport, 2001). Suas principais funções biológicas envolvem o reconhecimento e eliminação de patógenos, remoção de imunocomplexos, além de servir como uma ponte entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. O sistema complemento quando ativado também promove reações inflamatórias pela geração das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, além da ativação de células como leucócitos e células endoteliais (Ricklin et al., 2010).

Sua ativação depende de uma cascata proteolítica de serino proteases caracterizadas pela alta conservação dos sítios catalíticos de serina, histidina e aspartato (Amara et al., 2011). Esta ativação pode ocorrer por três vias distintas, a via clássica, a via alternativa, e a via das lectinas que culminam em uma via terminal comum que leva à formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC), responsável pela lise osmótica da célula alvo (**Figura 1**).

Figura 1 - Representação das três vias de ativação do sistema do complemento e a formação do MAC

Vias de ativação do sistema complemento. A via clássica pode ser ativada por IgM e IgG específicas ligadas ao antígeno. A via das lectinas pode ser ativada pela ligação da *mannose binding lectin* (MBL) a resíduos de manose ou outros tipos de açúcares. MBL pode ser encontrada associada às serino proteases (MASP) 1, 2 e 3. A via alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiol-éster encontrada na cadeia α do C3 nativo com formação de C3 convertase e geração dos fragmentos C3b. As três vias culminam em uma via terminal comum que leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) a partir da associação de C5b as proteínas C6 e C7. Na sequência, C8 se liga a C7 e várias proteínas C9 se ligam a C8.

Fonte: Adaptado de Walport, 2001.

1.2 A Via Clássica

A via clássica foi historicamente a primeira a ser descrita e pode ser ativada de formas diferentes (Walport, 2001), mas principalmente na presença de imunocomplexos. Esta via pode ser iniciada pela interação de pelo menos uma molécula de IgM ou duas moléculas de IgG específicas ligadas à superfície do antígeno. Este imunocomplexo se liga à subunidade C1q do complexo C1 pela porção Fc, domínios CH₂ (IgG) ou CH₃ (IgM). O componente C1 é formado por uma molécula de C1q, e duas de C1r e C1s. A molécula de C1q é composta por 18 cadeias polipeptídicas (6 cadeias A, 6 cadeias B e 6 cadeias C). Já as moléculas C1r e C1s são proteases formadas cada uma por uma cadeia única de 90 kDa e 85 kDa, respectivamente. A molécula C1q apresenta um peso molecular de 400 kDa (Campbell et al., 1979; Lacroix et al., 1989; Yonemasu et al., 1980) e, ao se ligar ao complexo antígeno-anticorpo se ativa e cliva a subunidade C1r, que por sua vez cliva a subunidade C1s, ativando-a. Esta clivagem ativa C1s que irá clivar o componente C4 gerando os fragmentos C4a e C4b (**Figura 1**). Após hidrólise da ligação tiól-éster em C4, há deposição covalente de C4b no local da sua ativação (Ricklin et al., 2010). O componente C2, uma vez ligado ao fragmento C4b, será clivado por C1s dando origem aos fragmentos C2a e C2b (Golan et al., 1982). O fragmento C2b é liberado, dando origem ao complexo C4b2a que atua como uma C3-convertase que, por sua vez, irá clivar a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b poderá também se ligar à C4b2a formando C4b2a3b (C5-convertase) a qual clivará a proteína C5, gerando os fragmentos C5a e C5b (Janssen et al., 2007; Zipfel, Skerka, 2009). O fragmento C5b irá se ligar a C6 formando o complexo C5b6 ao qual C7 se ligará (C5b67) que por sua vez irá se ligar a C8 e sequencialmente várias moléculas de C9, dando origem a uma via terminal comum com formação do complexo de ataque à membrana (C5b6789_n) (MAC) (**Figura 3**) (Ricklin et al., 2010).

A proteína C-reativa pertence à família das pentraxinas e também pode ativar a via clássica do complemento, independente de anticorpos específicos (Kaplan, Volanakis, 1974). Em condições inflamatórias agudas ou injúria tecidual, a proteína C-reativa é encontrada no plasma em maior concentração ligando-se à molécula C1q, deslocando o C1-inibidor, desencadeando da mesma forma a cascata proteolítica da via clássica.

1.3 A Via Alternativa

A via alternativa, segunda via a ser descrita, é a mais antiga evolutivamente e a mais empregada na defesa contra patógenos. Sua ativação tem início a partir da hidrólise espontânea da ligação tiól-éster (**Figura 2**) localizada na cadeia α do C3, gerando C3(H₂O) (Walport, 2001). Acompanhado por mudança conformacional, o C3(H₂O) é capaz de se ligar à proteína plasmática Fator B (FB). O FB é uma pró-enzima com 93 kDa que interage com a superfície do C3(H₂O) formando o complexo C3(H₂O)B. Nessa condição o FB é clivado por outra enzima, o Fator D (FD). O FD encontrado na forma ativa no plasma humano com peso molecular de 25 kDa (Fearon et al., 1974; Pangburn et al., 1986). Quando o C3(H₂O)B é clivado pelo FD, esta reação gera os fragmentos Ba e Bb (**Figura 1**). O fragmento Bb permanece ligado ao C3(H₂O), formando a C3-convertase [C3(H₂O)Bb] a qual na presença de íons Mg⁺⁺ atua como serino-protease, clivando C3 em C3a e C3b.

O fragmento C3b também pode interagir com FB formando C3bB. Uma vez complexado o FB agora poderá ser clivado igualmente por FD em Bb e Ba gerando C3bBb que atua também como uma C3-convertase, clivando mais moléculas de C3, amplificando esta via de ativação. Como a C3-convertase é um complexo instável que pode ser rapidamente dissociado, sua estabilidade é assegurada pela properdina, que se liga à C3-convertase, estabilizando-a, regulando-a positivamente e aumentando a meia vida deste complexo (Fearon, Austen, 1975).

Figura 2 - Representação da ligação tiól-éster encontrada em C3 do sistema complemento

Em **A**: C3 intacto com ligação tiól-éster entre carbono e enxofre (seta) íntegra. Em **B**: C3 ativado, hidrólise da ligação tiól-éster entre carbono e enxofre (seta) inicia a ativação da via alternativa do sistema complemento.
Fonte: Adaptado de Walport, 2001.

A hidrólise da ligação tiól-éster do componente C3 permite a ligação covalente de C3(H₂O) e C3b em grupamentos amina ou hidroxila, na superfície da célula alvo ou de moléculas aceptoras. Esta ativação inicial pode ser rapidamente amplificada em células ou microorganismos estranhos, mas é imediatamente regulada no hospedeiro (Müller-Eberhard, Pangburn, 1980; Ricklin et al., 2010).

Quando C3b se liga à enzima C3bBb, forma o complexo C3bBb3b que atua como C5-convertase, capaz de clivar o componente C5 gerando os fragmentos C5a e C5b. Como resultado, o fragmento C5b irá se ligar a C6 e C7, C7 se liga a C8 que se liga em série sequencialmente a proteínas C9, formando assim C5b6789_(n) (MAC) capaz de lisar o patógeno (Ricklin et al., 2011; Ware et al., 1981).

1.4 A Via das Lectinas

A via das lectinas é ativada em resposta ao reconhecimento da lectina ligante de manose (MBL) de polissacarídeos microbianos presentes em vários patógenos como bactérias, leveduras, protozoários e vírus. A MBL é uma proteína que pertence à família das colectinas com 650 kDa com 18 subunidades de 31 kDa e, na presença de íons Ca²⁺ é capaz de se ligar a N-acetilglicosamina, frutose e resíduos de manose de polissacarídeos (Ohta et al., 1990). A MBL possui uma estrutura semelhante à de C1q. Esta proteína está associada a serino-proteases MBL-associated serine protease (MASP)-1, MASP-2 e MASP-3. A MASP-1 é uma molécula com 83 kDa formada por uma cadeia pesada de 66 kDa e uma cadeia leve de 31 kDa responsável pela sua atividade proteolítica (Matsushita, Fujita, 1992). Já a MASP-2 possui uma massa molecular de 76 kDa e é formada por duas cadeias, a cadeia A com 52 kDa, e a cadeia B com 31 kDa (Thiel et al., 1997). Em 2001, Dahl e sua equipe descreveram outro membro do complexo MBL, a MASP-3, assim designada devido à sua homologia estrutural com MASP-1 e MASP-2 (Dahl et al., 2001).

As MASP-1 e MASP-2 possuem estruturas e funções semelhantes àsquelas encontradas em C1r e C1s. A MBL ao se ligar ao açúcar presente na parede celular do patógeno sofre uma mudança conformacional, e sua proteína associada MASP-2 é alterada estruturalmente tornando-se ativa. A MASP-2 será responsável por clivar o componente C4 em C4a e C4b (**Figura 1**). O fragmento C4b irá se depositar covalentemente no local da sua ativação, seguido pela ligação de C2. Esta ligação permite que a MASP-2 também atue sobre a cadeia α polipeptídica única de C2

clivando esta proteína em C2a e C2b. O fragmento C2a permanece associado ao fragmento C4b originado dessa clivagem, formando C4b2a, que atua como uma C3-convertase clivando a cadeia α de C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b se liga à C4b2a formando C4b2a3b, que por sua vez atua como uma C5-convertase clivando o componente C5 em C5a e C5b. Novamente o fragmento C5b irá se ligar a C6 e C7, C7 se liga a C8 que se liga sequencialmente a várias proteínas C9, formando assim o MAC (Mollnes et al., 2002).

Assim como MBL, as ficolinas também pertencem à família das colectinas, compartilhando com elas a presença de uma região estruturalmente semelhante ao colágeno e um domínio globular com afinidade a determinados carboidratos presentes em abundância em certos patógenos. Quando ocorre a ligação deste domínio globular ao patógeno, ocorre também a ativação da MASP-2 desencadeando uma atividade proteolítica contra os componentes C2, C4 e C3, iniciando a ativação da via das lectinas e a resposta imune contra o patógeno (Matsushita et al., 2000). Endo et al. (2012), utilizando camundongos nocaute para as ficolinas A e B (*Fcna*^{-/-}, *Fcnb*^{-/-} e *Fcna*^{-/-b}^{-/-}) mostraram sua importância na defesa contra infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Quando a defesa do hospedeiro (camundongos) foi avaliada através da infecção transnasal com uma estirpe de *Streptococcus pneumoniae* capaz de ser reconhecida apenas pelas ficolinas A e B e não por MBL, a taxa de sobrevivência bacteriana foi consideravelmente reduzida nos camundongos *Fcna*^{-/-}, *Fcnb*^{-/-} e *Fcna*^{-/-b}^{-/-} em comparação aos animais controle. Isso mostra a incapacidade de ativação da via das lectinas na ausência dessas ficolinas, sugerindo que ambas são essenciais na infecção contra *Streptococcus pneumoniae* (Endo et al., 2012).

1.5 MAC

Todas as vias do sistema complemento culminam em uma via terminal comum e na formação do MAC. A C5-convertase gerada pelas vias clássica, alternativa e das lectinas, cliva a proteína C5 em C5a e C5b. Conforme já mencionado anteriormente, o componente C5 possui peso molecular de 190 kDa, e em muito se assemelha aos componentes C3, C4 e α 2-macroglobulina mas, ao contrário dessas proteínas, não apresenta ligação tiól-éster. O peptídeo C5a é um dos principais fatores quimiotáticos de células inflamatórias, participando ativamente do processo inflamatório (Aleshin et al., 2012; Bokisch et al., 1970). Já o fragmento C5b se associa a C6 (C5b6) ao qual C7 será acoplado. Em seguida a molécula de C8 será incorporada ao

complexo formando C5b678. A ligação de C8 ao complexo C5b-7 aumenta drasticamente a interação hidrofóbica entre essas moléculas acentuando a ligação de várias unidades da proteína C9 (Aleshin et al., 2012; Ware et al., 1981). A glicoproteína C9 (71 kDa) possui alta afinidade pela membrana celular, facilitando sua inserção na bicamada lipídica.

Durante a associação de várias proteínas C9 (que pode ser de 12-18 moléculas de C9), ocorre a polimerização (poli-C9) fundamental para a formação do MAC (**Figura 3**). O MAC permitirá a entrada descontrolada de água, o extravasamento de material intracelular de baixo peso molecular e a saída de sais e íons que levam a célula ao desequilíbrio osmótico, ruptura da membrana celular e morte do patógeno (Ricklin et al., 2011; Ware et al., 1981).

Figura 3 – Formação do MAC.

Complexo C5b (bege) e associação das proteínas C6 (azul), C7 (roxo), C8β (verde claro), C8α (verde), C8γ (verde musgo) e várias moléculas de C9 (cinza) que vão se inserir na membrana celular e após a polimerização dando origem ao MAC.

Fonte: Aleshin et al., 2012.

A perforina, encontrada em linfócitos TCD8⁺ e células *natural killer* (NK), e a proteína C9 possuem muitas semelhanças tanto estruturalmente quanto funcionalmente. Ambas possuem um importante domínio altamente conservado que lhes permite a inserção na membrana celular, formando um canal responsável pelo seu papel lítico. Ambas também apresentam uma

considerável homologia na sequência de aminoácidos (aa) dispostos na região N-terminal (Shinkai et al., 1988; Young et al., 1986).

1.6 Funções biológicas do complemento

1.6.1 Formação do MAC

O complexo C5b-9_(n) também pode ser formado em fase fluída como, por exemplo, no soro humano. Isso ocorre com a formação de um complexo C5b-9 hidrofílico que não exerce mais atividade lítica. Este complexo pode se associar à S-proteína que se liga de forma apolar a superfícies nascentes de moléculas C5b-7, alterando estruturalmente este complexo e o seu potencial de ligação à membrana celular permanecendo na fase fluída (Bhakdi et al., 1978). Muito se discute o papel do MAC na sua fase fluída, mas pouco se sabe até o momento.

1.6.2 Opsonização

A fagocitose é um importante mecanismo de remoção de células apoptóticas, necessário para a restauração da homeostase e resolução do processo inflamatório. Os fragmentos C3b, C4b e iC3b participam ativamente desse processo facilitando a fagocitose. Esses fragmentos recobrem patógenos, produtos liberados durante lise celular e células apoptóticas, facilitando sua remoção pelos fagócitos via receptor CR1 (C3b e C4b), receptor CR2 (C3d e iC3b) e receptor CR3 e CR4 (iC3b) do complemento (Lambris et al., 1988).

Kemper et al. (2008) descreveram a função da properdina como opsonina, facilitando a fagocitose de células T apoptóticas. O complexo C3bBbP pode se ligar a células T apoptóticas que expressam proteoglicanas específicas que irão mediar a opsonização pelos fagócitos via C3b do complexo.

1.6.3 Quimiotaxia

O fragmento do sistema complemento mais importante para o processo quimiotático é o C5a. Desde a década de 70, estudos mostram sua contribuição na quimiotaxia de polimorfonucleares durante o processo inflamatório para sua resolução (Snyderman et al., 1971). Este fragmento aumenta a síntese de moléculas de adesão por células endoteliais, a atração de leucócitos circulantes para o sítio inflamatório, aumentando a capacidade de eliminação do

patógeno, além de aumentar a síntese e liberação de citocinas por diferentes tipos celulares (Manthey et al., 2009)

1.6.4 Solubilização e remoção de imunocomplexos

Imunocomplexos podem ser intercalados por C3b e C4b formando uma rede (Czop, Nussenzweig, 1976) e assim serem solubilizados evitando seu depósito em paredes vasculares e ativação do complemento que pode levar a reação inflamatória local. A remoção desses imunocomplexos pode ocorrer pelo receptor de complemento (CR) -1 do complemento, presente em eritrócitos e demais células sanguíneas. Os imunocomplexos recobertos por C3b e C4b se ligam ao CR1 e, ao passarem pelo fígado, são fagocitados pelas células de Kupffer (Cornacoff et al, 1983).

Helmy et al. (2005) mostraram a expressão do receptor CR1g (receptor pertencente à super-família das imunoglobulinas) nas células de Kupffer. Esse receptor se liga aos fragmentos C3b e iC3b do complemento aumentando sua eficiência no processo de fagocitose e, assim como CR1, removem os imunocomplexos da circulação.

1.6.5 Efeito adjuvante e ativação de linfócitos B

O efeito adjuvante do fragmento C3d do complemento foi explorado inicialmente por Dempsey et al. (1996). O estudo mostrou que a construção de um modelo de antígeno recombinante à base de lisozima de ovo de galinha ligado a uma, duas ou três moléculas de C3d imunogênica, estimulava a síntese específica de IgG1 logo após a primeira imunização.

Wang et al. (2004) construíram um antígeno recombinante utilizando a gonadotrofina corionica humana (hCG) e uma trinca de C3d (hCG β) como adjuvante. Seus resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de anticorpos anti-hCG β eficientes na neutralização da bioatividade da hCG.

Pepys et al. (1974) propuseram que o sistema complemento poderia estimular os linfócitos B para produção de anticorpos, e desde então, muitos autores investigaram essa função biológica. Bohnsack et al. (1988) estudaram os diferentes tipos de ligantes do CR2 para a ativação dos linfócitos B. Carter et al. (1992) comprovaram que CD19 (uma proteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas) presente nos linfócitos B, participa da sua ativação, sinalização e resposta imunológica. Dempsey et al. (1996) mostraram que os

fragmentos C3d e C3dg ligados ao antígeno são capazes de estimular a síntese de anticorpos específicos por meio da ligação desses fragmentos ligados ao antígeno ao receptor receptor CR2 (CR2/CD19) presente nos linfócitos B concomitantemente a IgM de membrana específica. Camundongos foram imunizados com um modelo antigênico recombinante utilizando lisozima (de ovo de galinha) fundida com duas ou três cópias de C3d. Este antígeno foi de 1000 a 10000 vezes mais imunogênico do que a lisozima de ovo de galinha sozinha. No mesmo ano, Croix et al. (1996) estudando animais CR2 deficientes verificaram que a expressão desse receptor nos linfócitos B é fundamental para a resposta imunológica T-dependente.

1.6.6 Anafilatoxinas C3a, C4a e C5a

Os fragmentos C3a, C4a e C5a são conhecidos por sua atividade anafilática, isto é, sua capacidade de se ligar a mastócitos e basófilos (via receptor presente nessas células) desencadeando a liberação de mediadores pró-inflamatórios como heparina e histamina aumentando a síntese de moléculas de adesão pelas células endoteliais, recrutando leucócitos circulantes para o foco inflamatório (Manthey et al., 2009). C3a e C5a também podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos aumentando sua ação microbiana (Elsner et al., 1994; Manthey et al., 2009).

Os fragmentos C3a e C3a_{desARG} (C3a que teve a arginina C-terminal removida por carboxipeptidase N) podem agir aumentando a síntese e expressão de TNF- α e IL-1 β em monócitos localizados em sítios inflamatórios, dessa forma modulando a resposta inflamatória (Takabayashi et al., 1996).

O fragmento C5a medeia a síntese e liberação de citocinas como IFN- γ por diferentes tipos celulares além de participar do processo de reparação tecidual, promoção da angiogênese e produção de fatores de crescimento durante a resolução do processo inflamatório (Manthey et al., 2009; Mastellos et al., 2001).

1.6.7 Remoção de células apoptóticas

A remoção das células apoptóticas depende de C1q que se liga de à superfície das vesículas de células apoptóticas, impedindo a exposição de auto-antígenos para o sistema imune e

prevenindo a formação de auto-anticorpos que podem desencadear o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Korb et al., 1997). O reconhecimento molecular envolve as proteínas C1q e MBL da via clássica e lectinas respectivamente via receptor para C1q (presente em células endoteliais e plaquetas). Essas proteínas têm uma ligação direta com a remoção de células apoptóticas e necróticas, facilitando sua opsonização pelas células dendríticas, e remoção do microambiente (Nauta et al., 2004).

Em 1996, Takizawa et al. (1996) mostraram que moléculas de iC3b se depositavam em células apoptóticas facilitando sua opsonização via CR3 e CR4. Mais tarde, Mevorach et al. (1998) mostraram que o bloqueio desses receptores reduzia significativamente a fagocitose de células apoptóticas recobertas por iC3b, comprovando sua importância na remoção dessas células.

1.7 Reguladores plasmáticos do complemento

O inibidor de C1 (C1INH) é uma proteína que pertence a uma família de serino proteases envolvidas com o sistema de coagulação. Possui uma única cadeia conservada evolutivamente com 104 kDa composta por 370-390 aa e sua concentração no plasma é de aproximadamente 200 µg/mL (Ziccardi, 1982).

O C1INH é capaz de inibir a ativação do complexo C1 (Ziccardi, 1982) bloqueando os sítios catalíticos de C1r e C1s, e que terminam por se dissociarem das moléculas de C1q, impedindo assim a ativação da via clássica do complemento (**Figura 4**) (Sim et al., 1979). Essa interação com C1 consiste em uma ligação irreversível em um sítio estrutural contendo de 30-40 aa na sua região carboxi terminal (Potempa et al., 1994). De forma semelhante, este regulador pode se associar às MASPs (MASP-1 e MASP-2), interrompendo a ativação da via das lectinas.

O Fator I (FI) pertence à família das serino proteases e sua concentração no plasma é 64 ± 13 µg/mL (Ferreira de Paula et al., 2003). Esta proteína se apresenta na forma de um dímero com 88 kDa contendo duas subunidades, uma cadeia pesada de 50 kDa e uma cadeia leve de 38 kDa. A cadeia leve do FI possui três sítios de glicosilação e uma região catalítica com aa importantes para o desempenho da sua função. A cadeia pesada de FI também possui três sítios de glicosilação e é composta por 32 aa (Catterall et al., 1987; Pangburn et al., 1977).

O FI é responsável pela clivagem da cadeia α tanto do C3b quanto do C4b, porém é necessária a presença de co-fatores como Fator H (FH), proteína de membrana com atividade de

cofator (MCP), CR1 ou a proteína ligante de C4b (C4BP) (**Figura 4**). Quando isso acontece, o C3b é clivado em iC3b e posteriormente nos fragmentos C3c e C3dg; C4b é clivado em C4c e C4dg, dessa forma interrompendo a formação da C3-convertase e a continuidade da cascata de ativação do complemento (Pangburn et al., 1977).

O FH é uma glicoproteína de cadeia única composta por 1231 aa com peso molecular de 150 kDa, e sua concentração no plasma é de 443 ± 106 $\mu\text{g/mL}$ (Ferreira de Paula et al., 2003; Ripoché et al., 1988; Whaley, Ruddy, 1976). O FH age sobre C3b promovendo o deslocamento de Bb acelerando o decaimento do complexo C3bBb, consequentemente regulando a via alternativa do complemento. Este componente também desempenha o papel de cofator favorecendo a clivagem do C3b pelo FI e o decaimento funcional da C3-convertase (Pangburn, 1986).

A C4BP é um importante cofator de FI com concentração plasmática de aproximadamente 335 ± 83 $\mu\text{g/mL}$ (Ferreira de Paula et al., 2003; Rezende et al., 2004; Scharfstein et al., 1978). Liga-se a C4b promovendo a dissociação e impedindo a formação do complexo C4b2a (C3-convertase), acelerando seu decaimento e impossibilitando a continuação da cascata de ativação da via clássica, além de atuar como co-fator de FI (Fujita et al., 1978; Gigli et al., 1979; Scharfstein et al., 1978). Assim como outros reguladores do complemento, a C4BP compartilha com FH domínios comuns denominados *short consensus repeat* (SCR) formadas por aproximadamente 60-70 aa cada. C4BP pode ser encontrada em três isoformas compostas por diferentes subunidades originadas a partir de diferentes combinações entre as cadeias α e β . A forma mais comum é composta por sete cadeias α com oito SCRs cada, e uma cadeia β com três SCRs (Sanchez-Corral et al., 1995).

A S-Proteína foi descrita por Podack e Müller (1979). Ela foi descoberta durante o estudo do complexo terminal C5b-9 na sua fase fluída, e somente em 1985, Janne e Stanley (1985) mostraram que a S-Proteína era idêntica à vitronectina, nome pelo qual esta proteína também é conhecida. A S-Proteína atua inibindo o local de interação entre os sítios de ligação de heparina e o complexo C5b-7, dessa forma, interrompendo sua interação com a membrana celular e a formação do MAC (**Figura 3**) (Milis et al., 1993). Seu peso molecular é de 75 kDa e sua concentração no plasma em adultos normais varia entre 59,8 e 171,2 $\mu\text{g/mL}$ (Ferreira de Paula, 2002).

A Proteína S-40,40 (**Figura 5**) foi identificada pela primeira vez em 1988, por Murphy et al. (1988) depositada no glomérulo renal em pacientes com glomerulonefrite. Hoje conhecida por clusterina, é uma proteína heterodimérica com 80 kDa formada por duas cadeias (uma subunidade α e uma subunidade β) de 40 kDa cada. Sua principal fonte são as células de Sertoli e sua concentração no plasma de indivíduos normais pode variar entre 35 a 105 $\mu\text{g/mL}$. Semelhante à S-Proteína, este regulador se liga ao complexo C5b-7 impedindo sua interação com a membrana celular, a associação de C8-9 e formação do MAC (Fritz, 1992; Murphy et al., 1998).

A properdina é uma glicoproteína com 56 kDa que pode formar dímeros, trímeros ou até tetrameros na sua forma ativa ou inativa. É o único regulador positivo do complemento e sua concentração no plasma é $25 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ (Ferreira de Paula et al., 2003). Sua principal função é estabilizar o complexo C3bBb aumentando sua meia vida (Ferries et al., 1988).

A carboxipeptidase-N (CPN) foi descoberta em 1960, por Erdös e Slone (1960) como uma enzima plasmática capaz de inativar a bradicinina, após a remoção de resíduos de arginina C-terminal nela presentes. Anos mais tarde se descobriu que a CPN é um importante inativador de anafilatoxinas (Gerard, Hugli 1981). A CPN é uma enzima tetramérica com peso molecular de 280 kDa, formada por duas subunidades, uma com 48 kDa que é responsável pela sua ação enzimática, e uma subunidade com 83 kDa que promove a estabilização da molécula. Sua concentração no plasma é de aproximadamente 30 $\mu\text{g/mL}$ (Bokisch et al., 1970; Levin et al., 1982). A CPN age em C3a, C4a e C5a da mesma forma que age na bradicinina, removendo a arginina presente na porção C-terminal dessas moléculas, interrompendo a ação anafilática e inflamatória dessas moléculas (Hugli, 1984).

1.8 Reguladores de membrana do complemento

O CR1 ou CD35 foi o primeiro receptor a ser descrito desempenhando um papel muito importante na regulação do complemento. O gene que codifica este receptor está localizado no cromossomo 1, na região q32 (banda 32 do braço longo do cromossomo). O CR1 atua como cofator de FI ao clivar os fragmentos C3b e C4b. O iC3b gerado pode então ser novamente clivado pelo FI na presença de cofatores como FH, C4BP ou o próprio CR1 (que pode ser encontrado também na forma solúvel), dando origem aos fragmentos C3c e C3dg (**Figura 4**). O fragmento C3dg será então clivado por outras proteases gerando C3d e C3g (Weiss et al., 1989).

Figura 4 - Clivagem e regulação da proteína C3 do complemento

Degradação dos produtos da C3 convertase gerando C3a e C3b que é clivado por FI e cofatores que podem ser FH, MCP e CR1. O C3b pode sofrer uma nova clivagem pelo FI na presença de co-fatores gerando iC3 e C3f. O fragmento iC3b pode sofrer uma clivagem pelo FI na presença de co-fatores dando origem a C3c e C3dg. C3c e C3dg irão sofrer ação de outras proteases que irão clivar esses fragmentos.

Fonte: Modificado de Agarwal et al., 2001.

O CR1 é uma glicoproteína de cadeia única com peso molecular de aproximadamente 220 kDa que pode ser encontrada ancorada na membrana celular por uma curta cauda citoplasmática, ou está presente na forma solúvel no plasma. Este receptor é encontrado em vários tipos celulares como eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e células de Langerhans (Ahearn et al., 1989; Weiss et al., 1989).

A MCP ou CD46 (**Figura 5**) está presente em vários tipos celulares como fibroblastos, linfócitos T e B, células endoteliais, e em todos os demais leucócitos, exceto em eritrócitos. Esta proteína possui uma cadeia com 45-70 kDa, composta por uma cauda hidrofóbica transmembrana com 31 aa seguida de 14-23 aa citoplasmáticos, e uma porção N-terminal com sítios de glicosilação. A MCP atua como cofator de FI na clivagem de C3b e C4b inibindo a formação das convertases das três vias de ativação (Matsumoto et al., 1992; Seya et al., 1986).

Figura 5 - Reguladores do complemento

C1-INH: inibidor de C1. C4bp: proteína ligante de C4b. FI: Fator I. MBL: lectina ligante de manose. DAF: fator de aceleração de decaimento. CR1: receptor de complemento 1. MCP: proteína de membrana com atividade de co-fator. CD59: inibidor de lise de membrana. Clusterina e S-Proteína. FH: Fator H. Masp-1,2 3 3 (*Mannose binding lectin-associated serine protease*).

Fonte: Modificada de Francis et al., 2003.

A proteína *Decay-accelerating factor* (DAF) possui aproximadamente 70 kDa e encontra-se distribuída em vários tipos celulares como células epiteliais glomerulares, eritrócitos e leucócitos. A DAF está inserida na membrana celular por uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol responsável por transmitir sinais intracelulares, mas também pode ser encontrada solúvel no plasma. Sua principal função é acelerar o decaimento da C4b2a da via clássica ou C3bBb da via alternativa da C3-convertase e C5-convertase, respectivamente (**Figura 5**), dissociando a ligação desses complexos (Lublin et al., 1989; Richard et al., 1989).

O *homologous restriction factor* (HRF) assim como a DAF está presente em vários tipos celulares e encontra-se inserido na membrana através da âncora de GPI. Esta proteína com 65 kDa possui alta afinidade pelos componentes C8 e C9 da via terminal comum e sua ligação ao complexo C5b-8 e C5b-9 impede a formação do MAC (Martin et al., 1987, Tandon et. al., 1992).

A glicoproteína CD59 (**Figura 5**) é um importante regulador do sistema complemento e assim como as proteínas DAF e HRF está ancorada a membrana celular por GPI. O CD59 humano possui 20 kDa e encontra-se amplamente distribuído em linfócitos, células epiteliais, endoteliais e sanguíneas. Sua ligação ao componente C8 ou C9 bloqueia a inserção dessas moléculas na bicamada lipídica, a polimerização e formação do MAC (Davis et al., 1989, Meri et al., 1990).

1.9 A proteína C3

O gene C3 humano está localizado no cromossomo 19 (Whitehead et al., 1982) que compreende 42 kb com 41 éxons e um peso molecular aproximado de 190 kDa. A proteína C3 que pertence à família da α 2-macroglobulina tem aproximadamente 1663 aa que formam duas cadeias distintas α e β , ligadas por uma ponte de sulfeto (**Figura 4**) (Bruijn et al., 1984; Fong et al., 1990; Janssen et al., 2005).

A cadeia β (**Figuras 6 e 7**) possui 75 kDa abrangendo os 23-667 aa codificados pelos 16 primeiros éxons. Durante todo o processo de clivagem da proteína C3, esta cadeia se mantém íntegra sem sofrer clivagem proteolítica. Já a cadeia α (**Figura 6**) possui 115 kDa que abrangem 672-1663 aa codificados pelos 25 éxons restantes. Nesta cadeia está localizada a ligação tiol-éster (Bruijn et al., 1984; Janssen et al., 2005).

A concentração desta proteína no plasma é aproximadamente 1,3 mg/mL (Vik et al., 1991) e sua principal fonte de síntese são os hepatócitos (Alper, Rosen, 1976). Porém, estudos mostraram que este componente pode ser sintetizado por vários tipos celulares como células endoteliais (Warren et al., 1987), monócitos (Whaley, 1980), macrófagos (Cole et al., 1980), fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares, além de células dendríticas (Reis et al., 2006; Reis et al., 2007).

Figura 6 - Modelo baseado na estrutura cristalográfica de C3 humano

Em **A** temos a estrutura cristalográfica da proteína C3. Em **B** temos os domínios presentes na cadeia β (1-645), e na cadeia α (650-1641). Domínios do tipo macroglobulina de 1 a 8 (MG), domínio ligante (LNK), domínio anafilatoxina (ANA), sítio de clivagem da cadeia α (α' NT), região dos domínios proteicos 912-962 (CUB^g) e domínios proteicos 1269-1330 (CUB^f), domínio tiól-éster (TED), domínio carboxi-terminal (C345C). Âncora. Clivagem do C3 gera C3a e C3b, e clivagem do C3b gera C3c, C3f, e C3dg (C3g + C3d).
Fonte: modificado de Janssen et al., 2005.

A clivagem do C3 ocorre entre os resíduos 77 e 78 (Arg-Ser) da cadeia α gerando os fragmentos C3b e C3a. Esse C3b gerado é capaz de se ligar covalentemente a hidroxilas ou

aminas presentes na superfície de células, complexos carboidratos ou imunocomplexos. Esta ligação é fundamental para a continuada ativação do complemento e é mediada pela ligação tiol-éster envolvendo uma sulfidril (Cys 988) e uma carboxila (Glu 990), ambas localizadas na região do C3d (Lambris, 1988). Diferente do C3 nativo, o C3b expressa vários sítios de ligação para várias proteínas do complemento que incluem properdina, FH, FI, FB, CR1 e MCP o que lhe permite a amplificação da ativação do complemento pela C3-convertase (via FB na presença de FD), ou a regulação através da inativação de C3b (via FI na presença de cofatores com MCP, CR1 e FH) (Lambris, 1988).

A regulação do fragmento C3b pelo FI é um processo que ocorre em três etapas e requer a presença de cofatores como MCP, CR1 e FH que irão induzir uma mudança conformacional permitindo que o FI possa interagir com C3b. Primeiro ocorre a clivagem da cadeia α entre os resíduos 1281-1282 (Arg-Ser). Em poucos segundos ocorre a clivagem entre os resíduos 1298-1299 (Arg-Ser) do C3 gerando os fragmentos iC3b e C3f. Em terceiro o FI medeia uma nova clivagem nos resíduos 932-933 (Arg-Glu) do iC3b gerando C3dg que posteriormente será clivado por outras proteases plasmáticas (Lambris, 1988).

Os eventos que levam à clivagem do C3 originam os fragmentos C3a, C3b, iC3b, C3c, C3dg e C3f (**Figuras 4 e 6**) que exercem várias propriedades biológicas. Os componentes C3b e iC3b participam do mecanismo de opsonização de antígenos, facilitando a internalização desses agentes pelos fagócitos (Walport, 2001). A desgranulação de mastócitos e basófilos é mediada pelo componente C3a, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios como a histamina. O C3b também atua na solubilização e remoção de imunocomplexos formados na circulação. Este fragmento se liga de forma covalente aos imunocomplexos impedindo a formação de grandes complexos que, ao passarem pelo fígado, serão removidos da circulação sanguínea (Davies et al., 1994). O C3b também participa na formação da C5-convertase, via de ativação efetora contra o patógeno. Já o fragmento C3d atua na imunidade adquirida, estimulando a síntese de imunoglobulinas antígeno-específico pelas células B (Carroll, 1998; Ricklin et al., 2011).

Hartmann et al. (1997) mostraram que o fragmento C3a é capaz de estimular a quimiotaxia de mastócitos e a mobilização de cálcio livre, Daffern et al. (1995) provaram que C3a e C3adesArg são quimiotáticos para eosinófilos e ativador de neutrófilos, e Mousli et al. (1992) demonstraram a eficiência desse fragmento C3a na estimulação da proteína G na ativação de mastócitos e liberação de histamina.

Suresh et al. (2003) mostraram que animais C3 deficientes durante episódio de infecção viral sistêmica causada por vírus da coriomeningite linfocítica tem o mecanismo de expansão de clones de linfócitos TCD8⁺ significativamente prejudicado diminuindo o número dessas células, mostrando sua necessidade do componente C3 na expansão dessas células efetoras.

Estudos cristalográficos de C3 descreveram minuciosamente cada domínio dessa proteína. O domínio *thioester - containing domain* (TED) na região 963-1268 aa que inclui os fragmentos C3d e C3g e o domínio CUB (912-962 aa e 1269-1330 aa) estão intimamente ligados (**Figura 6**). Esses domínios são altamente conservados e associados à proteção do hospedeiro contra o patógeno, compondo uma região nobre da proteína C3. O CUB se insere entre os domínios MG7 (807-911 aa) e MG8 (1331-1474 aa) gerando uma distância estrutural necessária para as interações moleculares e ligação com o domínio TED (Janssen et al., 2005).

A ligação tiól-éster é encontrada em um bolsão hidrofóbico localizado no domínio TED. Esse bolsão é formado por Cys 988 - Gln 991, resíduos altamente conservados entre certas proteínas do complemento e proteínas que pertencem à família α -2 macroglobulinas, como é o caso do C3. A mudança conformacional do C3 nativo para que ocorra a hidrólise da ligação tiól-éster é impedida pelos domínios MG8-TED, bloqueando esta ligação e gerando um mecanismo de controle contra a hidrólise pela água. A posição do domínio TED é essencial para a manutenção e proteção do C3, o TED é sustentado pelas interações com MG2, MG8 e CUB responsáveis pela sua conformação estrutural essencial para ativação desse componente (Janssen et al., 2005).

Os resíduos 1-534 compreende os cinco domínios MG1 a MG5, além dos resíduos 535-577 do domínio MG6 ^{β} e LNK formando a cadeia β . Juntos os seis domínios MG1 a MG5 e MG6 ^{β} formam voltas helicoidais como em um anel chave, e os resíduos 578-577 de MG6 formam um laço através desse anel e mais três hélices em uma configuração que se alinha ao domínio MG1 (Janssen et al., 2005).

O domínio ANA (650-726) se liga ao domínio MG6 por um extenso anel que abrange a região N-terminal (730-745). Os resíduos 746-806 formam MG6 ^{α} (completando MG6) seguido de um sétimo domínio MG7 (807-911), e o domínio MG8 composto pelos resíduos 1331-1474 corresponde ao domínio α -2 macroglobulina. Já os resíduos 1496-1641 formam a região carboxiterminal do domínio C345C que está covalentemente ligado a MG8 por cadeias

polipeptídicas e MG7 por uma ponte de sulfeto denominada como região Âncora (1475-1495) (Janssen et al., 2005).

A clivagem do C3 nativo remove o domínio anafilatoxina (ANA) gerando C3a e C3b, expondo a ligação tiól-éster antes oculta, mostrando o papel crítico que ANA tem na proteção indireta dessa ligação e a interação entre ANA e TED. ANA tem uma extensa interação com MG8 e MG3. Esta interação permite manter a estrutura proteica estável mantendo MG8 em uma posição correta, permitindo o aumento da interação com o domínio TED. As interações entre os domínios proteicos de C3 só são possíveis devido à conformação estrutural da molécula, e mudanças conformacionais que ocorrem durante sua ativação. Qualquer alteração estrutural em qualquer domínio pode ter sérias consequências, comprometendo a ativação e principalmente a função dessa proteína (Janssen et al., 2005).

1.10 Deficiências do C3 humano

A deficiência primária do C3 humano tem sido descrita em pacientes em diferentes regiões do mundo e até hoje 31 casos foram descritos. Suas manifestações clínicas consistem em infecções recorrentes por bactérias Gram-negativas como *Neisseria meningitidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, bactérias Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae*, otite média e, em alguns casos são acompanhadas por doenças mediadas por imunocomplexos (Reis et al., 2006).

Alper et al. (1972) descreveram pela primeira vez uma paciente africana com 15 anos de idade, suscetível a infecções piogênicas marcantes desde a infância. Esta paciente apresentou episódios de infecções por *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, além de meningite e otite média. O estudo do caso mostrou que a paciente era homozigota para a deficiência de C3. Seus níveis séricos dessa proteína correspondiam a um milésimo abaixo do normal (Normal: 15-30 U/mL). Seus pais apresentaram níveis reduzidos de C3 (pai: 11 U/mL, mãe: 7 U/mL), quando comparados com pacientes normais. Posteriormente com os avanços da Biologia Molecular, Botto et al. (1992) demonstraram que esta diferença era causada pela deleção de 800 pares de base (pb) codificadores de parte da cadeia α do C3. Constatou-se a deleção dos éxons 22 e 23 e geração de um códon de parada prematuro no RNA

mensageiro (RNAm) de C3 desta paciente (Alper et al., 1972; Botto et al., 1992) produzindo consequentemente uma proteína truncada.

Ballow et al. (1975) estudaram uma paciente com 4 anos de idade que, com um mês de vida apresentava diarreia persistente e otite média. Aos 17 meses e aos 23 meses de vida apresentou quadro febril associado à infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Aos 20 meses sofreu novamente com quadro de diarreia, otite média e foi diagnosticada com infecção urinária causada por *E. coli*. A concentração de C3 sérica era 10% do normal e a análise da atividade microbicida bacteriana neste soro foi aproximadamente 11% e mesmo após a reconstituição do soro com C3 purificado foi 52% (Ballow et al., 1975).

Grace et al. (1976) descreveram o caso de uma garota africana com 4 anos de idade que apresentou quadros constantes de meningite causada por pneumococos. A atividade hemolítica mediada pela via clássica (CH50) estava completamente ausente no soro, e o seu nível de C3 era zero. Seu irmão faleceu ainda na infância por meningite. Embora seus pais não possuíssem histórico de consanguinidade, ambos são heterozigotos para a deficiência da proteína C3 (Grace et al., 1976).

Um ano depois, Osofsky et al. (1997) estudaram o paciente S.A que sofreu com febre alta durante 5 dias, erupção máculopapular eritematosa, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, artralgias e otite média. A dosagem do nível sérico de C3 foi <3 mg/dL (normal 80-180 mg/dL), e o ensaio hemolítico foi de 4 U CH50/mL (normal 30 ± 10 U/mL). Enquanto o soro normal matava 100% de *E. coli*, o soro da paciente deficiente de C3 não apresentava essa propriedade. O paciente S.A tinha um irmão que faleceu, uma irmã normal e, outra irmã com metade do nível normal de C3, assim como outros membros da família testados (24 membros incluindo os pais). Os pais da paciente possuíam laços de consanguinidade (Osofsky et al., 1997).

Ainda em 1977, Davis et al. (1977) descreveram o caso de uma garota que aos 5 meses de idade desenvolveu episódios frequentes de infecção respiratória, febre alta e pneumonia. Com 1 ano de idade teve varicela, aos 3 anos sofreu otite média, convulsões, faringite, e aos 5 anos teve pneumonia. A primeira averiguação da atividade hemolítica mediada pela via clássica, feita na paciente em 1973, indicou 6 U CH50/mL e, 2 anos mais tarde a atividade hemolítica foi <1 U CH50/mL (Normal: 32-45 U CH50/mL). A concentração de C3 no soro da paciente era 5 mg/mL enquanto um indivíduo normal apresentou 100-200 mg/mL (Davis et al., 1977).

Três anos mais tarde, Pussel et al. (1980) relataram o caso de 3 irmãos de uma família com origem palestino-libanesa com homozigose para a deficiência de C3. Conforme heredograma da família, o caso da paciente II-3, uma garota com 13 anos de idade, apresentou quadros frequentes de cefaléia, dor abdominal além de proteinúria. A irmã (II-5) com 7 anos de idade, sofria desde o primeiro ano de vida com proteinúria, hematúria e pneumonia. O irmão (II-6), um garoto diagnosticado aos 5 anos de idade, aos 3 anos desenvolveu peritonite, proteinúria, e seus pais não possuíam laços de consanguinidade. A concentração de C3 no soro da mãe foi 89%, e dos três irmãos foi zero, enquanto que o intervalo de normalidade é de 60-130% e a atividade hemolítica mediada pela via clássica foi 66%, 10%, 10% e 10% respectivamente, em relação ao soro referência (50-125%) (Pussel et al., 1980).

O caso de uma garota chinesa de 10 anos de idade com completa ausência da proteína C3 foi publicado por Hsieh et al. (1981). Ela teve entrada no hospital com febre alta, tosse, artralgias e erupções cutâneas por uma semana. A paciente teve 12 episódios de pneumonia, 5 de otite média, bronquite e episódios de convulsões. A atividade hemolítica mediada pela via clássica do pai era 12,5%, da mãe 30,0% e da paciente zero. A paciente tinha uma irmã mais velha que, aos 6 meses, teve pneumonia, meningite e posteriormente faleceu, e seus pais não possuíam histórico de consanguinidade (Hsieh et al., 1981). Mais tarde, em 1994, Huang et al. (1994) utilizando métodos de Biologia Molecular descobriram que esta paciente (na época com 22 anos de idade) apresentava no RNAm de C3 a exclusão de 34 nucleotídeos na região 3' do éxon 10 e substituição da base G→T no sítio doador de *splice* do íntron 10 do gene *C3*, gerando um códon de parada prematuro responsável pela deficiência de C3 (Huang et al., 1994).

Ainda em 1981, foi descrito no Japão o caso de duas irmãs com lúpus eritematoso. A paciente 1 com 19 anos de idade sofria com episódios recorrentes de bronquite, erupções na face e artralgia contínua, embora gozasse de boa saúde até os 10 anos de idade. A paciente 2 com 14 anos de idade possuía um histórico médico semelhante ao da irmã. Os níveis de C3 no soro tanto da paciente 1 quanto da paciente 2 foram indetectáveis. O ensaio hemolítico feito com o soro da paciente 1 apresentou de 6,3 U CH50/mL, e a paciente 2 apresentou 5,8 U CH50/mL, e o SHN mostrou valor de 40 U CH50/mL (Sano et al., 1981).

Roord et al. (1983) estudaram uma família holandesa, residente em um pequeno vilarejo. A família era composta pelo pai com 60 anos de idade, a mãe com 59 anos de idade, e mais 13 filhos com idades variadas. Dentre estes, um faleceu aos 3 anos com meningite, e outro com 6

anos de idade sem histórico de infecções recorrentes. Conforme heredograma da família os pacientes dos casos II-6, II-10 e II-12 foram os objetos de estudo. A paciente do caso II-6, uma mulher com 26 anos de idade sofria com quadros de otite média constantes, e infecções cutâneas. Aos 5 anos contraiu *Staphylococcus aureus*, meningite e, aos 9 anos, teve sepse e meningite por *Neisseria meningitidis*. A paciente do caso II-10, uma garota com 19 anos de idade, desenvolveu meningite pneumocócica com 2 anos de idade e quadros constantes de otite média e posterior desenvolvimento de lesões cutâneas. Já a paciente do caso II-12, uma garota com 16 anos de idade apresentou quadro semelhante ao caso 10 sofrendo de otite média de repetição desde os 8 meses. A atividade hemolítica foi de 17 U CH50/mL no caso 6, 10 U CH50/mL no caso 10 e 11 U CH50/mL no caso 12 (Normal: 185-261 U CH50/mL). A concentração de C3 funcional foi 232 U /mL no caso 6, 175 U /mL no caso 10 e 150 U /mL no caso 12, indicando a homozigose para deficiência da proteína C3 entre os pacientes (Roord et al., 1983).

Neste mesmo ano, Berger et al. (1983) investigaram o caso de uma garota com 11 anos que, desde o primeiro mês de vida, apresentou quadros de infecções recorrentes e, aos 4 anos, foi diagnosticada com deficiência de C3. O nível desta proteína no soro da paciente não foi detectável por ensaios hemolíticos ou imunoquímicos. A biópsia renal mostrou proliferação endocapilar, difusão com aumento da matriz mesangial induzindo glomerulonefrite grave, alterações já descritas em outros casos de deficientes de C3 (Berger et al., 1983).

O caso de um garoto laociano com 7 anos de idade com deficiência da proteína C3 foi sucintamente descrito por Borzy e Houghton (1985). Além do baixo nível dessa proteína, o paciente apresentou episódios de infecções persistentes, hematúria, proteinúria, e a análise histopatológica renal mostrou sinais de mesangiopatia com glomerulonefrite transmembranar (Borzy, Houghton 1985).

Dois anos mais tarde em 1987, Cozma et al. (1987) relataram brevemente o caso de uma garota com 12 anos de idade com doença renal terminal e completa ausência da proteína C3. A paciente apresentou deterioramento gradativo do rim e posterior insuficiência renal. Uma biópsia deste órgão revelou 80% de esclerose glomerular com possível glomerulonefrite membrano-proliferativa do tipo I (Cozma et al., 1987).

No Brasil, o primeiro caso de deficiência de C3 foi descrito por Grumach et al. (1988). O paciente C.A sofria desde os 3 meses de idade com infecções recorrentes por *Giardia*, broncopneumonia, meningite, otite média, febre alta, artrite e infecção urinária. A dosagem do

C3 no soro da família foi 45mg/dL para a mãe, 71 mg/dL para o pai e de zero para a paciente (Normal: 70-154 mg/dL). Dos indivíduos testados, 8 membros da mesma família apresentaram nível normal dessa proteína, embora outros 4 estavam no limite mínimo de normalidade (Grumach et al., 1988). Mais tarde no nosso laboratório investigou-se o RNAm de C3 desse paciente, quando se descobriu a presença de um códon de parada prematura no éxon 30 causada pela substituição de um G por um A (G→A) na posição 1716 (Reis et al., 2002).

No mesmo ano, Borzy et al. (1988) estudaram o caso de um garoto de 10 anos de idade que, aos 5 meses, foi diagnosticado com infecção por *Streptolococcus pneumoniae*. Aos 7 meses foi internado com pneumonia lombar, aos 20 meses pela segunda vez teve infecção por *S. pneumoniae* que se repetiram aos 3 e aos 5 anos. Sua biópsia renal mostrou mesangiopatia e glomerulonefrite, mas ainda com função renal normal. Os níveis antigênicos de C3 no soro do paciente eram indetectáveis e no estudo da família apenas metade do nível desta proteína estava presente, quando comparado a um indivíduo normal (Borzy et al., 1988). Mais tarde, Singer et al. (1996) descreveram o caso desse paciente mais detalhadamente. Sua deficiência está associada ao baixo processamento, expressão e secreção de C3 pelas suas células. A expressão de RNA mensageiro de C3, tanto do paciente quanto dos seus parentes, foi muito baixa, quando comparadas com um indivíduo normal. Os dados sugeriram que o defeito genético esteja na mutação que afeta a transcrição do gene *C3*, o processamento do RNA e sua estabilização, embora fosse necessário o aprofundamento do estudo molecular para sua confirmação (Singer et al., 1996).

Um ano mais tarde foi feito o breve relato do caso de uma mulher com 28 anos de idade com completa ausência da proteína C3 do complemento. Ela sofreu desde a infância com infecções de repetição, dentre elas pneumonia, meningite meningocócica e otite média. (Weiss et al., 1989).

Botto et al. (1990) descreveram o caso de um paciente com 10 anos que apresentou quadros recorrentes de otite média, infecções respiratórias e seus pais possuíam histórico de consanguinidade. A análise genética do paciente mostrou uma substituição GT→AT na região 5' no sítio doador de *splicing* do éxon 18 causando a deleção do éxon 8 e gerando um códon de parada prematuro no RNAm de C3 levando à deficiência dessa proteína (Botto et al., 1990).

Imai et al. (1991) descreveram o caso de um homem com 23 anos de idade que desde 1984 sofria de proteinúria persistente e microhematúria. Aos 4 anos, ele apresentou meningite e

erupções cutâneas. Em sua família foram encontradas mulheres deficientes de C3 (homozigotas) portadoras de lúpus eritematoso sistêmico. A concentração de C3 foi < 1 mg/dL, < 9 U CH50/mL, a biópsia renal mostrou ligeira proliferação mesangial e glomerulonefrite, comum nos casos de pacientes homozigotos para a deficiência da proteína C3 (Imai et al., 1991).

Em 1992 foi relatado o caso de um neozelandês de 19 anos de idade que desde a infância apresentou episódios de febre alta, impetigo, pneumonia e meningococemia. A proteína C3 não foi detectada no soro. A atividade hemolítica dependente da via clássica foi zero, enquanto o normal é 1600 U CH50/mL e, sua atividade hemolítica mediada pela via alternativa foi 20 U AP50/mL contra 150 U AP50/mL do normal, confirmando sua deficiência (Peleg et al., 1992).

Ainda em 1992, Sanal et al. (1992) publicaram o caso de uma paciente com 4 anos de idade deficiente de C3. Seu histórico médico apresentou quadros de infecções piogênicas, otite média e meningites de repetição. Sua atividade hemolítica foi zero. Após a adição de C3 purificado no soro, a atividade hemolítica mediada pela via clássica subiu para 19,9 U CH50/mL enquanto no indivíduo controle foi 21,9 U CH50/mL (Sanal et al., 1992).

Outro paciente neozelandês com deficiência de C3 foi descrito por Singer et al. (1994). O estudo mostrou uma mutação no éxon 13 do cDNA do C3, alterando uma Asp para Asn em uma região importante e altamente conservada na cadeia β do C3. No mesmo ano Katz e colaboradores publicaram um estudo em que eles identificaram nesse paciente o defeito na secreção da proteína C3. Ensaio de imunoprecipitação e de imunofluorescência utilizando fibroblastos mostraram a presença do pró-C3 intracelular, entretanto a proteína C3 não foi detectada no meio extracelular explicando sua deficiência (Singer et al., 1994). Um ano depois novamente Katz e colaboradores descreveram outro estudo feito com a família desse paciente. O pai apresentou uma concentração de C3 de 68 mg/dL, a mãe 47 mg/dL e a irmã 165 mg/dL (normal= 130 mg/dL). Já atividade hemolítica da via clássica foi de 976 U CH50/mL para o pai, 925 U CH50/mL para a mãe e 1265 para a irmã (normal= 1370 U CH50/mL) (Katz et al., 1995).

Quatro anos mais tarde (2000), foi relatado o caso de duas irmãs japonesas por Matsuyama et al. (2000). A paciente 1 com 36 anos de idade, aos 16 desenvolveu sintomas de lúpus eritematoso sistêmico (SLE), mesma época do diagnóstico da deficiência de C3. A paciente 2 com 34 anos de idade foi diagnosticada com deficiência de C3 aos 14. A paciente 1 tinha o nível de C3 em 320 mg/dL e de 6,3 U CH50/mL. Já a paciente 2 tinha 270 mg/dL e 5,8 U CH50/mL (C3 Normal: 60-110 mg/dL e 40,0 U CH50/ mL). A análise molecular mostrou que as

irmãs apresentavam a substituição da base G→T na posição 3303 do cDNA do C3, causando um códon de parada prematura no éxon 26 do gene *C3*, resultando na deficiência de C3 (Matsuyama et al., 2000).

Mais tarde, em 2001 o nosso laboratório estudou o caso do paciente L.A.S então com oito anos de idade, histórico de consanguinidade e deficiente de C3 que sofria com adenites graves, sinusites, dois casos de tonsilites purulentas, broncopneumonia e infecção por *Giardia lamblia*. Sua dosagem de C3 foi 0,15 µg/mL. Tanto a atividade hemolítica mediada pela via clássica quanto pela via alternativa de seu soro foi zero, e a expressão de RNAm de C3 era reduzida (Ulbrich et al., 2001). Mais tarde, Reis et al. (2002) estudando este paciente em nosso laboratório descreveram que sua deficiência era desencadeada por um códon de parada prematura na posição 848 no éxon 20 do RNAm de C3 responsável pelos baixos níveis de RNAm desta molécula (Reis et al., 2004).

Já em 2005, no Japão, foi descrito o caso de um homem com 22 anos de idade diagnosticado com lúpus eritematoso sistêmico. Seu histórico mostrou infecções de repetição por pneumonia, febre alta e eritema. Seu nível de C3 não era detectado no soro e seus pais possuíam histórico de consanguinidade. A análise da sequência genética apontou uma mutação no sítio receptor de *splice* (AG→GG) no íntron 39 com uma alteração de 38 nucleotídeos, levando à deleção do éxon 39 do gene *C3*. Utilizando fibroblastos do paciente foi possível verificar a presença do pró-C3 intracelularmente, porém a proteína madura não foi detectada no meio extracelular (Tsukamoto et al., 2005).

Bhide (2006) relatou brevemente o caso de uma família deficiente da proteína C3 do complemento. A paciente 1, uma garota com 3 anos de idade sofria com cefaléia, febre, vômitos, otite média e episódios de infecção por *Staphylococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. Seu irmão, o paciente 2 com 10 anos de idade que apresentava histórico médico semelhante ao da irmã. A dosagem da atividade hemolítica mediada pela via clássica do paciente 1 foi de apenas 28,5% e, da paciente 2 de 33,7 %, contra 80-100% do normal e, seu nível de C3 foi de 0,06 g/L para ambas as crianças (Normal: 0.7-1,6 g/L) (Bhide, 2006).

Três anos mais tarde, em 2008, Kida et al. (2008) descreveram o caso de um paciente japonês heterozigoto para o gene *C3* com 22 anos de idade que desde os 2 anos apresentava infecções bacterianas recorrentes, meningites, bronquites e pneumonia. A concentração de C3 não era detectado no soro, apresentando < 12 U/mL de CH50 contra 35-45 U/mL do normal. A

inserção de um T na posição 3176 do éxon 24 e uma mutação não senso C3303G no éxon 26 resultaram em um códon de parada prematura responsáveis pela deficiência (Kida et al., 2008).

Singh et al. (2009) publicaram o estudo de uma garota que foi internada aos cinco anos de idade com febre alta, dor de cabeça, e sinais de meningite que foram confirmados após investigação médica. Porém a garota sofria desde o nascimento com histórico de infecções de repetição e novo quadro de meningite aos 3 meses. A concentração de C3 era 112 mg/dL bem abaixo de um indivíduo normal (770-1950 mg/dL). As causas da deficiência ainda não foram descobertas.

O caso de uma garota com 13 anos de idade deficiente da proteína C3 foi relatado em 2010. Em 1973 com cinco anos de idade a paciente desenvolveu caxumba, e três meses mais tarde edema generalizado com glomerulonefrite. Sua concentração de C3 no soro era muito baixa e a análise genética identificou uma mutação no éxon 29 do gene de C3. A mutação consiste na deleção de dois nucleotídeos (TT) na posição c.3736_3737 causando um stop códon na posição 1246 alterando TT por fenilalanina causando a deficiência da proteína C3 do complemento (Rodriguez-Marco et al., 2010).

Recentemente no Japão, estudos relataram o caso de um garoto com 4 anos de idade que apresentou dois episódios de infecções com bactéria *Streptococcus pneumoniae*, otite média aguda e gastroenterocolite. Seu nível de C3 era 0,3 mg/dL contra 75-150 mg/dL do normal e seus pais não tinha histórico de consanguinidade. O estudo genético apontou uma mutação não senso na região 1432C > T (Arg 478 terminal) no éxon 12 do gene C3 como causa da sua deficiência (Okura et al., 2011).

A deficiência de C3, como em alguns casos supracitados, é geralmente acompanhada pelo acúmulo de imunocomplexos. Quando a síntese desta proteína é reduzida ou até mesmo completamente ausente, isto pode contribuir para a deposição desses imunocomplexos em tecidos e órgãos causando lesões teciduais ou até mesmo falência do órgão em questão (Chen et al., 2010).

Pacientes deficientes da proteína C3 apresentam um quadro muito comum de infecções frequentes predominantemente bacterianas ou virais. Dos 31 casos aqui relatados, 14 apresentaram otite média, 8 apresentaram pneumonia, 10 apresentaram meningite e 6 relataram febre alta. Em alguns casos foi feito o diagnóstico da infecção caracterizada por *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli* e *Giardia* (Kida et al. 2008; Okura et al., 2011; Reis et al., 2006; Rodriguez-Marco et al., 2010; Singh et al., 2009).

Outros casos de pacientes deficientes de C3 apresentaram quadro de proteinúria, hematúria, faringite, lesões cutâneas, artrite e infecções respiratórias de repetição como bronquites e sinusite. Em apenas um caso houve de uma paciente que apresentou quadro de sepse por *Neisseria meningitidis*.

A deficiência da proteína C3 é rara na população mundial, com apenas 31 casos qui descritos desde 1972. Ao contrário de várias outras doenças genéticas, as mutações encontradas são exclusivas de cada caso. Observamos que em sua maioria são causados por alterações de nucleotídeos em uma posição específica, ou a deleção de um éxon gerando um códon de parada prematura causando a deficiência de C3, mas somente alguns casos tiveram suas bases moleculares definidas. Por essa razão e devido ao índice de pacientes deficientes de C3 com infecções constantes, é necessário o estudo aprofundado das causas moleculares desta deficiência e sua melhor compreensão para futuras terapias como alternativa de tratamento, e dessa forma promover uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho é caracterizar a deficiência primária de C3 e suas bases moleculares na paciente objeto de estudo.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os níveis de C3 e outras proteínas do sistema complemento no soro da família objeto de estudo e caracterizar a atividade hemolítica desse soro mediada pelas vias clássica e alternativa do complemento.

Caracterizar o padrão de herança desta deficiência na família objeto de estudo.

Determinar a capacidade de secreção de C3 em sobrenadante de cultura de fibroblastos da paciente e controle, estimulados por LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Histórico familiar

A família em estudo é natural da cidade de São Paulo. A paciente A.S.S nasceu em 24 de janeiro de 2006 e foi encaminhada para investigação desta deficiência pela Dra Anete Sevciovic Grumack da Faculdade de Medicina do ABC. De acordo com o histórico médico, a paciente sofre de repetidas infecções graves desde o nascimento. Com sete dias de vida, ela apresentou febre alta seguida de convulsões que levaram ao seu internamento em Unidade de Terapia Intensiva. Durante sua internação ela desenvolveu um quadro de hidrocefalia que foi tratada, obtendo alta 17 dias depois. Com 1 ano de idade, a paciente foi novamente internada em UTI por celulite periorbital e, após alta, apresentou quadro de repetidas infecções das vias aéreas superiores. Com 2 anos de idade, a paciente sofreu nova internação por celulite cervical e infecção aguda das vias aéreas superiores (IVAS). Com 3 anos de idade, sofreu nova internação por pneumonia causada por *S. pneumoniae*.

Para investigar a possibilidade de deficiência de complemento ou deficiência de imunoglobulinas, pesquisou-se as concentrações das proteínas C3 e C4, e de IgA, IgG e IgM, foram determinadas no soro da paciente, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1 - Quantificação das concentrações séricas de C3, C4 e imunoglobulinas

Paciente	Proteínas (mg/mL)		Igs (mg/mL)		
	C3	C4	IgA	IgG	IgM
2 anos	<0,10	0,15	<0,41	5,29	1,35
3 anos	<0,04	0,18	0,30	9,18	1,60
Valores normais*	0,90 a 1,80	0,10 a 0,40	Não informado	Não informado	Não informado

Dados fornecidos pela Dra Anete Sevciovic Grumack da Faculdade de Medicina do ABC.

*De acordo com os valores de referência adotados pelo Laboratório de Imunologia Humana do Instituto de Ciências e Biomédicas da Universidade de São Paulo do Dr Antonio Condino Neto IgA: 3 meses - 3,9 anos = 0,04 - 1,76 mg/mL; IgG: 3 meses - 17,9 meses = 2,96 - 9,36 mg/mL; IgM: 3 meses - 11,9 meses / Feminino = 0,3 - 0,91 mg/mL.

A porcentagem de leucócitos presente no sangue da paciente foi determinada, conforme ilustrada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos

Tipos celulares	Paciente (%)	Paciente (nºcels/mL)	Valores normais (%)	Valores normais (nºcels/mL)
Leucócitos totais	Não informado	12.960	Não informado	4.000-10.000
Neutrófilos bastonetes	Não informado	Não informado	3±2	50-5.000
Neutrófilos segmentados	44	5.663	56±10	2.300-6.600
Linfócitos	45	5.897	30±10	1.000-4.000
Monócitos	6	726	6±4	100-1.000
Eosinófilos	4	492	3±2	50-500
Basófilos	1	168	<1	25-80

Dados fornecidos pela Dra Anete Sevciovic Grumack da Faculdade de Medicina do ABC.

3.2 Biópsia da pele e coleta do soro

Após consentimento livre e esclarecido, este estudo foi iniciado seguindo as normas da Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências e Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foi feita uma biópsia da pele da paciente, do controle e dos familiares, conforme descrito em Vyse e colaboradores (1996). As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DEMEM) (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) previamente inativado por 1 h a 56 °C (SFBi), e 1% de glutamina. A cultura foi mantida primeiramente em garrafas de 25 cm² e 75 cm² e, após proliferação, as células foram posteriormente congeladas em dimetilsulfóxido a 10% contendo SFBi 90% e estocadas em nitrogênio líquido. Quando necessário, as células foram descongeladas e mantidas em cultura.

O sangue foi coletado, mantido em gelo por 60 min e centrifugado a 2000 x g por 15 min a 4 °C. Depois desse processo o soro foi coletado, dividido em alíquotas que foram imediatamente armazenadas em congelador a -80 °C até o momento do uso.

3.3 Determinação da concentração de proteínas por imunodifusão radial

Para quantificar as proteínas C3, C4, FH, FI e FB do sistema complemento nos soros desta família, utilizamos o método de imunodifusão radial simples (Mancini et al., 1965). Uma placa de vidro de 8 x 8 cm foi previamente revestida com 2 mL de agarose a 1% em água destilada, e secas em estufa a 37 °C. Posteriormente, esta placa foi recoberta com 6 mL de agarose (1% em PBS) contendo anticorpos policlonais específicos para cada proteína (Complement Technology, Tyler, Texas, USA) diluídos a 2%. Uma vez solidificada esta segunda camada de agarose, foram feitos poços de 3 mm de diâmetro onde foram adicionados (duplicatas) 5 µL de soro da paciente, cada membro da família e controle. A placa foi incubada por 48 h no caso de C3, C4 e FI, e por 24 h para FB e FH em câmara úmida a 4 °C, para difusão das amostras e formação do halo de precipitação. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com solução fisiológica (NaCl 150 mM) por 24 h a 4 °C. Depois de secas, as placas foram coradas com azul de Coomassie por 20 min, e o excesso descorado por 2 h.

Para a construção da curva padrão, incluímos uma mistura de soros humanos de 50 indivíduos normais, com concentrações das proteínas do complemento determinadas previamente. Para essa curva, adotamos as seguintes diluições para o soro: 100%, 50%, 25% e 12,5%. As diluições foram representadas como “x”, e o diâmetro do halo formado em “y” em mm². Sendo assim, construímos uma curva de regressão linear do tipo $y = a x + b$, para obtermos a concentração das proteínas de interesse. Somente consideramos os valores, quando $R^2 \geq 0,95$. A determinação da concentração proteica foi feita em duplicata.

3.4 Atividade hemolítica mediada pela via alternativa do sistema complemento

Para o ensaio hemolítico da via alternativa do complemento, utilizamos 3 mL de uma suspensão de hemácias de coelho (1:2) em Alsever estéril (Bioboavista, Valinhos, SP, Brasil) completando para 15 mL com solução tampão AP-CTD (AP-CTD: VBS⁻ [NaCl 20,95 g; Na Barbital 0,5 g; ácido barbitúrico 1,15 g; pH= 7,2]; EGTA 0,2 M; MgCl₂ 0,2 M). Lavamos a suspensão de hemácias 3 vezes após centrifugação a 2500 x g a 4 °C por 15 min. Após descartar o sobrenadante, coletamos 100 µL da papa de células ressuspensando-a em 9,9 mL de AP-CTD.

As hemácias diluídas (100 µL) foram distribuídas em tubos contendo as diluições 1:4, 1:8, 1:10, 1:16 e 1:32 dos soros da família, da paciente e do controle. Em seguida, incubamos a reação em banho-maria por 30 min a 37 °C. Passado este período adicionamos 900 µL de tampão VBS⁻ EDTA (VBS⁻ 5x; EDTA 0,2 M) para interromper a ativação, seguido por centrifugação a 2500 x g por 10 min a 4 °C (Nilsson, Nilsson 1984). Como controle, incubamos as hemácias apenas com a solução VBS⁻ EDTA (0%); com H₂O para obtermos a lise total de hemácias (100%). Para cada amostra removemos 350 µL (em duplicata) do sobrenadante e transferimos para uma nova placa, a qual foi lida no leitor Espectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, USA) a 405 nm. Os valores encontrados em cada soro foram comparados com o esperado para lisar 100% de hemácias descontando-se o controle negativo (branco). A porcentagem de lise foi medida como segue:

$$\% \text{ de lise} = \frac{\text{D.O amostra} - \text{D.O branco}}{\text{D.O 100\% Lise} - \text{D.O branco}} \times 100$$

Com este cálculo e preparo da curva, obtivemos o volume de soro necessário para lisar 50% de eritrócito, este volume corresponde a uma unidade AP50. O ensaio da atividade hemolítica da via alternativa foi feita em duplicata.

3.5 Atividade hemolítica mediada pela via clássica do sistema complemento

Para esta determinação, utilizamos 7 mL de suspensão de hemácias de carneiro em Alsever estéril 1:2 BBV (Bioboavista), e completamos para 15 mL com solução tampão VBS⁻ (VBS⁻; MgCl₂ 0,2 mM; CaCl₂ 50 mM). Lavamos as hemácias 3 vezes por centrifugação a 2500 x g a 4 °C por 15 min. Após descartar o sobrenadante, adicionamos 7 mL de VBS⁺⁺ (VBS⁻; MgCl₂ 0,2 mM; CaCl₂ 50 mM) e 70 µL de hemolisina (soro de coelho anti-hemácias) 1:100. Após incubarmos a reação em banho-maria por 30 min a 37 °C, lavamos 1 vez por centrifugação a 2500 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, descartamos o sobrenadante e completamos para o

volume inicial com VBS⁺⁺, homogeneizamos e retiramos 100 µL de hemácias onde foram adicionados 4,9 mL de H₂O Milli-Q estéril. Após esta etapa, diluímos as hemácias em tampão VBS⁺⁺ 1:160, e distribuímos 1,1 mL em tubos contendo as diluições 1 µL, 1,25 µL, 1,5 µL, 1,75 µL e 2,0 µL de soro da família, da paciente e do controle. Incubamos os tubos em banho-maria por 30 min a 37 °C, seguido de centrifugação a 2500 x g por 10 min a 4 °C (Nilsson, Nilsson 1984). Como controle, incubamos as hemácias com a solução VBS⁻ EDTA (0%) ou com H₂O para obtermos a lise total de hemácias (100%). Para cada amostra, 350 µL (em duplicata) do sobrenadante foram removidos e transferidos para uma nova placa, a qual foi lida no leitor Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) a 405 nm. Os valores encontrados em cada soro foram comparados com o esperado para lisar 100% de hemácias descontando-se o controle negativo (branco). A porcentagem de lise foi medida como segue:

$$\% \text{ de lise} = \frac{\text{D.O amostra} - \text{D.O branco}}{\text{D.O 100\% Lise} - \text{D.O branco}} \times 100$$

Com este cálculo e preparo da curva, obtivemos o volume de soro necessário para lisar 50% de eritrócito. Este volume definirá uma unidade CH50. O ensaio da atividade hemolítica da via clássica foi feita em duplicata.

3.6 Cultura de fibroblastos e estimulação com LPS

A partir da biópsia da pele, os fibroblastos foram cultivados em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, em meio de cultura DEMEM, enriquecido com 10% de SFBi e 1% de glutamina.

Após proliferação celular, os fibroblastos foram removidos com uma solução de tripsina 0,1% (pH=7,8 contendo glicose 5,5 mM; NaCl 137 mM; KH₂PO₄ 5,3 mM; NaHCO₃ 4,2 mM e EDTA 0,5 mM). Amostras de 10⁶ células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm², onde foram cultivadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, em DEMEM enriquecido com 1% de glutamina 2 mM. Depois de 24 h, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de

lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*- (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) por 24 h. Estas células foram estimuladas entre os repiques R3 e o repique R8. Com este estímulo induzimos um aumento na expressão e secreção desta proteína pelos fibroblastos em cultura.

3.7 Extração de RNA de fibroblastos estimulados com LPS.

Após o estímulo dos fibroblastos com LPS, as células foram removidas com uma solução de tripsina e centrifugadas a 2000 x g por 10 min a 4 °C. Desprezado o sobrenadante, adicionamos 1 mL de Trizol® Reagent (Life Technologies) e após ação mecânica lisamos as células. Depois de manter a preparação por 5 min à temperatura ambiente, adicionamos 200 µL de clorofórmio (Merck, São Paulo, SP, Brasil), passamos o tubo em vórtex por 15 s, e incubamos novamente por 5 min à temperatura ambiente. Centrifugamos cada amostra a 12.000 x g por 15 min a 4 °C para, dessa forma, separar o RNA total dos demais componentes na camada superior incolor. Em um tubo estéril, recolhemos aproximadamente 2 mL de suspensão, adicionamos 500 µL de isopropanol (Merck), e misturamos cuidadosamente o conteúdo três vezes por inversão. Feito isso, incubamos por 10 min à temperatura ambiente seguido por centrifugação em 12.000 x g por 10 min a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante, lavamos o precipitado com 1 mL de etanol 75% por centrifugação a 7.500 x g por 5 min a 4 °C. Secamos o precipitado em cabine de segurança biológica, e adicionamos 15 µL de UltraPure DNase/RNase-Free (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Incubamos o RNA por 10 min a 55 °C para dissolver o precipitado (Chirgwi et al.,1979). A concentração e integridade do RNA total extraído foi determinada por Nanodrop 2000 (Spectrophotometer Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos, USA) aceitando-se a pureza relativa (D.O. 260 nm/D.O. 280 nm) entre 1,8 e 2,0. Após a quantificação do RNA total, procedemos com a etapa abaixo.

3.8 Extração de DNA genômico de fibroblastos

As células (10^6) foram destacadas da garrafa de cultura com uma solução de tripsina 0,01% e centrifugadas a 2000 x g por 10 min a 4 °C. A extração foi feita utilizando o kit *Illustra*

tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Inglaterra, Reino Unido), conforme indicação do fabricante.

3.9 Síntese de cDNA empregando transcriptase reversa e amplificação por reação em cadeia utilizando DNA polimerase (RT-PCR)

A síntese de cDNA foi feita utilizando o *kit M-MLR Reverse Transcriptase* (28025-013 Invitrogen), Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (18418-012 Invitrogen) e RNaseOUT™ (10777-019 Invitrogen), conforme indicação do fabricante. A reação foi submetida ao seguinte programa: Etapa 1: 65 °C por 5 min, Etapa 2: 0 °C por 1 min, Etapa 3: 37 °C por 2 min, Etapa 4: 25 °C por 10 min, Etapa 5: 37 °C por 50 min, e Etapa 6: 70 °C por 15 min.

A amplificação por RT-PCR foi feita utilizando o *kit Illustra™ Taq DNA Polymerase* (GE Healthcare), conforme indicação do fabricante, com pares de iniciadores para o gene *C3* e fragmento de DNA genômico (**Tabela 3**). Para a amplificação propriamente dita empregamos o seguinte programa: Etapa 1: 94 °C por 5 min, Etapa 2: 94 °C por 30 s, Etapa 3: 54 °C por 30 s, Etapa 4: 72 °C por 1 min, Etapa 5: 39 repetições dos passos 2 ao 4 e, por fim, Etapa 6: 72 °C por 7 min. Para essas reações utilizamos o termociclador PTC 100 TM Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc, Watertown, Estados Unidos, USA).

Os resultados foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1X (TBE pH 8,0, ácido bórico 89 mM, Tris-HCl 89 mM e 0,4% de EDTA 0,5 M pH=8,0). A coloração do gel foi feita com *Sybr Safe DNA gel stain* (Invitrogen). Ao término da corrida, o gel foi observado no ImageQuant 300 (GE Life Sciences, Inglaterra, Reino Unido), utilizando luz ultravioleta para evidenciar as bandas dos produtos amplificados. Também foram tiradas fotos dos géis de agarose utilizando este mesmo equipamento.

3.10 Purificação dos produtos de RT-PCR

A purificação do DNA foi feita utilizando o *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Em 100 µL de reação PCR, adicionamos 500 µL de tampão de captura e após homogeneizar o volume completo, é transferido para o sistema previamente

montado de coluna de filtração. Centrifugamos por 30 s a 16000 x *g* em temperatura ambiente e descartamos o conteúdo do tubo. Feito isso, adicionamos 500 µL de tampão de lavagem na coluna, e centrifugamos por 30 s a 16000 x *g* em temperatura ambiente. Descartamos o conteúdo do tubo, adicionamos 15 µL de tampão de eluição na coluna, incubamos por 60 s, e centrifugamos por 60 s a 16000 x *g* em temperatura ambiente. A concentração e integridade do cDNA total extraído foi determinada empregando-se o equipamento Nanodrop 2000 (Spectrophotometer Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos, USA), aceitando-se a pureza relativa (D.O. 260 nm/D.O. 280 nm) entre 1,8 e 2,0. Após quantificação do cDNA total, foi realizada a reação de sequenciamento.

3.11 Sequenciamento do cDNA de C3 humano e DNA genômico do gene de C3

O sequenciamento dos fragmentos de cDNA e do próprio gene C3 (**Figura 5**) foi feito utilizando-se entre 200 ng e 300 ng de DNA total, iniciadores específicos conforme **Tabela 3**, além de H₂O Milli-Q estéril e a enzima BigDye (Invitrogen). Na reação de sequenciamento utilizamos apenas um dos oligos, e realizamos duas reações, uma reação foi amplificada no sentido 5'-3' e outra no sentido 3'-5'.

Tabela 3 - Iniciadores e posição dos nucleotídeos (nt) utilizados para RT-PCR e reação de sequenciamento*.

INICIADORES (nT)	SENTIDO	Sentido 5'→ 3'	Tm (°C)
1-21	F	CTCCTCCCCATCCTCTCCCTC	66
530-599	R	TGTTGACCATGACCGTCCGGCCACGGGTA	66
530-602	F	GGTCAAGCAGGACTCCTTGTC	55
1063-1044	R	TGAGTGCAAGATGACGGTGG	55
834-855	F	GTTCTCTACGGGAAGAAAGT	55
1553-1531	R	CCCTTGTTTCATGATCAGGTAGG	58
1540-1560	F	ATCATGAACAAGGGCAGGCTG	64
2240-2220	R	GCAGTCCAGGAAGACATTCTT	64
1841-1855	F	TCATGGTGGCCGTGG	55
2643-2663	R	CTTGAGCTCTTGGTTCTGCC	55
2504-2523	F	TCTGTGTGGCAGACCCCTTC	58
3194-3214	R	CCTTCTTGATGAGCTCCAAGG	58
3011-3032	F	TGGCCAGATGACAGAGGATG	60
3413-3433	R	TCACGGGCGCATCCTCTGGA	60
3308-3329	F	GTCAAGGTCTTCTCTCTGGCT	60
3960-3940	R	CAGTTGGAGGGACACATCAAG	66
3839-3859	F	GATACTACGGTGGTGGCTATG	60
4404-4425	R	CTCAGAGTGTGAGACCTTGTC	60
4278-4297	F	CATGATGACTGGCTTTGCTC	64
5067-5047	R	GGAATGGGGGTGTGGTCAGTT	64
6690961	F	GGATCAGACCGTTGTACCCATT	60
6690313	R	GCAGACAGAAAGAATCCCCACC	60

Sentidos dos iniciadores integrado (F) e retrógrado (R), temperatura de hibridação (Tm °C).

Figura 7 - Representação esquemática das regiões do cDNA de C3 que foram amplificadas e sequenciadas

C3 cDNA (5027 pb). Os números em **negrito** correspondem aos iniciadores utilizados, e os números em parênteses correspondem ao tamanho do fragmento em pb.

A reação de sequenciamento do cDNA foi realizada com o seguinte programa: Etapa 1: 96 °C por 2 min, Etapa 2: 96 °C por 45 s, Etapa 3: 50 °C por 30 s, Etapa 4: 60 °C por 4 min, Etapa 5: 39 repetições dos passos 2 ao 4 e, por fim, Etapa 6: 60 °C 4 min. Em seguida, as amostras foram precipitadas com 80 µL de isopropanol 75% à temperatura ambiente por 15 min, e centrifugada por 20 min a 8000 x g. As amostras foram lavadas com 200 µL de isopropanol 75% e centrifugadas por 5 min 8000 x g. Ao final, o isopropanol foi descartado permitindo que as amostras secassem. A corrida eletroforética para o sequenciamento de nucleotídeos foi realizada no Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da USP, empregando o sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer/HITACHI (Applied Biosystems Foster, Carlsbad, Califórnia, EUA). As sequências obtidas do cDNA e do DNA genômico foram comparadas com os dados depositados no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, utilizando o programa BLAST N (Altschul et al., 1997) com a referência /NM 000064.1/ C3/ *Homo sapiens complement component 3 (C3) mRNA* para cDNA de C3 (De Bruijn, Fey 1985) e http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000125730;r=19:6677715-6730573 para DNA genômico. Todas as sequências foram analisadas por meio do programa Bio Edit.

3.12 Concentração de sobrenadante de fibroblastos estimulado com LPS

A partir da biópsia da pele, os fibroblastos foram cultivados em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, em meio de cultura DEMEM, enriquecido com 10% de SFBi e 1% de glutamina.

Após proliferação celular, os fibroblastos foram removidos com uma solução de tripsina 0,1% (pH=7,8 contendo glicose 5,5 mM; NaCl 137 mM; KH₂PO₄ 5,3 mM; NaHCO₃ 4,2 mM e EDTA 0,5 mM). Amostras de 10⁶ células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm², onde foram cultivada em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, em DEMEM enriquecido com 1% de glutamina 2 mM. Depois de 24 h, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*- (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) por 24 h. Passado esse período, o sobrenadante foi coletado em tubo estéril (30 mL total) e concentrado (30 vezes) em sistema de ultrafiltração Amicon® Ultra centrifugal Filters Ultracel 30K (Merck S.A). Feito isso, quantificamos as proteínas totais utilizando o kit *BCA TM Protein*

Assay Kit (Thermo Scientific), conforme indicação do fabricante. Posteriormente as amostras foram submetidas à técnica de *Western blotting*.

3.13 Western blotting

As amostras de soro da família da paciente foram submetidas à eletroforese em gel (SDS-PAGE) 10% em tampão de corrida Tris glicina (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), por um período de 30 min em 60 V, e por mais 1 h em 120 V.

Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (7,5 cm por 9,0 cm Hybond *ECL Nitrocellulose Membrane*, Amersham Biosciences, GE Healthcare), e transferido usando a solução (Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 192 mM, SDS 0,02% e etanol 20%), por 1 h a 350 A. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com 10% de leite desnatado em tampão fosfato (cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 10 mM e fosfato monobásico de potássio 1,7 mM, pH =7,4[*PBS*]) com detergente Tween 0,05% (*PBS* contendo *Tween* 20 0,05% [*PBS-T*]) por 18 h a 4 °C. Após 3 lavagens por 3 min com *PBS-T*, as membranas foram incubadas com anti-C3 humano policlonal produzido em cabra (Complement Technology) diluído 1:5000, por 1 h em 10% de leite desnatado em *PBS-T*. Depois da incubação, lavamos a membrana 3 vezes por 5 min com *PBS-T*, e a incubamos com anti-IgG de cabra (policlonal) produzido em coelho (KPL) conjugado à peroxidase (1:10000) por 1 h em 10% de leite desnatado em *PBS-T*. Novamente lavamos a membrana com *PBS-T* por 5 min por 3 vezes. A revelação foi feita com ECL (Enhanced Chemiluminescence System, Amersham) (Thermo Scientific) segundo instruções do fabricante. A densitometria foi feita utilizando o programa Image J.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da concentração de proteínas por imunodifusão radial

A concentração reduzida de C3 pode ser observada tanto em pacientes com deficiência primária de C3 ou como consequência da deficiência FI ou FH. Estas proteínas são fundamentais para a regulação da alça de amplificação da via alternativa. Na ausência de uma delas, há um consumo exagerado de C3 e redução dos níveis séricos de FB (Walport, 2001). Para eliminar esta hipótese e averiguar que se tratava realmente de deficiência primária de C3, nosso primeiro passo foi quantificar a concentração dessas proteínas, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4 - Quantificação da concentração sérica de proteínas FB, FH, FI e C3 por imunodifusão radial

Fator pesquisado	FB mg /mL	FH mg /mL	FI mg/mL	C3 mg/mL
Paciente	0,26	0,57	0,043	Ausente
Pai	0,17	0,47	0,051	0,52
Mãe	0,25	0,38	0,044	0,18
Irmão	0,35	0,48	0,040	0,37
Mistura de soro de 50 indivíduos normais	0,22	0,44	0,047	1,40
<hr/>				
Média	0,34	0,60±0,26	0,058±0,016	0,90
Intervalo de normalidade	0,21-0,59	0,23-1,31	0,030-0,103	0,61-1,41
Faixa etária	5 – 6 anos	1 -5 anos	1 -5 anos	3 – 4 anos
Referências	Ferriani et al 1999	Ferreira de Paula et al 2003	Ferreira de Paula et al 2003	Ferriani et al 1999

No momento da coleta de soro a paciente tinha 3 anos de idade.

Observamos que os níveis de FB, FH e FI no soro da paciente A.S.S encontram-se dentro do intervalo de normalidade (Ferriani et al., 1999; Ferreira de Paula et al., 2003). O soro do pai apresentou concentração de FB abaixo da média, e do intervalo de normalidade. Já os níveis da

proteína C3 de todos os membros da família se mostraram abaixo do esperado para um indivíduo normal, e em especial no soro da paciente esta proteína não foi detectável, sugerindo um padrão de herança autossômica recessiva, conforme heredograma abaixo.

Figura 8 - Heredograma da família objeto de estudo

Heredograma da família objeto de estudo. ▴ indivíduo heterozigoto do sexo masculino. ▾ indivíduo heterozigoto do sexo feminino. □ indivíduo do sexo masculino. ● paciente afetada. Barra dupla indica consanguinidade (pais são primos em primeiro grau). [] indica a concentração da proteína C3 no soro. Valor normal de C3 para adultos: 1,3 mg/mL (Vick et al., 1991).

4.2 Análise da atividade hemolítica mediada pela via alternativa do sistema complemento

Com o intuito de verificar a funcionalidade da via alternativa, avaliamos a capacidade do soro em ativar o complemento e lisar hemácias de coelho, conforme a **Tabela 5**.

Tabela 5 - Atividade hemolítica mediada pela via alternativa do sistema complemento

Indivíduos	AP50 U/mL
Paciente	zero
Pai	75,6
Mãe	82,5
Irmão	69,0
Mistura de soro de 50 indivíduos normais	130,5
Valor de referência	106,1 +/- 27,1 U/mL

4.3 Análise da atividade hemolítica mediada pela clássica do sistema complemento

Nós também verificamos a capacidade de ativação da via clássica do complemento, conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6 - Atividade hemolítica mediada pela via clássica do sistema complemento

Indivíduos	CH50 U/mL
Paciente	zero
Pai	61,5
Mãe	133,1
Irmão	229,5
Mistura de soro de 50 indivíduos normais	606,9
Valor de referência	628,3 +/- 130,3 U/ mL

Os dados indicaram que as atividades hemolíticas mediadas pela via alternativa, assim como pela via clássica, no soro de todos os membros da família estavam abaixo dos níveis normais, quando comparados a uma mistura de soro de 50 indivíduos normais, e abaixo dos valores de normalidade previamente estabelecidos em nosso laboratório. Em acordo com esta observação, a concentração sérica da proteína C3 dos membros da família também é menor, quando comparada com a de uma mistura de soro de 50 indivíduos normais, e abaixo do intervalo de normalidade.

Esses dados são coerentes com a suposição que os pais são heterozigotos para deficiência da proteína C3 encontrada na paciente, embora seja necessário o sequenciamento genético para esta confirmação.

4.4 Análise por *Western blotting* da presença de C3 nos soros da família e análise densitométrica

Em seguida nós analisamos por *Western blotting* a presença de C3 no soro de cada membro da família, e de um indivíduo controle, conforme mostrado na **Figura 9**.

Figura 9 - Análise por *Western blotting* da presença de C3 no soro da família

Cadeia α de C3 com 115 kDa e Cadeia β com 75 kDa. SDS-PAGE (10%); empregamos anti-C3 humano (1:5000) e anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10000). **A** = Soro da paciente (400 ng/μL) e demais soros (200 ng/μL) de proteína total. **B** igual volume (0,22 μL) de cada soro foi aplicado do gel. Controle: soro humano de indivíduo normal M = marcador de peso molecular.

Tabela 7 - Análise densitométrica

	Densidade (UA) ^a	% C3 ^b
Paciente	0,0 ± 0,0	0,0
Pai	108,3 ± 2,1	70,6
Mãe	113,2 ± 2,1	73,8
Irmão	126,9 ± 2,2	82,8
Normal	152,1 ± 1,7	----

^a A densidade de cada banda foi representada em unidades arbitrárias (UA) e mensurada usando o programa Image J. Os números correspondem à média de três experimentos independentes (média ± desvio padrão).

^b O percentual de C3 foi calculado considerando-se como 100% os valores obtidos com o indivíduo controle considerando a soma da intensidade das duas bandas equivalente as duas cadeias α e β de C3, representadas na figura 9B.

Nós confirmamos a ausência da proteína C3 no soro da paciente (**Figura 9**), mesmo utilizando uma concentração duas vezes maior de proteínas (400 ng/ μ L para a paciente e 200 ng/ μ L para os demais indivíduos). Interessante notar que as bandas correspondentes a ambas cadeias α e β de C3 nos soros dos demais membros da família são relativamente menos intensas que as do indivíduo controle, embora esta não seja uma técnica quantitativa. O mesmo se repetiu quando realizamos o mesmo experimento com igual volume de soro para todos os membros da família e um indivíduo controle. Observamos pela densitometria feita a partir da análise por *Western blotting* da **Figura 9B** que o resultado foi zero quando comparada a banda do indivíduo controle.

A próxima etapa do nosso trabalho foi investigar as bases moleculares da deficiência da proteína C3 na paciente deficiente. Para isso nós estimulamos uma cultura de fibroblastos obtidos a partir de biópsia da pele da paciente e de um indivíduo controle. Após tratamento com LPS por 24 h, extraímos o RNA total por Trizol, conforme descrito em Materiais e Métodos. Utilizando pares de iniciadores específicos (**Tabela 3**), amplificamos as regiões do pró-C3 cDNA, conforme indicado na **Figura 7** por RT-PCR.

4.5 Análise do gel de agarose com regiões do cDNA de C3 amplificados por RT-PCR

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos de C3 cDNA amplificados por RT-PCR

Em parênteses está indicado o tamanho de cada fragmento em pares de base (**pb**). Em negrito estão representadas as letras equivalentes a cada fragmento (conforme **Figura 9**). N indica indivíduo normal e P indica paciente deficiente. Região H* correspondente à região afetada. **M** indica o marcador de tamanho.

Quando analisamos os fragmentos amplificados por RT-PCR, observamos que a banda correspondente ao fragmento H do cDNA do C3 da paciente migrou mais rapidamente do que a banda correspondente ao indivíduo controle (**Figuras 10 e 11**), indicando com isso que se trata de uma região com possível deleção de nucleotídeos.

4.6 Análise do gel de agarose do fragmento H amplificado por RT-PCR

Nosso passo seguinte foi amplificar novamente a região H do cDNA do C3 da paciente, demais membros da família e do indivíduo controle. Em seguida, submetemos o produto desta amplificação a uma nova corrida eletroforética (**Figura 11**).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1%) com fragmentos amplificados por RT-PCR da região H (3308-3960 nt) do cDNA de C3

Controle normal com 652pb; paciente deficiente com 553pb. M= marcador de peso molecular.

Após a corrida eletroforética, observamos diferença entre o tamanho das bandas do fragmento H dos membros desta família e o controle normal. O cDNA de C3 de indivíduo normal gerou uma única banda de 652 pb, enquanto do pai e da mãe amplificaram duas bandas, uma com 652 pb equivalente ao alelo normal e outra com 553 pb equivalente ao alelo mutado, confirmando a heterozigose para o gene *C3*. O cDNA de C3 do irmão também gerou duas bandas (652 pb e 553 pb) assim como os pais, já a paciente apresentou apenas uma banda com 553 pb produto de ambos os alelos mutados.

Depois desta análise, sequenciamos todo os nucleotídeos do C3 cDNA e parte do gene *C3*.

4.7 Análise do sequenciamento genético da região H do cDNA de C3 e do gene *C3*

Ao analisar o sequenciamento dos nucleotídeos do C3 de cDNA da paciente dos fragmentos A, B, C, D, E, F, G, I e J (**Figura 7**) não foram encontradas mutações, porém o sequenciamento do fragmento H indicou a sequência contínua do éxon 26 com o éxon 28, deleção completa do éxon 27, conforme mostra a **Figura 12**.

Figura 12 - Sequenciamento dos nucleotídeos do fragmento H do cDNA de C3

Sequenciamento dos nucleotídeos 3308 a 3960 (fragmento H) do cDNA de C3 (5'→3'). Em **A** temos uma figura esquemática representando a junção do éxon 26, éxon 27 e éxon 28 do cDNA de C3 normal. Em **B** temos a junção entre o éxon 26 e o éxon 27 de um indivíduo normal, e a junção entre o éxon 27 e o éxon 28 do mesmo indivíduo normal. Em **C** temos o éxon 26 e éxon 28 da paciente, portanto com deleção do éxon 27.

O éxon 27 é formado por uma sequência de 99 nucleotídeos posicionados entre 3450 e 3549 do cDNA do C3. Esta região codifica para 33 aa (posição 1131-1163 na cadeia α de C3), e sua ausência pode implicar em sérias consequências para estabilidade e secreção da proteína C3 do complemento humano.

Com o intuito de verificar se a deleção do éxon 27 de C3 da paciente seria causada pela mutação em um nucleotídeo localizado nas sequências intrônicas conservadas GT-AG do gene C3, nós realizamos o sequenciamento genético dessas regiões empregando DNA genômico conforme **Figura 13**.

Figura 13 - Sequenciamento dos nucleotídeos da região 6690313 até 6690961 do gene *C3* correspondendo aos limites do íntron 26-éxon 27 e éxon 27-íntron 27

Em **A** temos representação da junção do íntron 26, éxon 27 e íntron 27. Em **B** temos as sequências AG intrônicas (íntron 26- éxon 27) e a sequência GT (éxon 27- íntron 27). As setas mostram dois picos (heterozigose) no gene *C3* dos pais, e irmão enquanto a paciente apresentou apenas um único pico (homozigose) (GT→GC), quando comparado ao gene de *C3* do indivíduo normal.

Ao analisar o sequenciamento do gene na posição 6690626 do genoma humano, observamos a troca do nucleotídeo T por um C (T→C) na paciente, quando comparado ao indivíduo controle, o que acreditamos explica a causa da deficiência da proteína C3 na A.S.S. Esta mutação gera um *splicing* alternativo que exclui o éxon 27 do RNAm do cDNA do C3, que pode levar a síntese de uma proteína mutante que é degradada ainda dentro da célula.

4.8 Análise por Western blotting da presença de C3 no sobrenadante em cultura de fibroblastos estimulados com LPS da família

Com o intuito de verificar a hipótese da síntese de uma proteína instável que poderia sofrer degradação intracelular, nós cultivamos fibroblastos da paciente, sua família e de um indivíduo controle. Após estimulação com LPS por 24 h, nós coletamos o sobrenadante, concentramos por ultracentrifugação e, em seguida, analisamos a presença de C3 por *Western blotting*.

Figura 14 - Análise por *Western blotting* de sobrenadante de fibroblastos estimulados com LPS por 24 h

Cadeia α com 115 kDa e Cadeia β com 75 kDa. Gel SDS-PAGE (10%) utilizando anti-C3 humano (1:5000) e anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10000).

Ao analisarmos por Western blotting o sobrenadante de fibroblastos estimulados com LPS, constatamos a presença da cadeia α e da cadeia β de C3 no indivíduo normal. O pai apresentou a cadeia α assim como a mãe, e o irmão não apresentou esta cadeia. Acreditamos que a ausência da cadeia β nos pais e das cadeias α e β no irmão ocorreu devido a pouca quantidade de C3

secretado pelos fibroblastos estimulados, e pela degradação sofrida pela proteína. Na paciente não foi possível identificar nenhuma das cadeias α ou β . Esta análise está sendo repetida no momento.

5 DISCUSSÃO

O sistema complemento quando ativado gera importantes mecanismos efetores para a defesa contra patógenos, participando tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adquirida. Composto por aproximadamente 40 diferentes proteínas, a deficiência de qualquer uma delas pode levar muitas vezes a defeitos nas vias de ativação ou de regulação e assim trazer sérias consequências ao seu hospedeiro. A deficiência da proteína C3 é rara na população, e como componente central deste sistema, sua ausência causa infecções graves e repetidas por bactérias como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, entre outros microorganismos (Reis et al., 2006).

O tratamento de pacientes deficientes de C3 é feito normalmente com a administração de antibióticos para eliminação do patógeno causador da infecção, porém o tratamento com infusão de plasma normal ou componentes purificados do complemento foi estudado em pacientes deficientes de C3 e FI, demonstrando restaurar as funções imunológicas do paciente por cerca de 15 dias. Porém o risco de sensibilização do sistema imune pela produção de auto-anticorpos é muito alto possibilitando o desenvolvimento de doença auto-imune, o que torna tal tratamento empregado apenas em casos extremos (Alper et al 1970, Barrett, Boyle 1984; Ziegler et al., 1975). O mais indicado (somado a administração de antibióticos) ainda é a imunização (quando possível) contra patógenos, tratamento empregado na paciente que foi imunizada por vacina pneumocócica 7-valente e 23-valente, vacina meningocócica A+C e influenza, como forma de protegê-la contra constantes infecções durante sua vida.

Neste trabalho estudamos as causas da deficiência da proteína C3 em uma paciente brasileira com histórico familiar de consanguinidade. De acordo com os nossos resultados, observamos que seu soro não apresentou atividade hemolítica mediada nem pela via alternativa e nem pela via clássica o que é comum nos casos de deficientes de C3. A concentração da proteína C3 no soro de todos os membros da família é reduzida, quando comparada a uma mistura de soro de 50 indivíduos normais, e abaixo do valor de referência (Ferriani et al., 1999, Healy et al., 1969). No soro da paciente não foi possível detectar a presença de C3 e o soro dos pais apresentou apenas 50% da concentração da proteína C3 e aproximadamente 50% de atividade hemolítica, sugerindo um padrão de herança autossômica recessiva. Esse padrão foi posteriormente confirmado quando o cDNA de C3 e certas regiões intrônicas de C3 foram sequenciadas. A paciente é homozigota para a mutação T→C na região 6690626 do gene C3,

enquanto os pais e irmão são heterozigotos. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos de pacientes deficientes de C3 como os descritos por Osofsky et al., (1997), Davis et al., (1997), Hsieh et al., (1981) entre outros.

Sabendo-se da deficiência de C3 nós analisamos os soros da família, paciente e controle por Western blotting, comprovando a ausência dessa proteína na paciente. Ao analisar os fragmentos do cDNA de C3 amplificados por RT-PCR, observamos uma diferença de tamanho na banda correspondente à região H (posição 3308 a 3960 nt) (**Figura 13**). Constatamos que o produto amplificado do indivíduo normal possui uma única banda de 652 pb correspondente aos dois alelos normais. A amplificação do cDNA de C3 do pai e da mãe gerou duas bandas, uma com 652 pb equivalente ao alelo normal e outra com 553 pb equivalente ao alelo mutado, confirmando a condição de heterozigose para o gene *C3* nesta família. O irmão também apresentou duas bandas (652 pb e 553 pb) assim como os pais, já a paciente apresentou apenas uma única banda com 553 pb (menor) equivalente aos dois alelos (materno e paterno) mutados. Já o sequenciamento de nucleotídeos da região H nos forneceu um dado muito importante: a continuidade do éxon 26 com o éxon 28, isto é, a deleção completa do éxon 27. A deleção de éxon também foi relatada por Huang e colaboradores em 1994, em que a paciente apresentava no RNAm de C3 a exclusão de 34 nt na região 3' do éxon 10 e substituição da base G→T no sítio doador de *splicing* do íntron 10 do gene *C3* gerando um códon de parada prematuro. Tsukamoto e sua equipe em 2005 descreveram o caso de um homem com mutação no sítio receptor (AG→GG) no íntron 39 com uma alteração de 38 nt, levando à deleção do éxon 30 do gene *C3*.

A concentração sérica de IgA, IgG e IgM da paciente A.S.S esteve dentro da faixa de normalidade para crianças de mesma idade. Neste estudo infelizmente não foram determinadas as concentrações séricas de sub-classe de IgG. Sabemos que soro de pacientes deficientes de C3 podem apresentar aproximadamente 8,2 µg/mL de IgG4, enquanto soro de indivíduos normais apresentam cerca de 292 µg/mL desta sub-classe (Bird, Lachmann, 1988). Mesmo considerando-se que a concentração de IgG4 representa apenas 2% do total de IgG, esta observação é importante, pois indica que C3 deve provavelmente influenciar a expressão dessa sub-classe de IgG. Hazlewood et al. (1991) estudaram os níveis séricos de anticorpos específicos para um polissacarídeo da cápsula bacteriana de pneumococos no soro de pacientes homozigotos deficientes de C1r, C2, C1INH, C5b-9 e C3 do complemento. O estudo mostrou que 3 dos 4 pacientes deficientes de C3 tiveram uma baixa produção de anticorpos específicos para o

polissacarídeo da cápsula bacteriana de pneumococos, indicando a participação dessa proteína na resposta imunológica mediada pelas células B na produção de anticorpos específicos.

Waldmann e Lachmann (1975) analisaram a resposta *in vitro* de células do baço de ratos para linfócitos T dependentes e T independentes na presença ou ausência de soro humano. Os autores mostraram que *in vitro* a resposta de IgM e IgG específica para ambos os antígenos T dependente ou T independente é menor em meio livre de soro humano. Da mesma forma a resposta de anticorpos é menor quando em meio contendo soro humano com inibidor de C3b, mostrando a importância do complemento nessa resposta.

A contagem diferencial de leucócitos mostrou alteração nos linfócitos e basófilos que na época do exame estavam acima dos valores normais. Conforme Material e Métodos, a paciente foi internada com pneumonia por *S. pneumoniae* aos 2 anos de idade (época da coleta de sangue para realização do exame) o que pode explicar essa alteração e o aumento no número dessas células. A infecção por *S. pneumoniae* ocorre pela transposição das barreiras naturais do hospedeiro, colonização das células epiteliais da nasofaringe e proliferação nos alvéolos pulmonares. Sua colonização pode ser resultado da sobrevivência dessas bactérias à fagocitose por macrófagos alveolares, onde liberam substâncias inflamatórias como endotoxinas bacterianas. A secreção de anticorpos naturais pela mucosa do hospedeiro, a produção da proteína C-reativa e o sistema complemento possuem um papel importante contribuindo na resposta imune inata contra pneumococos. Na infecção por essas bactérias a secreção de IgM e o aumento na concentração da proteína C-reativa são capazes de ativar a via clássica do complemento resultando na formação dos fragmentos C3b e iC3b que participam ativamente do processo de fagocitose, além da geração de C5a que medeia o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório e a formação do MAC na superfície da célula alvo promovendo a eliminação do patógeno (AlonsoDeVelasco et al., 1995). A deficiência de C3 na paciente A.S.S e consequentemente de seus fragmentos pode ser uma das causas que permitiram a evolução do quadro clínico para pneumonia, uma vez que o sistema complemento tem um importante papel na resposta imune inata contra *S. pneumoniae* e na paciente esse sistema é deficiente.

Figura 15 - Modelo baseado na estrutura cristalográfica da proteína C3

Em verde a cadeia β , em azul claro a cadeia α , em vermelho a ligação tiól-éster, em azul escuro os 33 aa (posição 1131-1163) codificados pelo éxon 27. Figura feita utilizando o programa *Pymol molecular graphics software*. Fonte: Baseado em Janssen et al., 2005.

O processo de síntese e secreção de proteínas em células de eucariotos envolve vários mecanismos e o funcionamento defeituoso em qualquer um desses mecanismos pode causar a ausência da proteína no indivíduo. A síntese protéica adequada para ser completa depende da transcrição do gene, tradução do RNAm e seu endereçamento para os ribossomos. A análise do sequenciamento da região compreendida entre os nt 6690313 a 660961 do gene *C3* da paciente, mostrou a troca do nucleotídeo T por um C (T→C) na junção intrônica de *splicing* do éxon 27 (**Figura 13**) o que não acontece no indivíduo controle, e que acreditamos ser a causa da deficiência da proteína C3 na paciente por causar um *splicing* defeituoso que exclui o éxon 27 e a deleção de 33 aa na proteína C3.

O mecanismo de *splicing* é dependente do reconhecimento de pequenas sequências altamente conservadas localizadas nas extremidades éxon-íntron e no interior dos íntrons. Essas sequências são formadas por GT-AG para DNA, GU-AG (**Figura 16**) para pré-RNA no sentido 5'→3' do gene, e um ponto de ramificação onde se encontra uma adenosina no interior do íntron responsável por identificar o sítio de *splicing* 3' mais próximo como alvo para a ligação com o sítio de *splicing* 5' (Jurica, Moore, 2002).

Figura 16 - Mecanismo de transcrição, *splicing* em RNAm e tradução para síntese proteica

As bases GU-AG no pré-RNAm altamente conservadas nas extremidades íntron-éxon são reconhecidas durante o processo de *splicing* (exclusão do íntron) seguido da ligação de um éxon com o seguinte, formando o RNAm. Após a tradução do RNAm temos a síntese da proteína.

Fonte: Joseph et al., 2009.

Esse processo também envolve pequenos RNAs nucleares (snRNAs) denominados U1, U2, U4, U5, U6 e mais 60 polipeptídeos (Cartegni et al., 2002). Essas moléculas se agrupam a outras proteínas formando o spliceossomo responsável por reconhecer os locais de início e término dos íntrons removidos durante a transcrição. Proteínas reguladoras (SR – das siglas em inglês *S* para serina e *A* para arginina) também controlam o mecanismo de *splicing* definindo os éxons e os íntrons que serão encaminhados para o spliceossomo para clivagem do pré-RNAm em pontos específicos. As SR se ligam a esses pontos chamados ativadores exônicos de *splicing* (ESE – *exonic splicing enhancers*) nos nts, definindo o éxon alvo e recrutando os snRNAs U1 e U2 para o ponto de *splicing* nas extremidades dos íntrons adjacentes (Keren et al., 2010).

O U1 inicia o *splicing* reconhecendo as sequências altamente conservadas entre a extremidade 3' do éxon e o GU da extremidade 5' do íntron, onde o pré-RNAm é cortado. Com o

auxílio dos snRNAs U6 e U4 ocorre o dobramento do íntron formando uma alça (**Figura 17**). Esses snRNAs também recrutam outras proteínas dando origem ao spliceossomo que irá excluir os íntrons e unir os éxons para síntese do RNAm maduro (Keren, et al., 2010).

Durante esse processo, as SR podem agir reconhecendo e se ligando a sítios ativadores exônicos de *splicing* (ESE – *exonic splicing enhancers*) nos éxons para seu encaminhamento para o spliceossomo, ou a sítios intensificadores de *splicing* intrônico (ISE – *intronic splicing enhancers*) nos íntrons suprimindo esse íntron que será retirado do transcrito final. As ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs) podem atuar nessa fase se ligando a sítios de silenciamento exônico de *splicing* (ESS – *exonic splicing silencers*) ou ainda a sítios silenciadores de silenciamento intrônico (ISS – *intronic silencing silencers*) suprimindo um éxon ou íntron respectivamente (Keren, et al., 2010).

Figura 17 - Representação do mecanismo de *splicing*

Em **a** temos os éxons constitutivos (azul) no sentido 5'→3'. O sítio de *splicing* (SS) onde se encontram as sequências conservadas GT-AG (DNA) e GU-AG (RNA), o ponto de ramificação rico em pirimidina ou purina localiza-se 20-50 nt do sítio 3' onde também se localiza o trato polipirimidínico (PPT – *polypyrimidine tract*). Em **b** temos o reconhecimento das sequências conservadas GU-AG (RNAm) reconhecidas pelos pequenos RNAs nucleares U1 e U2 onde irão se ligar formar uma alça e remover intron durante o *splicing*. Sinalização dos RNAs nucleares U1, U2, U5, U4 e U6 formando o spliceossomo que retira o intron e une os éxons. Em **c** temos os éxons (roxo) com o Sítio de silenciamento exônico de *splicing* (ESS – *exonic splicing silencers*) onde a ribonucleoproteína heterogênea nuclear (hnRNPs) irá se ligar e sinalizar para a supressão do éxon. Sítio ativadores exônicos de *splicing* (ESE – *exonic splicing enhancers*) onde a proteína reguladora (SR) irá se ligar para sinalizar o éxon que será encaminhado para o spliceossomo. Em verde temos os íntrons com o Sítio intensificador de *splicing* intrônico (ISE – *intronic splicing enhancers*) onde a SR se liga sinalizando o intron que será encaminhado para o spliceossomo, e o Sítio silenciador de silenciamento intrônico (ISS – *intronic silencing silencers*) onde a hnRNPs irá se ligar e sinalizar para a supressão do intron.

Fonte: Modificado de Keren et al., 2010.

Porém, uma falha nesse mecanismo de remoção dos íntrons pode gerar um RNAm anormal que é instável, uma sequência defeituosa ou uma isoforma protéica deletéria de uma proteína fundamental para o indivíduo. Mudanças no *splicing* de RNAm podem implicar em: a) exclusão ou inclusão de um éxon; b) mecanismo de *splicing* que reconhece pontos de *splicing*

alternativo 3' para um íntron; c) mecanismo que reconhece os pontos de *splicing* alternativo 5'; d) exclusão de um ou mais éxons num sistema de exclusão mútua; e e) inclusão de um íntron que será mantido na transcrição final do RNAm (Cartegni et al., 2002).

Figura 18 - Formas de *splicing* alternativo em eucariotos

Em **a** temos uma figura esquemática das regiões reconhecidas durante o mecanismo de *splicing* alternativo e seus respectivos nucleotídeos (caixas = letras em formato maior são os nucleotídeos mais comuns encontrados nestas regiões e os menores são os que surgem com menor frequência). Em **b** temos as cinco formas mais comuns de *splicing* alternativo.

Fonte: Modificado de Cartegni et al., 2002.

Nossos resultados mostram que a paciente possui uma troca de nucleotídeos (T→C) na região 6690626 do gene *C3* que leva ao não reconhecimento das sequências sinalizadoras intrônicas, gerando um *splicing* responsável pela exclusão do éxon 27 no pré-RNAm de *C3*. O U1 responsável por clivar o pré-RNAm de *C3* entre a extremidade 3' do éxon e o GU da extremidade 5' do íntron não é capaz de exercer sua função uma vez que ela não reconhece a sequência GC presente na paciente. Quando esse *splicing* inadequado acontece gerando a tradução de um RNAm mutado que posteriormente implicará em diferença de 33 aa (posição 1131 até 1163 na proteína) codificados pelo éxon 27 excluído, isso dará origem a uma proteína mutante que pode ser degradada ainda dentro da célula. Isaac e Isenman (1992) mostraram que proteínas mutantes de *C3* incapazes de formar a ligação tiól-éster podem ser instáveis e susceptíveis à degradação intra-celular. Como o éxon 27 está localizado dentro do domínio TED (963-1268 aa) abrangendo parte do domínio CUB (912-962 aa e 1269-1330 aa) (**Figura 7**) em uma região altamente conservada, a deleção desses 33 aa poderia significar uma mudança conformacional prejudicial reduzindo o espaço físico de interação entre os domínios que poderiam comprometer o domínio TED com consequente formação de uma proteína *C3* mutante instável que é rapidamente degradada, não sendo secretada para o meio extracelular, conforme observado na **Figura 14**.

Nosso grupo também demonstrou o caso de um rapaz então com 19 anos de idade deficiente do componente *C5* do complemento. O sequenciamento do cDNA de *C5* mostrou a deleção de 153 pb correspondentes aos nucleotídeos 3877-4029 codificados pelo éxon 30. Depois da análise do sequenciamento do gene *C5* das regiões entre os éxons 29 e 31, constatou-se a substituição de uma base C→G na posição 31055723 no íntron 30 do gene *C5*, responsável pela deficiência desta proteína no paciente (Ramirez-Aguilar et al., 2009). Semelhante ao nosso caso, esse paciente deficiente de *C5* possui uma mutação que leva a deleção de um éxon inteiro, porém difere quanto à sequência e a troca do nucleotídeo na região intrônica do pré-RNAm de *C5*.

Acreditamos que a mutação no RNAm de *C3* da paciente A.S.S possa gerar a síntese de uma sequência mutante devido a deleção do éxon 27 e uma conformação estrutural diferente, o que pode levar a sua degradação ainda dentro da célula. O exossomo é um grande complexo protéico formado por exonucleases em associação. Este complexo é capaz de degradar o pré-RNAm que não sofreu um *splicing* adequado eliminando possíveis defeitos genéticos. Uma vez que este RNAm mutado (devido à ausência do éxon 27 no caso da paciente em estudo) é

processado, possivelmente ele poderia ser reconhecido ainda no núcleo pelo exossomo e degradado, e dessa forma o RNAm mutado não seguiria para o processo de tradução, interrompendo a síntese protéica (Schmid et al., 2008).

A tradução de um RNAm mutado poderia também representar como consequência a síntese de uma proteína truncada que pode não ser reconhecida pelas chaperonas, causando um não dobramento protéico adequado com posterior degradação. Esta proteína truncada pode ainda ser marcada pela ubiquitina e endereçada para degradação no proteossoma, ou a síntese de uma proteína truncada pode acabar levando ao seu aprisionamento dentro da célula (Katz et al., 1994).

Dos 31 casos aqui descritos de pacientes deficientes de C3 em que as bases moleculares foram desvendadas, 7 deles tratam de alteração de nucleotídeos que levam a um códon de parada prematura e ausência da proteína, porém cada caso é único, conforme comentado anteriormente (**1.10 página 35**). Em todos os relatos de deficientes de C3 foram descritas mutações em regiões distintas do gene *C3*, mostrando a individualidade de cada deficiência descrita. Nosso trabalho mostrou algo inédito, a troca de nucleotídeos (T→C) na região 6690626 do gene *C3* jamais descrita antes para esta deficiência. Isso torna o nosso achado ainda mais interessante para a compreensão das bases moleculares das imunodeficiências, um passo necessário para o estudo de futuras terapias na tentativa de melhorar e promover uma melhor qualidade de vida para esses pacientes. Além disso, a investigação dessa área tem um potencial para ajudar a elucidar ainda mais a função e a relação do sistema complemento com as imunodeficiências a ele ligadas.

6 CONCLUSÕES

- 1- A proteína C3 está ausente no soro da paciente, confirmada por imunodifusão e por ensaios hemolíticos que mostraram a incapacidade de seu soro em lisar as hemácias utilizadas neste ensaio.
- 2- O sequenciamento genético das regiões 6690313 até 6690961 do gene *C3* confirmou a heterozigose dos pais, e do irmão para a mutação presente na paciente que se mostrou homozigota para tal mutação.
- 3- Identificamos a completa deleção do éxon 27 no RNAm de C3 da paciente, responsável pela codificação de 33 aa no domínio TED da proteína C3. A troca de nucleotídeos (T→C) na região 6690626 do gene *C3* leva ao *splicing* defeituoso que exclui o éxon 27, gerando uma proteína instável sendo, portanto a causa da deficiência da proteína C3 do complemento na paciente.

REFERÊNCIAS*

Agarwal S, Specht CA, Huang H, Ostroff GR, Ram S, Rice PA, Levitz SM. Linkage specificity and role of properdin in activation of the alternative complement pathway by fungal glycans. *Mbio*. 2011;2:1-10.

Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv. Immunol.* 1989;46:183-19.

Aleshin AE, Schraufstatter IU, Stec B, Bankston LA, Liddington RC, DiScipio RG. Structure of complement C6 suggests a mechanism for initiation and unidirectional, sequential assembly of membrane attack complex (MAC). *J Biol Chem*. 2012;287(13):10210-22.

AlonsoDeVelasco E, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and Vaccine. *Microbiol Rev*. 1995;59(4):591-03.

Alper CA, Abramson N, Johnston RB Jr, Jandl JH, Rosen FS. Studies in vivo and in vitro on an abnormality in the metabolism of C3 in a patient with increased susceptibility to infection. *J Clin Invest*. 1970; 49(11): 1975-85.

Alper CA, Colten HR, Rosen FS, Rabson AR, Macnab GM. Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections. *Lancet*. ii: 1972;1179-81.

Alper CA, Rosen FS. Genetics of the complement system. *Adv Hum Genet*. 1989;7:88-41.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389-3402.

Amara U, Flierl M A, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Bruckner BU, Nilsson BO, Gebhard F, Lambris J D, Lang MH. Molecular intercommunication between the complement and coagulation Systems. *J Immunol*. 2011;185:5628-36.

Ballou M, Shira JE, Harden L, Yang SY, Day NK. Complete Absence of the third component of complement in Man. *J. Clin. Invest*. 1975;56:703-10.

Barrett DJ, Boyle MD. Restoration of complement function in vivo by plasma infusion in factor I (C3B) inactivator deficiency. *J Pediatr*. 1984;104(1):76-81.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Berger M, Balow JE, Wilson CB, Frank MM. Circulating immune complex and glomerulonephritis in a patient with congenital absence of the third component of complement. *New England J Med.* 1983;308: 1009-12.

Berman S, Gewurz H, Mold C. Binding of C-Reactive protein to nucleated cell leads to complement activation without cytotoxicity. *J Immunol.* 1986;136(4):1354-64.

Bhakdi S, Bhakdi-Lehnen B, Bjerrum OJ, Trandum-Jensen J. Difference in antigenic reactivity and ultrastructure between fluid-phase C5b-9 and the C5b-9 membrane attack complex of human complement. *FEBS Lett.* 1979;1:15-19.

Bhade SS. Recurrent meningitis in a family with C3 deficiency. Letter to the Editor. *Indian Pediatr.* 2006;43:269-270.

Bird P, Lachmann PJ. The regulation of IgG subclass production in man: low serum IgG4 in inherited deficiencies of the classical pathway of C3 activation. *Eur J Immunol.* 1998;18(8):1217-22.

Bohnsack JF, Cooper NR. CR2 ligands modulate human B cell activation. *J. Immunol.* 1988; 141(8):2569-76.

Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest.* 1970;49:2427-36.

Borzy MS, Gewurz A, Wolff L, Houghton D, Lovrien E. Inherited C3 deficiency with recurrent infections and glomerulonephritis. *Am J Dis Child.* 1988;142:79-83.

Borzy MS, Houghton D. Mixed-pattern immune deposit glomerulonephritis in a child with inherited deficiency of the third component of complement. *Am. J Kidney Dis.* 1985;5(1): 54-59.

Botto M, Fong KY, SO AK, Rudge A, Walport MJ. Molecular basis of hereditary C3 deficiency. *J Clin Invest.* 1990;86:1158-63.

Botto M, Fong KY., SO, A.K., BARLOW, R., ROUTIER, R., MORLEY, B J. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a partial gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; USA 89:4957-61.

Bresson S M, Conrad, NK. The human nuclear poly(A)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLOS Genetics.* 2013; 9(10):1-17.

Bruji MHL, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Biochemistry.* 1985; 84:708-12.

Campbell RD., Booth, NA., Fothergill, JE. Purification and Characterization of Subcomponent C1s of the First Component of Bovine Complement. *Biochem. J.* 1979; 183:579-88.

Carroll MC. The Role of Complement receptors in induction and regulation of immunity. *Immunology*. 1998;16:545-68.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002;3(4):285-98.

Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*. 1992;256(5053):105-07.

Catterall FC, Lyons A, Sim B R., DAY, J A., HARRIS, R J T. Characterization of the primary amino acid sequence of human complement control protein Factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem. J*. 1987;242:849-56.

Chen M, Daha MR, Kallenberg CGM. The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2010;34:j276-82.

Chirgwi JM, Przbyla AE, Macdonal RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18:5294-49.

Cole FS, Mattheews WJ, Marino JT, Gash DJ, Colten HR. Control of complement synthesis and secretion in bronchoalveolar and peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1980; 125(3):1120-24.

Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, Vanaman ME. Primate erythrocyte- immune complex-clearing mechanism. *J. Clin. Invest*. 1983;71:236-47.

Cozma G, Aburumeih S, Mallk-Cozma MC, Johny KV. CAPD in a patient with complete absence of C3. *Clin. Nephrol*. 1987;27(5):269.

Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M, Carroll, MC. Antibody Response to a T-dependent Antigen Requires B Cell Expression of Complement Receptor. *J Exp Med*. 1996; 183:1857-64.

Czop J, Nussenzweig V. Studies on the mechanism of solubilization of immune precipitates by serum. *J Exp Méd*. 1976;143:615-30.

Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxian for human eosinophils but not for neutrophils. I C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med*. 1995; 181:2119-27.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15(1):127-35.

Davies ME, Schifferli JA, Walport MJ. Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin Immunopathol*. 1994;15(4):397-16.

Davis AE, Davis JS, Rabson AR, Osofsky SG, Colten HR, Rosen FS, Alper CA. Homozygous C3 deficiency: detection of C3 by radioimmunoassay. *Clin Immunol. Immunop.* 1977;8: 543-550.

De Bruijn MHL, Fey C H. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985;82:708-12.

Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d Complement as a Molecular Adjuvant: Bridging Innate and Acquired Immunity. *Science.* 1996;271:348-50.

Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood.* 1994;83(11): 3324-31.

Endo Y, Takahashi M, Iwaki D, Ishida Y, Nakazawa N, Kodama T, Matsuzaka T, Kanno K, Liu Y, Tsuchiya K, Kawamura I, Ikawa M, Waguri S, Wada I, Matsushita M, Schwaebble WJ, Fujita T. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecular, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 2012;189: 5860-66.

Erdős EG, Sloane EM. An enzyme in human bloodplasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol.* 1960; 11:582-92.

Fearon DT, Austen F, Ruddy S. Properdin factor D: characterization of its active site and isolation of the precursor form. *J. Exp. Med.* 1974;139:355-66.

Fearon DT, Austen F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* 1975; 142:852-63.

Ferreira de Paula P, Barbosa JE, Junior PR, Ferriani VP, Latorre MRDO, Nudelman V, Isaac L. Ontogeny of complement regulatory proteins – concentrations of Factor H, Factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and adults. *Scand J Immunol.* 2003;58:572-77.

FERREIRA DE PAULA, P. **Intervalos de normalidade da concentração de algumas proteínas regulatórias do sistema complemento em crianças e adultos saudáveis brasileiros.** 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Ferriani VPL, Barbosa JE, Carvalho IF. Complement haemolytic activity classical and alternative pathways, C3, C4 and factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr.* 1999, 88:1062-66.

Ferries CT, Lachmann JP, Harrison AR. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem. J.* 1988; 252:47-54.

Francis K, van Beek J, Canova C, Neal JW, Gasque P. Innate Immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5:1-19.

- Fritz B. What is clusterin? *Clin Exp Immunol.* 1992; 88:375.
- Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein: role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med.* 1978; 148:1044-51.
- Gerard, C, Hugli TE. Identification of classical anaphylatoxin as the des-Arg form of the C5a molecule: evidence of a modulator role for the oligosaccharide unit in human des-Arg⁷⁴-C5a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78(3):1833-37.
- Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b-inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76: 6596-00.
- Golan MD, Burger R, Loos M. Conformational changes in C1q after binding to immune complexes: detection of neoantigens with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1982; 129(2):445-47.
- Grace HJ, Brereton-Stiles GG, Vos GH, Scholand M. A Family with partial and total deficiency of complement C3. *S. Afr. Med. J.* 1976;50:139-40.
- Grumach AS, Vilela MM, Gonzalez CH, Starobinas N, Pereira AB, Dias-da-Silva W, Carneiro-Sampaio MM. Inherited C3 deficiency of the complement system. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1988;21:247-57.
- Hartmann K, Henz BM, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lipper U, Zuberbier T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood.* 1997; 89(8):2863-70.
- Hazlewood MA, Kumararatne DS, Webster ADB, Goodall M, Bird P. An association between homozygous Ce deficiency and low levels of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1991;87(3):4004-09.
- Helmy KY, Katschke KJ Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi Nico, Campagne ML. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell.* 2005;124:915-27.
- Hsieh KH, Lin CY, Lee TC. Complete absence of the third component of complement in a patient with repeated infections. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1981;20(3):305-12.
- Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. Springer. *Semin. Immunopathol.* 1984; 7(2-3):193-19.
- Hung JL, Lin CY. A hereditary C3 deficiency due to aberrant splicing of exon 10. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73(2):267-73.
- Imai K, Nakajima K, Eguchi K, Endoh M, Tomino Y, Nomoto Y, Sakai H, Hyodo Y. Homozygous C3 deficiency associated with IgA nephropathy. *Nephron.* 1991;59:148-52.

Isaac L, Isenman DE. Structure requirements thioester bond formaion in human complement component C3. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(14):10062-69.

Janssen BJ, Gros P. Structural insights into the center complement component C3. *Mol Immunol.* 2007;44(1-3):3-10.

Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Ekdahl KN, Nilsson- Ekdahl K, Nilsson B, Gros P. Strutures of complement component C3 provide insight sinto the function and evolution of immunity. *Nature.* 2005;437(22):505-11.

Jenne D, Stanley KK. Molecula cloning of S-proiein, a link between complement, coaglation and cell-substrate adhesion. *EMBO J.* 1985;12(4):3153-57.

Joseph R. Genetcs and Evolution of Life From Other Planets. *Cosmology.* 2009;1:150-200.

Jurica MS, Moose MJ. Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods.* 2002; 28:336-45.

Kang YS, Do Y, Lee HK, Parck SH, Cheong C, Lynch RM, Loeffler JM, Steinmam RM, Parck CG. A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell.* 2006;125:47-58.

Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J. Immunol.* 1974; 112(6):2135-47.

Katz T, Singer L, Wetsel RA, Schlesinger M, Fishelson Z. Inherited complement C3 deficiency: a defect in C3 secretion. *Eur J Immunol.* 1994;24:1517-22.

Katz Y, Revel M, Strunk RC. Interleukin 6stimulates sybthesis of complement proteins factor B and C3 in human skin fibroblasts. *Eur J Immunol.* 1989; 19:983-88.

Katz Y, Wetsel RA, Schlesinger M, Fishelson Z. Compound heterozygoius complement C3 deficiency. *Immunol.* 1995;94:5-7.

Kemper C, Mitchell LM, Zhang L, Hourcade DE. The complement protein properdin binds apoptotic T cell and promotes complement activation and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105 (26):9023-9028.

Kida M, Fujioka H, Kosaka Y, Hayashi K, Sakiyama Y, Ariga T. The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the C3 gene: a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency. *Blood Cell Mol Dis.* 2008;40:410-13.

Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(5):345-55.

- Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* 1997;158(10) 4525-28.
- Kretzschmar T, Jeromin A, Gietz C, Bautsch W, Klos A, Kohl J, Rechkemmer G, Bitter-Suermann D. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23(2):558-61.
- Lacroix BM, Aude CA, Arlaud JG, Colomb M. Isolation and functional characterization of the proenzyme from the catalytic domains of human C1r. *Biochem. J.* 1989;257:885-91.
- Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol. Today.* 1988;9(12):387-93.
- Levin Y, Skidgel RA., Erdös EG. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:4618-22.
- Lublin DM, Atkinson PP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:35-58.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry.* 1965;3:235-64.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11):2114-7.
- Martin DE, Zalman LS, Müller-Eberhard HJ. Induction of expression of cell surface homologous restriction factor upon anti-CD3 stimulation of human peripheral lymphocytes. *Immunology.* 1987;85:213-17.
- Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2479-86.
- Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 2000;164:2281-84.
- Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 1992;176: 1497-02.
- Matsuyama W, Nakagawa M, Hakashima, H, Muranaga F, Sano Y, Osame M. Identification of a novel mutation (Tyr1081Ter) in sisters with hereditary component C3 deficiency and SLE-like symptoms. *Hum. Mut.* 2000;17: 79.

Matsuyama W, Nakagawa M, Takashima H, Muranaga F, Sano Y, Osame M. Molecular analysis of hereditary deficiency of third component of complement (C3) in two sisters. *Internal Med.* 2001;40(12):1254-1258.

Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniel RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology.* 1990;71(1):1-9.

Mevorach D, Mascarenhas O, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cell by human macrophages. *J Exp Med.* 1998;188(12):2313-20.

Milis L, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA., Pussell BA. Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clin Exp Immunol.* 1993;92:114-19.

Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol.* 2002;23(2):61-4.

Mousli M, Hugli TE, Landry Y, Bronner C. A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *J. Immunol.* 1992;148(8):2456-61.

Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, d'Apice AJF. SP-40,40, a Newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1988;81:1858-64.

Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, Kooten C, Roos A. Opsonization with C1q and mannoside-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cell. *J Immunol.* 2004;173:3044-50.

Nilsson UR, Nilsson B. Simplified assays of hemolytic activity of the classical and alternative complement pathways. *J Immunol.* 1984;72:49-59.

OHTA, M., OKADA, M., YAMASHINA, I., KAWASAKI, T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1990;265(4):1980-84.

Okura Y, Yamada M, Takezaki S, Nawate M, Takahashi Y, Kida M, Kawamura N, Ariga T. Novel compound heterozygous mutations in the C3 gene: hereditary C3 deficiency. *Pediatr Int.* 2011;53:e16-e19.

Osofsky SG, Thompson BH, Lint TF, Gewurz H. Hereditary deficiency of the third component of complement in a child with fever, skin rash and arthralgias: Response to transfusion of whole blood. *J. Pediatr.* 1977;90:180-6.

- Pangburn KM, Schreiber DR, Müller-Eberhard JH. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein $\beta 1H$ for cleavage of C3b and C3 in solution. *J Exp Med*. 1977;146:257-70.
- Pangburn MK, Müller-Eberhard JH. Relation of a putative triester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b to biological targets of complement. *J. Exp. Med*. 1980;152:1102-14.
- Pangburn MK, Müller-Eberhard JH. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzyme properties of the biomolecular proteinase. *Biochem J*. 1986; 235:723-30.
- Pangburn MK. Differences between the binding sites of the complement regulatory proteins DAF, CR1, and factor H on C3 convertases. *J. Immunol*. 1986;136(6):2216-21.
- Peleg D, Harit-Bustan H, Katz Y, Peller S, Schlesinger M, Schonfeld S. Inherited C3 deficiency and meningococcal disease in a teenager. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 1992;11:401-04.
- Pensky J, Hinz CF, Todd EW, Wedgwood RJ, Boyer JT., Lepow IH. Properties of highly purified human properdin. *J. Immunol*. 1968;100:142.
- Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. *J.Exp. Med*. 1974;140:126-45.
- Podak ER, Müller-Eberhard JH. Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. *J. Biol. Chem*. 1979;254(19):9808-14.
- Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem*. 1994;269(23):15957-60.
- Prodinger W M. Complement receptor type two (CR2,CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping. *Immunology*. 1999;20(3):187-94.
- Pussell BA, Nayef M, Bourke E, Morris S, Peters DK. Complement deficiency and nephritis: A report of a family. *Lancet*. 1980;I:675-77.
- Ramirez-Aguilar P, Reis ES, Florido MPC, Barbosa AS, Farah CS. Skipping of exon 30 in C5 results in complete human C5 deficiency and demonstrates the importance of C5d and CUB domains for stability. *Mol Immunol*. 2009;46:2116-23.
- Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical Aspects Molecular Basis of Primary Deficiencies of complement Component C3 and its Regulatory Proteins Factor I and Factor H. *Scand J. Immunol*. 2006;63(3): 155-68.
- Reis ES, Barach GV, Lima AS. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a premature stop codon. *J Clin Immunol*. 2002;22(2):321-29.

Reis ES, Barbuto AM, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res*. 2006;55(5):179-84.

Reis ES, Barbuto AM, Isaac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 2007; 212(3):151-57.

Reis ES, Barbuto AM, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol Immunol*. 2008;45(7):1952-62.

Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins Factor I and Factor H. *Scand J Immunol*. 2006;63:155-68.

Reis ES, Nudelman V, Isaac L. Nonsense-codon-mediated decay in human hereditary complement C3 deficiency. *Immunogenetics*. 2004;55(10):667-73.

Rezende MS, Elizabeth R, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and protein S-C4b binding protein complex. *Blood*. 2004;103: 1192-00.

Rhichard JQ, Nichoson-Weller A, Cybulsk AV, Badalamenti J, Salant DJ. Decay accelerating factor regulates complement activation on glomerular epithelial cells. *J Immunol*. 1989;142:877-82.

Ricklin D, Hajishengalli G, Yanag K, Lambris J. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-97.

Ripoche J, Day JA, Harris RJT, Sim BR. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J*. 1988;249:593-02.

Rodriguez-Marco A, Bradbury M, Riley P, Arkwright PD. Autoimmunity and recurrent infections in partial complement C3 immunodeficiency. *Rheumatology*. 2010;49:1017-19.

Roord JJ, Daha M, Kuis W, Verbrugh HA, Verhoef J, Zegers BJM, Stoop JW. Inherited deficiency of the third component of complement associated with recurrent pyogenic infections, circulating immune complex, and vasculitis in a dutch family. *Pediatrics*. 1983;71(1):81-7.

Sanal O, Loos M, Ersoy F, Kanra G, Ssemeer G, Tezcan I. Complement component deficiencies and infection: C5, C8 and C3 deficiencies in three families. *Eur. J. Pediatr*. 1992;151:676-79.

Sanchez-Corral P, Garcia C, Cordobas R. Isoforms of human C4b-binding protein, I: molecular basis for the C2BP isoform pattern and its variation in human plasma. *J Immunol*. 1995;155:4030-36.

Sano Y, Nishimukai H, Kitamura, H, Nagaki K, Inai S, Hamasaki Y, Maruyama I, Igata A. Hereditary deficiency of the third component of complement in two sisters with systemic lupus erythematosus-like symptoms. *Arthritis Rheum - US*. 1981;24:1255-60.

Scharfstein J, Ferreira A, Gilgi I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein: Isolation and characterization. *J Exp Med*. 1978;148:207-22.

Schmid M., Jensen TH. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(10):501-510.

Seya T, Turner JR, Atkinson JP. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med*. 1986;163:837-55.

Shinkai Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*. 1988;334:525-27.

Sim RB, Arlaud GJ, Colomb MG. C1 inhibitor-dependent dissociation of human complement component C1 bound to immune complexes. *Biochem J* 1979;179(3):449-57.

Singer L, Hee MLV, Lokki MJ, Kramer J, Borzy MS, Wetsel RA. Inherited complement C3 deficiency: reduced C3 mRNA and protein levels in a lotin kindred. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;81(3):244-52.

Singer L, Whitehead WT, Akama H, Katz Y, Fishelson Z, Wetsel R A. Inherited human complement C3 deficiency. *J Biol Chem*. 1994;269(45):28494-99.

Singh DK, Rai R. Recurrent meningitis secondary to isolated C3 deficiency. *Indian J Pediatr*. 2009;76:95-96.

Snyderman R, Phillips JK, Mergenhagen SE. Biological activity of complement in vivo. Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. *J Exp Med*. 1971;134(5):1131-43.

Suresh M, Molina h, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD, Sandor M. Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cell during a systemic viral infection. *J Immunol*. 2003; 170:788-94.

Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA. A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J. Immunol*. 1996;156(9):3455-60.

Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cell. *FEBS Lett*. 1996;397:269-72.

Tandon N, Morgan BP, Wetman AP. Expression and function of membrane attack complex inhibitory proteins on thyroid follicular cells. *Immunology*. 1992;75(2):372-377.

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaebble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggeleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. 1997;386(6624):506-10.

Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett*. 2011;138:35-37.

Tschopp J, Podack ER, Müller-Eberhard JH. The membrane attack complex of complement: C5b-8 complex as accelerator of C9 polymerization. *J. Immunol* 1985;134(1):495-99.

Tsukamoto H, Horiuchi T, Kokuba H, Nagae S, Nishizaka H, Sawabe T, Harashima S, Himeji D, Koyama T, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y, Hashimura C, Kitano E, Kitamura H, Furue M, Harada M. Molecular analysis of a novel hereditary C3 deficiency with systemic lupus erythematosus. *Biochem Bioph Res Co*. 2005;330:298-04.

Ulbrich AG, Florido MPC, Nudelman V, Reis ES, Baracho G, Isaac L. Hereditary human complement C3 deficiency owing to reduced levels of C3 mRNA. *Scand. J. Immunol*. 2001; 53:622-26.

Vick DP, Amiquet P, Moffat GJ, Fey M, Barras FA, Wetesel RA, Tack BF. Structural feature of human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry*. 1991;30(4):1080-85.

Vyse TJ, Moley, BJ, Bartók I, Theodoridis ES, Davies KA, Webster DB. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J. Clin. Invest*. 1996;97:925-33.

Waldmann H, Lachmann PJ. The failure to show a necessary role for C3 in the in vitro antibody response. *Eur J Immunol*. 1975; 5(3):185-93.

Walport M J. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-66.

Wang XL, Li DJ, Yuan MM, Yu M, Yao XY. Enhancement of humoral immunity to the hCG β protein antigen by fusing a molecular adjuvant C3d3. *J Reprod Immunol*. 2004;63:97-10.

Ware CF, Kolb WP. Assembly of the functional membrane attack complex of human complement: Formation of disulfide-linked C9 dimer. *Immunology*. 1981;78 (10):6426-30.

Warren HB, Pantazis P, Davies PF. The Third Component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cell. *Am J Pathol*. 1987;129:09-12.

Weiss L, Ficher E, Cavaillon HN, Jouvin MH, Appay, MD, Bariety J, Kazatchkine M. The human C3b receptor (CR1). *Adv Nephrol*. 1989;18:249-70.

Weiss RM, Schulz EJ. Complement deficiency in Sweet's syndrome. *Correspondence*. 1989;413-15.

Whaley K, Ruddy S. Modulation of the alternative complement pathway by β 1H globulin. *J Exp Med*. 1976;144:1147-63.

Whaley K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*. 1980; 151:501-16.

Whitehead AS, Solomon E, Chambers S, Bodmer WF, Povey, S, Fey G. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci*. 1982;79:5021-25.

Yonemasu K, Sasaki T, Shinkai H. Purification and characterization of subcomponent C1q of the first component of bovine complement. *Biochem. J*. 1980; 88(5):1545-54.

Young JDE, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin I) from cytotoxic T cell: structural, immunological, and functional similarities. *Science*. 1986;233:184-90.

Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J. Immunol*. 1982;128(6):2505-08.

Ziegler JB, Alper CA, Rosen RS, Lachmann PJ, Sherington L. Restoration by purified C3B inactivator of complement mediated function in vivo in a patient with C3B inactivator deficiency. *J Clin Invest*. 1975; 55(3): 668-72.