

**Edimara da Silva Reis**

**"Papel do Sistema Complemento na Diferenciação  
e Maturação das Células Dendríticas"**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2008

**Edimara da Silva Reis**

**"Papel do Sistema Complemento na Diferenciação  
e Maturação das Células Dendríticas"**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Lourdes Isaac

São Paulo

2008

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

Reis, Edimara da Silva.

Papel do sistema complemento na diferenciação e maturação das células dendríticas / Edimara da Silva Reis. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Lourdes Isaac.

Tese (Doutorado) – 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: Complement system in dendritic cell differentiation and maturation.

Descritores: 1. Imunologia inata 2. Sistema complemento 3. Células dendríticas 4. C3 5. C5 I. Isaac, Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB074/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Edimara da Silva Reis.

Título da Tese: Papel do sistema complemento na diferenciação e maturação das células dendríticas.

Orientador(a): Lourdes Isaac.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

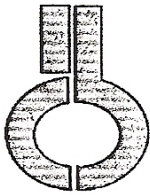
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438  
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 05 de fevereiro de 2004

**PARECER 547/CEP**

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quadragésima segunda reunião, realizada no dia 05-fevereiro - 04, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Sistema Complemento e Células Dendríticas Humanas: Expressão de Proteínas do Complemento e Influência na Diferenciação destas Células*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.  
EDIMARA DA SILVA REIS  
Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Profa. Dra. Lourdes Isaac, este

trabalho é dedicado a você.

Por todos estes anos de convivência e

aprendizado. Pela amizade, pelo apoio,

por ter me formado e me feito crescer.

## AGRADECIMENTOS

Lou, ufa!!!! Foram 8 anos, 11 artigos, (n + 1) alunos de iniciação científica. Várias conquistas, algumas crises graves, outras nem tanto.....momentos felizes, momentos tristes.....Mas, em todos esses momentos eu só aprendi com você. Você esteve ao meu lado e me ajudou a subir cada degrau até este momento e, melhor, eu vi você vibrar com cada uma das minhas realizações. Lembre-se que você esteve e sempre estará por trás de todas as minhas conquistas, pois tudo o que você semeou em mim, como o amor à ciência, a ética, a seriedade, a vontade de saber, estará sempre comigo. Obrigada!!!!

Este trabalho nunca teria sido possível sem a colaboração do Prof. Dr. José Alexandre Barbuto. Obrigada por ter aberto as portas do laboratório e por me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa. Estendo os agradecimentos para todos os integrantes do Laboratório de Imunologia de Tumores, que me acolheram e ajudaram. Obrigada especial para as amigas Andréia Neves e Marisa Treglia, por terem compartilhado comigo alegrias e problemas profissionais e pessoais. E muitas vezes terem me ajudado a resolvê-los.

Ao Prof. Dr. Jörg Köhl por ter me recebido em seu laboratório em Cincinnati, EUA. Pelo tempo dedicado às nossas discussões de resultados, por ter aberto meus horizontes, por confiar em mim e me oferecer novos desafios. E a todos os membros do laboratório: Albert Magnusen, Alfor Lewis, Gabriele Köhl, Jack Weaver, Manoj Pandey, Nate Harris e Xun Zhang, por toda ajuda e por fazer do laboratório um lugar delicioso para se trabalhar.

Aos integrantes do Laboratório de Complemento: Alda, Isabel, José Antônio, Lorena, Mônica e Renan. E à Marlene por toda ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah do Departamento de Bioquímica da USP. O que teriam sido dos 11 artigos sem você???? Obrigada não só pelas revisões do inglês, mas por todas as críticas sempre construtivas e pelas valiosas sugestões em todos os artigos, resumos, pôsteres, cartas.....

Aos amigos Mariane e Welbert, pela leitura e revisão da tese. À minha Chu, por todos os momentos que passamos juntas no laboratório, até altas horas da noite. Pelas nossas viagens inesquecíveis, pela companhia, paciência, compreensão, apoio, por me fazer rir, enfim.....por essa amizade que só eu e você sabemos o quanto é importante.

Ao Prof. Dr. Júlio Scharfstein, do Instituto de Biofísica- UFRJ, pela gentileza de ter escrito um parecer muito positivo para a CAPES, o que possibilitou a realização do meu doutorado sanduíche.

Aos Drs. Niels Olsen Saraiva Câmara, Karina Ramalho Bortoluci e Nancy Starobinas pela cuidadosa leitura do exemplar de Qualificação e valiosas sugestões.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Imunologia, ICB, USP.

A minha família, pelo apoio incondicional.



Este trabalho é resultado da colaboração entre três laboratórios. A parte inicial, onde estudamos a produção de proteínas do complemento e o papel do componente C3 na diferenciação de células dendríticas humanas, foi realizado no Laboratório de Complemento- ICB- USP, sob a orientação da Profa. Dra. Lourdes Isaac e contamos com a colaboração do Laboratório de Imunologia de Tumores- ICB- USP e do Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto. A segunda parte do trabalho, onde estudamos o papel dos receptores C3aR, C5aR e C5L2 na diferenciação e maturação de células dendríticas murinas foi realizado no Cincinnati Children's Medical Hospital- USA, sob a supervisão do Prof. Dr. Jörg Köhl. Contamos com financiamento FAPESP (Projeto Regular L.I. e Bolsa Doutorado), CAPES (bolsa doutorado sanduíche) e NIH (Projeto J.K).

## RESUMO

Reis ES. Papel do Sistema Complemento na Diferenciação e Maturação das Células dendríticas [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2008.

Monócitos humanos podem ser diferenciados em células dendríticas na presença de soro e citocinas. Uma das principais funções das células dendríticas imaturas é a captura e processamento de antígenos, por outro lado, as células dendríticas maduras são especializadas na apresentação dos antígenos. O papel do complemento na diferenciação de monócitos para células dendríticas permanece desconhecido. Neste trabalho, observamos que as células dendríticas são uma fonte de proteínas do sistema complemento (C3, C5, C9, fator I, fator H, fator B, fator D, properdina, CR1 e CD18) e, além disso, observamos que o complemento pode modular a diferenciação e maturação destas células. Células mononucleares humanas foram isoladas e a fração aderente foi cultivada na presença de GM-CSF e IL-4 em meio suplementado com soro humano normal ou soro deficiente de C3. A ausência de C3 durante a diferenciação teve um impacto negativo na expressão da lectina tipo C- DC-SIGN, das moléculas apresentadoras de antígenos HLA-DR e CD1a e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. A produção espontânea de IL-6 e IL-12 também foi menor na ausência de C3. Além disso, observamos que a maturação das células dendríticas em resposta ao LPS foi prejudicada na ausência de C3, evidenciado pela menor expressão de HLA-DR, moléculas coestimuladoras e menor produção de IL-12. Deste modo, estes resultados sugerem uma participação do complemento na diferenciação e maturação de células dendríticas humanas. Também sabemos que o sistema complemento pode contribuir para a polarização da resposta imune após o reconhecimento de padrões moleculares. Neste trabalho também demonstramos uma cooperação entre *Toll-like receptors* (TLR) e receptores do complemento no direcionamento e magnitude da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Observamos que a sinalização feita por meio do C3aR e C5aR presentes em células dendríticas esplênicas murinas tem importante impacto na maturação destas células em resposta a ligantes de TLR2 e 4. Mais especificamente, encontramos: (1) menor expressão de MHC-II em células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup>, a qual está associada com menor expressão de RNAm do transativador de MHC-II (CIITA). Mecanicamente, a sinalização pelo C5aR é requerida para a expressão de MHC-II durante o desenvolvimento das células dendríticas a partir de precursores de medula óssea. (2) menor expressão de moléculas coestimuladoras nas células dendríticas de animais

C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup>. (3) menor produção de IL-12p40, IL-12p70 e IL-6 em resposta a ligantes de TLR2 pelas células dendríticas de animais C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup>. Importante notar que nas células dendríticas C3aR<sup>-/-</sup>, mas não nas C5aR<sup>-/-</sup>, a produção de IL-12 é regulada por um mecanismo dependente de IL-10. Deste modo, a ausência de sinal pelos C3aR e C5aR, regula negativamente a habilidade destas células na indução da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, modificando os níveis de proliferação e citocinas produzidas. De maneira conjunta, nossos achados contribuem para o entendimento de como proteínas do sistema complemento contribuem para a diferenciação e maturação de células dendríticas e com o desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

**Palavras-chave:** Imunidade inata, Sistema complemento, Células dendríticas, C3, C5.

## ABSTRACT

Reis ES. Complement System in Dendritic Cell Differentiation e Maturation [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2008.

Human monocytes can be differentiated into immature dendritic cells in the presence of serum e cytokines. One of the main functions of immature dendritic cells is to capture e process antigens. Following maturation, they differentiate into antigen presenting cells. The role of complement in the differentiation process from monocytes towards immature dendritic cells remains elusive. Here we demonstrate that dendritic cells produce complement proteins (C1q, C3, C5, C9, C4BP, Factor I, factor H, factor B, factor D, properdin, CR1 e CD18) e that complement C3 has a regulatory impact in the expression of specific dendritic cell surface molecules e DC-derived cytokine production during cell differentiation. We isolated human adherent peripheral blood mononuclear cells, which were cultured in the presence of GM-CSF plus IL-4 in medium supplemented with normal human serum or C3 deficient serum. The lack of C3 during dendritic cell differentiation negatively impacted the expression of C-type lectin receptor DC-SIGN, the antigen presenting molecules HLA-DR e CD1a, e the costimulatory molecules CD80 e CD86. Further, the spontaneous production of IL-6 e IL-12 was reduced in the absence of C3. Moreover, the maturation of immature DCs in response to LPS challenge was impaired in the absence of C3 as evidenced by reduced MHC-II, co-stimulatory molecule expression as well as modulated IL-12 e TNF- $\alpha$  production. Collectively, our results provide evidence for a novel role of C3 as a critical cofactor in human DC differentiation e maturation. We also know that several parts of the immune system sense danger e communicate this information to innate immune cells which acquire the ability to instruct adaptive immune responses. The complement system is no exception. Here, we demonstrate that the cross-talk between TLR e complement receptors defines the direction e magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses. We found that the C3aR e C5aR signaling in murine spleen-derived dendritic cells have a strong impact on DC maturation in response to TLR2 or TLR4 ligation. More specifically, we found: (1) decreased MHC-II surface expression on C5aR<sup>-/-</sup> DCs, associated with reduced expression of MHC-II transactivator mRNA. Mechanistically, C5aR signaling is required for upregulation of MHC-II expression during DC development from bone marrow (BM) precursors; (2) decreased expression of costimulatory molecules on C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> dendritic cells; (3) decreased TLR2-

dependent production of IL-12p40, IL-12p70 e IL-6 by C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> dendritic cells. Importantly, C3aR- but not C5aR-signaling regulates IL-12 production by an IL-10 dependent mechanism. The strong modulation of TLR2 or TLR4-induced DC maturation negatively impacts the ability of C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> dendritic cells to prime T cell responses, i.e. to promote CD4<sup>+</sup> Th cell proliferation e differentiation in vitro. Collectively, our findings provide novel mechanistic insights of how anaphylatoxin receptor signaling in dendritic cells regulates the development of adaptive immunity.

**Key words:** Innate immunity, Complement, Dendritic cells, C3, C5.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa- aminoácido  
AA- ácido aracdônico  
APC- célula apresentadora de antígeno  
AT- anafilatoxina  
ATR- receptor de anafilatoxina  
Blimp-1- do inglês, *B lymphocyte-induced maturation protein 1*  
BSA- albumina de soro bovino  
BTK- tirosino-quinase de Bruton  
C5aRA- antagonista de C5aR  
cC1qR- receptor para a porção similar ao colágeno do C1q  
CCR- receptor de quimiocina  
CD40L- ligante de CD40  
C3DS- soro deficiente de C3  
CFSE- carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster  
CIITA- transativador de MHC-II  
C1-inh- inibidor de C1  
CR- receptor de complemento  
DAG- diacilglicerol  
DC-SIGN- do inglês, *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*  
ELISA- do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
ERK- do inglês, *extracellular-signal regulated kinase*  
f- fator  
Foxp3- do inglês, *forkhead box P3*  
GAPDH- gliceraldeído fosfato desidrogenase  
gC1qR- receptor para a porção globular de C1q  
GM-CSF- fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos  
GPCR- receptores acoplados à proteína G  
ICAM- molécula de adesão intercelular  
IFN- interferon  
IL- interleucina  
IP3- inositol 1,4,5-trifosfato

IRAK- quinase associada a IL-1R  
JNK- do inglês, *Jun-N-terminal kinases*  
LCMV- vírus causador da coriomeningite linfocítica  
LPS- lipopolissacarídeo  
LRR- repetições ricas em leucina  
MAC- complexo de ataque à membrana  
MAL- do inglês, *MyD88-adaptor-like*  
MAPK- do inglês, *mitogen-activated protein kinase*  
MASP- serino proteases associadas à MBL  
MBL- lectina ligante de manose  
MCP- proteína de membrana com atividade de co-fator  
MEK- quinase ERK  
MyD88- fator de diferenciação mielóide 88  
NF-κB- fator nuclear κB  
NHS- soro humano normal  
NK- do inglês, *natural killer*  
NOD- do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*  
iTreg- Linfócito T regulador induzido  
nTreg- Linfócito T regulador natural  
OVA- ovalbumina  
PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos  
PMA- forbol 12-miristato 13-acetato  
PLC- fosfolipase C  
PGE- prostaglandina  
PI3K- fosfoinosítido-3-quinase  
PKC- proteína quinase C  
PIP<sub>2</sub>- fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato  
PRR- receptores que reconhecem PAMPs  
PTX- toxina pertussis  
RIG-I- do inglês, *retinoid acid-inducible gene I*  
RT-PCR- do inglês, *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction*  
SAC- do inglês, *Staphylococcus aureus Cowan strain 1*  
SARM- do inglês, *sterile α- e armadillo-motif containing protein*  
SBF- soro fetal bovino

SCID- imunodeficiência combinada grave  
SDS- dodecil sulfato de sódio  
Sirp- do inglês, *signal regulatory protein- $\alpha$*   
SOCS- supressor da sinalização de citocinas  
STAT- sinal transdutor e ativador da transcrição  
TCR- receptor de célula T  
TGF- fator transformador de crescimento  
TMB- tetrametilbenzidina  
Th- do inglês, *T helper*  
TIR- Toll/IL-1R  
TIRAP- proteína adaptadora contendo domínio TIR  
TLR- do inglês, *toll like receptor*  
TNF- fator de necrose tumoral  
TRAF- fator associado ao receptor de TNF  
TRAM- molécula adaptadora relacionada ao TRIF  
Treg- Linfócito T regulador  
TRIF- do inglês, *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$*   
XBP-1- do inglês, *X-box binding protein 1*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Fig. 1.</b> Esquema ilustrativo da ativação do complemento.....	24
<b>Fig. 2.</b> Síntese, processamento e clivagens proteolíticas de C3.....	27
<b>Fig. 3.</b> Esquema representativo do componente C5.....	29
<b>Fig. 4.</b> Esquema representativo das vias de sinalização ativadas após ligação de C3aR ou C5aR.....	30
<b>Fig. 5.</b> Esquema representativo das vias de sinalização ativadas após ligação de TLR2 e TLR4.....	37
<b>Fig. 6.</b> Esquema da hipótese de trabalho.....	45
<b>Fig. 7.</b> Esquema representativo do experimento <i>in vitro</i> .....	56
<b>Fig. 8.</b> Esquema representativo do experimento <i>in vivo</i> .....	57
<b>Fig. 9.</b> Fenótipo de células dendríticas e macrófagos humanos.....	62
<b>Fig. 10.</b> Expressão de RNAm de proteínas do complemento por células dendríticas humanas.....	64
<b>Fig. 11.</b> Expressão de RNAm de proteínas do complemento por células dendríticas e macrófagos tratados com IL-1 ou dexametasona.....	66
<b>Fig. 12.</b> Secreção de proteínas do complemento por células dendríticas.....	68
<b>Fig. 13.</b> Expressão de receptores de complemento na superfície de células dendríticas humanas.....	69
<b>Fig. 14.</b> Presença de fragmentos do complemento na superfície de células dendríticas humanas.....	70
<b>Fig. 15.</b> Fenótipo de células dendríticas diferenciadas na presença de soro humano.....	71
<b>Fig. 16.</b> Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de DC-SIGN.....	73
<b>Fig. 17.</b> Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de CD1a e HLA-DR.....	75
<b>Fig. 18.</b> Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de CD80 e CD86.....	77
<b>Fig. 19.</b> Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas não modula a expressão de CD11c, CD83 e de receptores do complemento.....	79
<b>Fig. 20.</b> Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas modula a produção de citocinas.....	81

<b>Fig. 21.</b> Fenótipo de células dendríticas murinas.....	85
<b>Fig. 22.</b> Células apresentadoras de animais C5aR <sup>-/-</sup> possuem menor expressão de MHC-II. .....	87
<b>Fig. 23.</b> Sinalização pelo C5aR regula a expressão de MHC-II em células apresentadoras de antígenos.....	89
<b>Fig. 24.</b> Menor expressão de moléculas coestimuladoras nas células dendríticas de animais C5aR <sup>-/-</sup> .....	91
<b>Fig. 25.</b> Produção de citocinas por células dendríticas WT e ATR <sup>-/-</sup> .....	94
<b>Fig. 26.</b> Células dendríticas C5aR <sup>-/-</sup> têm menor habilidade de promover a proliferação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	96
<b>Fig. 27.</b> Células dendríticas C5aR <sup>-/-</sup> têm menor habilidade de promover a proliferação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	98
<b>Fig. 28.</b> Presença de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /TCR DO11.10 <sup>+</sup> no baço. ....	100
<b>Fig. 29.</b> Células de animais C5aR <sup>-/-</sup> induzem diferente polarização de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> <i>in</i> <i>vivo</i> . ....	101
<b>Fig. 30.</b> Possível ação dos fragmentos C3a/C5a na diferenciação de células dendríticas humanas.....	110
<b>Fig. 31.</b> Modelo de diferenciação de linfócitos Th induzida por células dendríticas de animais C5aR <sup>+/+</sup> ou C5aR <sup>-/-</sup> . ....	115
<b>Quadro 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs com cDNAs humanos.....	50
<b>Quadro 2.</b> Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>Western blot</i> para identificação de proteínas do sistema complemento humano.....	51
<b>Quadro 3.</b> Anticorpos utilizados para citometria de fluxo com células humanas.....	53
<b>Quadro 4.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs com cDNAs murinos. ....	58
<b>Quadro 5.</b> Anticorpos utilizados para citometria de fluxo com células murinas. ....	59

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 (MFI) em células dendríticas humanas após a adição de C3 purificado..... 82

**Tabela 2.** Expressão de DC-SIGN em células dendríticas humanas após tratamento com C3 purificado. .... 83

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 O Sistema Complemento .....	22
1.1.1 O Componente C3 .....	26
1.1.2 O Componente C5 .....	29
1.1.3 Os Receptores de Anafilatoxinas (ATRs).....	30
1.1.3.1 Receptores Clássicos .....	30
1.1.3.2. C5L2.....	32
1.2 As Células Dendríticas.....	33
1.2.1 As Células Dendríticas Humanas.....	34
1.2.2 As Células Dendríticas Murinas .....	35
1.3 TLRs.....	36
1.4 Indução e Regulação de Respostas de Linfócitos T por Complemento e TLRs ..	39
1.4.1 Ativação de Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> por Células Dendríticas.....	39
1.4.2 Complemento e TLRs Regulam a Maturação e Função de APCs .....	40
1.4.2.1 Papel do Complemento e TLRs na Regulação dos Sinais 1 e 2 .....	40
1.4.2.2 Papel do Complemento e TLRs na Regulação do Sinal 3 .....	41
1.4.2.3 Papel do Complemento e TLRs na Ativação e Diferenciação de Linfócitos T .....	42
1.5 Células Dendríticas e Sistema Complemento.....	43
1.5.1 O Componente C1q e Células Dendríticas .....	43
1.5.2 O Componente C3 e Células Dendríticas .....	44
1.5.3 O Componente C5 e Células Dendríticas .....	45
2 RESUMO E HIPÓTESE .....	46
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo Geral .....	47
3.2 Objetivos Específicos .....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
4.1 Experimentos com células dendríticas humanas .....	48
4.1.1 Obtenção de células precursoras e cultura de células dendríticas humanas..	48
4.1.2 Soro deficiente de C3.....	48
4.1.3 Extração do RNA total de células humanas.....	49
4.1.4 <i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	50
4.1.5 <i>Western blot</i> .....	51
4.1.6 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	53
4.1.7 Citometria de fluxo para células humanas.....	53
4.2 Experimentos com células dendríticas murinas .....	54
4.2.1 Animais.....	54
4.2.2 Obtenção e cultura de células murinas.....	55
4.2.3 Cultura de células dendríticas esplênicas murinas .....	56
4.2.4 Co-cultura de células dendríticas e linfócitos CD4 <sup>+</sup> .....	56
4.2.5 Experimentos <i>in vivo</i> .....	57
4.2.6 Extração do RNA total de células murinas .....	58
4.2.7 PCR em tempo real.....	59
4.2.8 Citometria de fluxo para células murinas .....	60
4.3 Análise Estatística .....	61

<b>5 RESULTADOS</b> .....	62
<i>Parte 1. Produção de Proteínas do Complemento por Células Dendríticas Humanas</i> .....	62
5.1.1 Fenótipo de células dendríticas e macrófagos humanos .....	62
5.1.2 Expressão de RNAm de proteínas do complemento .....	64
5.1.3 Produção de proteínas do complemento .....	68
<i>Parte 2. Papel do Componente C3 na Diferenciação e Maturação de Células Dendríticas Humanas</i> .....	71
5.2.1 Presença de C3 na superfície de células dendríticas .....	71
5.2.2 Fenótipo de células dendríticas cultivadas na presença de soro humano .....	72
5.2.3 Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas interfere na expressão de DC-SIGN .....	73
5.2.4 Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas interfere na expressão de CD1a e MHC-II .....	75
5.2.5 Ausência de C3 regula a expressão de CD80 e CD86 durante a diferenciação e maturação de células dendríticas .....	77
5.2.6 C3 não regula a expressão de CD11c e CD83 .....	79
5.2.7 C3 não regula a expressão de receptores de complemento .....	79
5.2.8 Ausência de C3, durante a diferenciação ou maturação das células dendríticas, interfere na produção de citocinas .....	80
5.2.9 Adição de C3 restaura os níveis de expressão de moléculas de superfície nas células dendríticas .....	83
<i>Parte 3. Papel de Receptores do Complemento na Diferenciação e Maturação de Células Dendríticas Murinas</i> .....	85
5.3.1 Complemento e Células Dendríticas Murinas .....	85
5.3.2 Fenótipo de células dendríticas murinas .....	86
5.3.3 Sinalização pelos ATRs regula a expressão de MHC-II em APCs .....	86
5.3.4 Sinalização pelo C5aR regula a expressão de MHC-II em APCs por um mecanismo dependente do transativador de MHC-II (CIITA) .....	89
5.3.5 Sinalização pelos ATRs regula a expressão de moléculas coestimuladoras ..	90
5.3.6 Sinalização por ATRs regula a produção de citocinas induzida por TLRs 2 e 4 .....	92
5.3.6.1 Produção de IL-12 por células dendríticas WT e ATR <sup>-/-</sup> .....	92
5.3.6.2 Produção de IL-10 por células dendríticas WT e ATR <sup>-/-</sup> .....	94
5.3.6.3 Produção de IL-6 por células dendríticas WT e ATR <sup>-/-</sup> .....	94
5.3.7 A sinalização pelos ATRs nas células dendríticas modula a proliferação de linfócitos CD4 <sup>+</sup> .....	95
5.3.8 A sinalização pelos ATRs nas células dendríticas modula a diferenciação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	97
5.3.9 Papel <i>in vivo</i> da sinalização via ATRs em células dendríticas .....	98
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	102
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	116
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	118
<b>ANEXOS</b> .....	133

# 1 INTRODUÇÃO

A resposta imune dos mamíferos pode ser subdividida em inata e adaptativa. A imunidade inata é filogeneticamente mais antiga e encontrada, de alguma maneira, em todos os organismos multicelulares. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, como o epitélio e substâncias anti-bacterianas produzidas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos e células *natural killer* (NK); proteínas presentes no sangue, incluindo proteínas do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e citocinas que regulam e coordenam várias das atividades desempenhadas pelas células da imunidade inata. Todos estes componentes formam uma primeira linha de defesa contra os microorganismos invasores (Beutler, 2004). A imunidade adaptativa, por sua vez, está presente somente nos vertebrados e seus componentes compreendem os linfócitos T e B bem como seus respectivos produtos. Como principais características da imunidade adaptativa podemos citar a capacidade de reconhecimento de grande repertório de moléculas e a capacidade de memória, responsável por respostas mais rápidas e vigorosas após repetidas exposições ao mesmo micróbio.

A imunidade inata e adaptativa estão intimamente ligadas e apresentam uma complexa inter-regulação. A resposta imune inata inicia-se com o reconhecimento do organismo invasor, produção de agentes inflamatórios que estimulam a resposta adaptativa, reconhecimento e processamento dos antígenos e posterior ativação de linfócitos. Assim, a eliminação completa de patógenos requer a ativação de ambos os braços da resposta imune (inata/adaptativa), sendo que as células do sistema imune inato atuam no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores que reconhecem estes PAMPs (PRRs), como os *Toll-like receptors* (TLRs) (Medzhitov e Janeway, 2002), os *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (Inohara et al., 2005) e os *retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors* (Meylan et al., 2006). Outras moléculas do sistema imune como lectina ligante de manose (MBL), C1q e anticorpos naturais (Köhl 2006) também atuam no reconhecimento dos PAMPs e conseqüente ativação do sistema imune seguido por liberação de citocinas, quimiocinas, opsoninas, anafilatoxinas e defensinas.

Como citado, moléculas como MBL e C1q são capazes de reconhecer e ligarem-se a PAMPs. Estas moléculas fazem parte do sistema complemento, componente

da imunidade inata inicialmente descrito como responsável pela opsonização e lise de microorganismos (Walport, 2001a). Hoje em dia sabemos que o complemento está envolvido em diversos processos como homeostase de tecidos, promoção de processos inflamatórios, ativação e regulação celular e também na modulação da resposta imune adaptativa (Kemper e Atkinson, 2007).

Outro componente da resposta imune inata muito importante para o desenvolvimento da resposta adaptativa é a célula dendrítica. Este papel das células dendríticas na indução da resposta imune adaptativa será discutido mais adiante com maiores detalhes, porém vale lembrar que as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (APCs), ou seja, são essenciais para a ativação de linfócitos T.

Apesar das células dendríticas terem um papel muito claro na indução da resposta imune adaptativa, pouco se sabe sobre o papel do complemento na modulação fenotípica e funcional destas células. Deste modo, neste trabalho tentaremos esclarecer alguns pontos sobre a interação destes dois componentes da imunidade inata, complemento e células dendríticas, e como esta interação pode modular a resposta de linfócitos T.

## 1.1 O Sistema Complemento

O sistema complemento é constituído por aproximadamente 30 proteínas diferentes, que podem ser encontradas na forma solúvel ou como receptores ligados à membrana de células. Estas proteínas possuem atividade proteolítica e/ou reguladora e interagem de maneira altamente específica, por meio de reações em cascata. Este sistema pode ser ativado por três vias distintas, são elas: Via Alternativa, Via Clássica e Via das Lectinas (**Fig. 1**).

A ativação da via alternativa depende de estruturas presentes nas superfícies dos organismos invasores ou da presença de IgA. A molécula de C3 desempenha um papel fundamental na ativação desta via, já que esta é continuamente ativada em baixos níveis na fase fluida por proteases do soro ou moléculas de H<sub>2</sub>O que têm acesso à ligação tiol-éster. O componente C3 cuja ligação tiol-éster foi hidrolisada, sem a perda do fragmento C3a, é chamado C3(H<sub>2</sub>O). Este tem uma conformação molecular semelhante ao fragmento C3b (Isenman et al., 1981) e habilidade de ligar o fator B (fB) anteriormente ao aparecimento do sítio de ligação para o fH. O fB é clivado pelo fD, formando uma C3-convertase de fase fluida, C3(H<sub>2</sub>O)Bb, capaz de clivar moléculas intactas de C3 (**Fig. 1**). Parte dos fragmentos C3b gerados pela C3-convertase da via alternativa são depositados na superfície

microbiana, em estreita proximidade, ligando-se à C3-convertase para formar um novo complexo, C3bBb3b. Este é a C5-convertase da via alternativa, cuja função é clivar proteoliticamente C5 (**Fig. 1**).

A via clássica é ativada após a ligação da porção globular do componente C1q a imunocomplexos contendo IgG ou IgM (Ishizaka et al., 1966). O complexo C1 é composto de uma subunidade C1q associada de maneira  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente a duas moléculas C1r e duas C1s. A molécula C1q, que não possui atividade enzimática, é a porção que está envolvida com o reconhecimento e ligação à porção Fc dessas imunoglobulinas. A ligação de duas ou mais porções globulares de C1q às imunoglobulinas leva a uma mudança conformacional na molécula de C1q (Golan et al., 1982), liberando a molécula inibidora de C1 (C1-inh) e permitindo a ativação da molécula de C1r. Como resultado, as moléculas de C1r clivam umas as outras gerando C1r ativado, que possui atividade de serino-esterase, capaz de clivar moléculas de C1s (**Fig. 1**). A molécula de C1s, quando ativada, cliva a cadeia  $\alpha$  do componente C4 formando dois fragmentos, C4a e C4b. Deste modo, a molécula C4b, através de sua ligação tiol-éster, pode ligar-se por covalência às superfícies aceptoras celulares e moleculares próximas, assegurando a ativação do complemento de modo estável e eficiente. Esta ligação permite a associação do componente C2 e sua clivagem por uma molécula de C1s, gerando um fragmento C2b e outro C2a, este último permanece fisicamente associado a C4b na superfície aceptora, na presença de íons  $\text{Mg}^{2+}$  (Schumaker et al., 1987). O complexo resultante C4b2a é a C3-convertase da via clássica, com capacidade de clivar C3 proteoliticamente. O componente C3 é clivado em um fragmento C3a e uma molécula C3b, a qual forma ligações covalentes com as superfícies celulares ou com a Ig a qual está ligado o complexo C4b2a. Isto resulta na formação de um novo complexo C4b2a3b, a C5-convertase da via clássica, que catalisa a clivagem de C5 em C5a e C5b (**Fig. 1**).

A MBL é uma lectina que, na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , se liga à N-acetilglicosamina, manose, fucose e a outros açúcares presentes nas paredes de fungos e bactérias gram-negativas. Esta proteína possui uma estrutura muito semelhante ao componente C1q e encontra-se complexada com serino proteases associadas à MBL (MASPs) (Matsushita e Fujita, 1992). MASP-1 e MASP-2 são semelhantes funcional e estruturalmente a C1r e C1s e após a ligação da MBL ao açúcar presente nas paredes dos microorganismos, as MASPs podem clivar os componentes C4 e C2, formando C3- e C5-convertases funcionais. Uma terceira serino protease, MASP-3, foi descrita nos últimos



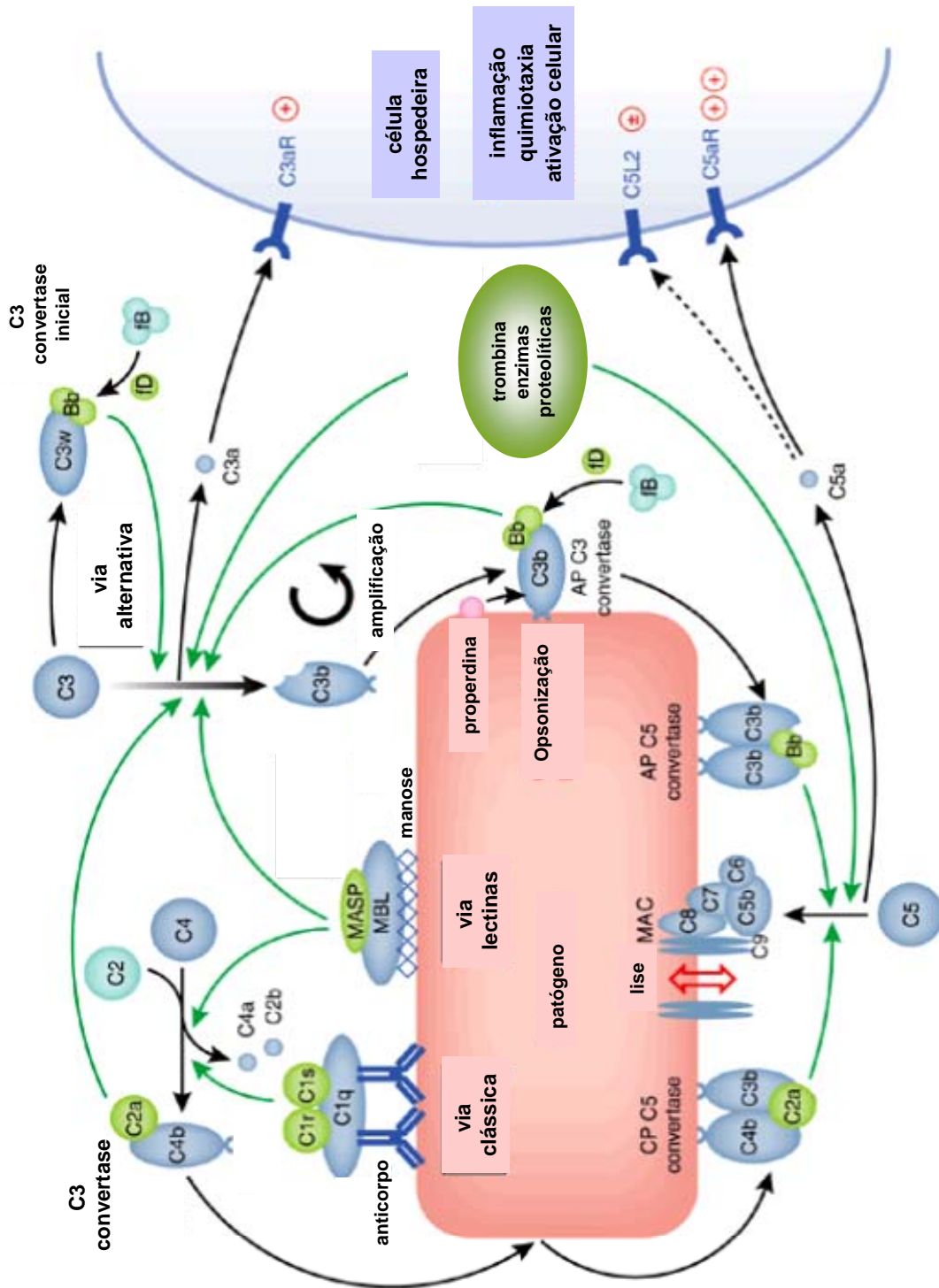
anos, porém sua função na ativação da via das lectinas ainda é objeto de estudo (Takahashi et al., 2007).

Após a formação da C5-convertase, as três vias de ativação convergem para a mesma seqüência terminal de eventos (Pangburn e Müller-Eberhard, 1984) (**Fig. 1**). Qualquer uma destas vias leva a ativação de C3, com conseqüente liberação da anafilatoxina (AT) C3a e geração do fragmento C3b. Uma posterior clivagem de C5 resulta na geração da AT C5a e do fragmento C5b. C5b, por sua vez, liga-se às moléculas C6, C7, C8 e C9, formando o complexo de ataque à membrana (MAC) (Dankert et al., 1985) (**Fig. 1**).

As AT C3a e C5a possuem uma arginina na região C-terminal que pode ser clivada por carboxipeptidases (CP) presentes no plasma. A CPN, por exemplo, remove a arginina C-terminal dos fragmentos C3a e C5a, formando C3adesArg e C5adesArg, respectivamente. Estes possuem somente 3 a 10% da atividade de C3a e C5a intactos (Bokisch e Müller-Eberhard, 1970).

A ativação de C3 e C5 promove (a) lise de patógenos (Young et al., 1986); (b) ativação de granulócitos e endotélio por concentrações sublíticas de MAC (Tedesco et al., 1997); (c) deposição de fragmentos de C3 (C3b, iC3b, C3dg) em membranas celulares ou partículas facilitando a fagocitose (Lambris, 1988), remoção de imunocomplexos (Fujita et al., 1977) e células apoptóticas (Mevorach et al., 1998), ativação de linfócitos B (Dempsey et al., 1996), alterações na transdução de sinais celulares (Hawlich et al., 2005); (d) efeitos mediados pelas ATs (Köhl 2001); e outros.

A maioria das proteínas do sistema complemento tem o fígado como principal fonte produtora, porém algumas dessas proteínas são produzidas principalmente por tecidos extra-hepáticos, como por exemplo: C1q é produzidos principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas (Castellano et al., 2004), properdina por monócitos e macrófagos, C7 por granulócitos e fD por adipócitos (Morgan e Gasque, 1997).



**Fig. 1. Esquema ilustrativo da ativação do complemento.** Via alternativa (AP) é ativada constantemente em baixos níveis, levando à hidrólise de C3 (C3w ou C3H<sub>2</sub>O) e formação da C3-convertase inicial (C3wBb). A via clássica (CP) é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e a via das lectinas por carboidratos presentes na superfície dos patógenos. A ativação do complemento leva à formação de C3- e C5-convertases e conseqüente formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e liberação das anafilatoxinas C3a e C5a. Modificado de Ricklin e Lambris (2007).

O sistema complemento pode ser considerado como um sistema de “alarme” humoral contendo (a) “sensores de perigo” como C1q, MBL e ficolinas que reconhecem estruturas potencialmente danosas ao organismo, detectando, portanto, mudanças nos ambientes teciduais; (b) “transmissores de perigo” como produtos da clivagem de C3 e C5, que transmitem os sinais para células através de receptores do complemento (CR) (C3aR, CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18), C5aR (CD88), C5L2) (Köhl, 2006). Com exceção do CR2, que está presente somente em linfócitos B e células foliculares dendríticas, os outros receptores podem ser encontrados na maioria das células de origem mielóide (Martin, 2007).

### 1.1.1 O Componente C3

O componente C3 é a proteína do complemento mais abundante no soro, estando presente em concentrações que variam de 0,8 a 1,9 mg/mL em adultos saudáveis (Ritchie et al., 2004). Os hepatócitos são os principais responsáveis pela produção de C3 (Alper et al., 1969), porém, outras células como monócitos e macrófagos (Einstein et al., 1977), polimorfonucleares (Botto et al., 1992), fibroblastos (Katz et al., 1989) e células endoteliais (Warren et al., 1987) também secretam esta proteína. Entre as proteínas do sistema complemento que se comportam como de fase aguda inflamatória, o componente C3 é a principal delas e sua síntese pode ser regulada em resposta a diversos agentes inflamatórios como IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  e lipopolissacarídeo (LPS) (Mitchell et al., 1996).

O gene *C3* está localizado, em humanos, no cromossomo 19p13.3 (cromossomo 17 em camundongos) e possui 41 éxons, abrangendo 41 kb ao todo. Os primeiros 16 éxons codificam a cadeia  $\beta$  (645 aa e 70 kDa) e os 25 éxons seguintes a cadeia  $\alpha$  (992 aa e 115 kDa) (Fong et al., 1990). A proteína C3 é sintetizada como uma pró-molécula de cadeia simples (185 kDa) e sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem de um peptídeo sinal (22 aa), a remoção de uma seqüência de 4 argininas e glicosilação (de Bruijn e Fey, 1985). Anteriormente à secreção da proteína C3 madura, forma-se uma ligação tiol-éster intracadeia e há separação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (**Fig. 2**) (Law et al., 1979).

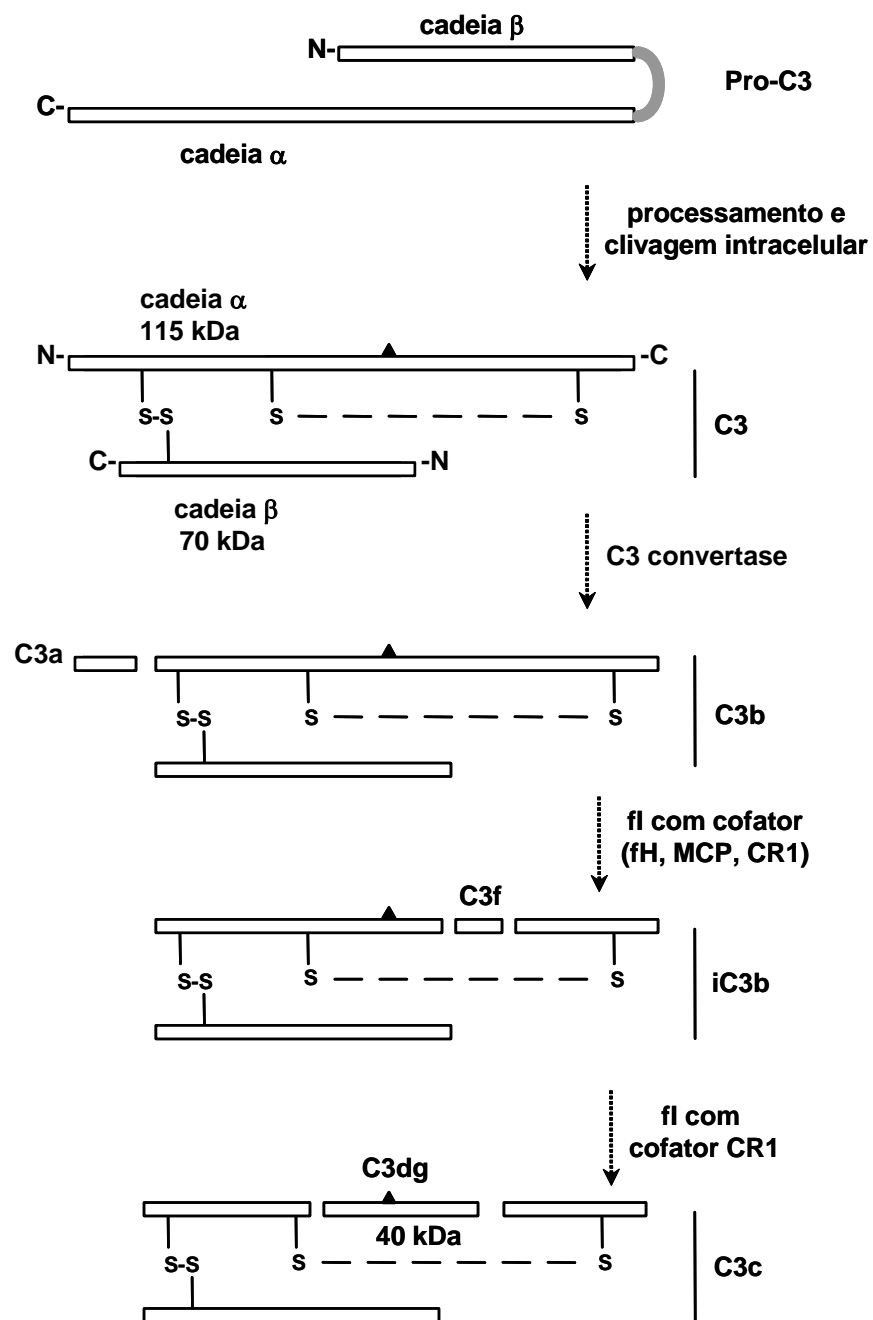
A clivagem do componente C3 por convertases da via alternativa (C3H<sub>2</sub>OBb, C3bBb) ou clássica (C4b2a), ou ainda diretamente pela MASP-1, resulta na

formação de um fragmento C3b e liberação da AT C3a, um polipeptídeo de 74-77 aminoácidos (aa) derivado da cadeia  $\alpha$  (Lambris, 1988) (**Fig. 2**). Uma das características mais interessantes da molécula C3 é sua capacidade de ligação covalente com moléculas aceptoras presentes nas superfícies celulares (Law e Levine, 1977), fato indispensável para a ativação do complemento. A ligação tiol-éster está presente na região C3d e se forma como resultado de uma transacilação entre o grupamento tiól (resíduo Cys 988) e o grupamento amida (resíduo Gln 991) (Thomas et al., 1982).

Em contraste ao C3 nativo, C3b apresenta sítios de ligação para outros componentes do complemento, incluindo C5, properdina, fH, fB, fI, CR1 e a proteína de membrana com atividade de co-fator (MCP) (Lambris, 1988). A ligação destas proteínas ao C3b pode levar tanto à amplificação da própria via alternativa, gerando mais C3-convertases (com a participação do fB, properdina e fD) e conseqüente formação do MAC, quanto à inativação do C3b (pelo fI na presença de fH, CR1 e MCP).

Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado a importância do componente C3 na resposta imune adaptativa (Carroll 2004; Dempsey et al., 1996; Kopf et al., 2002; Sohn et al., 2003; Suresh et al., 2003; Kawamoto et al., 2004). Sabe-se que animais C3<sup>-/-</sup> apresentam uma menor resposta de linfócitos B, tanto a antígenos linfócito T-dependentes, quanto independentes. O mecanismo que regula a resposta de linfócitos B envolve a interação de fragmentos e receptores presentes na superfície das células (C3b-CR1 e C3d-CR2), levando a um aumento da retenção de antígenos no tecido linfóide e diminuição do limiar de ativação dos linfócitos B (Carroll, 2004; Dempsey et al., 1996).

Também foi demonstrado um papel do componente C3 na resposta proliferativa de linfócitos T (Kopf et al., 2002). Apesar da resposta de linfócitos T ao vírus influenza mostrar-se prejudicada em animais C3<sup>-/-</sup>, a ativação destes linfócitos mostrou-se normal em animais deficientes de CR1 ou CR2, sugerindo que estes receptores não estejam envolvidos na ativação de linfócitos T, como estão envolvidos na ativação de linfócitos B (Kopf et al., 2002).



**Fig. 2. Síntese, processamento e clivagens proteolíticas de C3.** O triângulo representa a ligação tiol-éster. Modificado de Botto (2000).

Nesta mesma direção, Kawamoto et al. (2004), usando um modelo de inflamação alérgica induzida por sensibilização epicutânea com ovalbumina (OVA), demonstraram que animais C3aR<sup>-/-</sup> exibiam uma resposta T *helper* (h) 2 exacerbada, quando sensibilizados com OVA. A apresentação da OVA por APCs C3aR<sup>-/-</sup> levou a maior secreção de IL-4, IL-5 e IL-10 por linfócitos T de animais com receptor de célula T (TCR) específico para OVA. A presença do fragmento C3a inibiu a capacidade de esplenócitos secretarem citocinas tipo Th2 em resposta à ligação do TCR e esta inibição foi mediada pela liberação de IL-12 pelas APCs em resposta ao C3a, confirmando o papel do fragmento C3a na modulação da resposta Th1/Th2.

### 1.1.2 O Componente C5

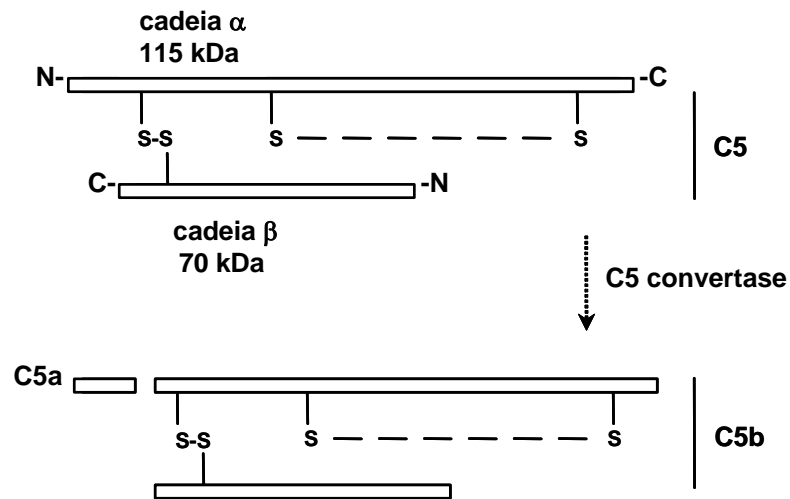
O componente C5 tem uma estrutura muito semelhante à de C3. Ele é uma glicoproteína (190 kDa) composta por duas cadeias polipeptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), ligadas entre si por uma ponte dissulfeto (Tack et al., 1979) (**Fig. 3**). Esta proteína também é principalmente sintetizada pelo fígado (Geng et al., 1986) e está presente no plasma na concentração aproximada de 75  $\mu\text{g/mL}$  (Kohler e Müller-Eberhard, 1967). Síntese desta proteína também foi encontrada no pulmão (Rothman et al., 1990), baço, intestino fetal (Colten, 1973), monócitos e macrófagos (Colten et al., 1979).

Foi demonstrado que C5 é sintetizado inicialmente como um precursor de cadeia simples (pró-C5), que contém a cadeia  $\beta$  na porção amino-terminal (Wetsel et al., 1988). O pró-C5 é traduzido de um RNA mensageiro de 5,4 kb, o qual é transcrito de um gene de 80 kb que compreende 41 éxons, localizado no cromossomo 9 humano (cromossomo 2 em camundongos) (Carney et al., 1991).

O fragmento C5a (72-74 aa), gerado após clivagem de C5 pelas convertases C3bBb3b ou C4b2a3b, participa da indução de processos inflamatórios, podendo causar contração muscular, aumento da permeabilidade vascular, desgranulação de mastócitos e basófilos e liberação de enzimas lisossomais (Gerard e Gerard, 1994). Além disso, C5a pode estimular a migração de leucócitos para sítios inflamatórios. Estudos mais recentes indicam que C5a também pode potencializar a resposta imune por meio da indução da síntese de proteínas de fase aguda como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8.

Mollnes et al. (2002) estudaram o papel do complemento na resposta inflamatória mediada por *Escherichia coli*. Foi observado que a explosão oxidativa de granulócitos e monócitos é dependente de complemento e foi reduzida em 85% após

inibição de C5, C5a ou C5aR. A expressão de CR3, opsonização e fagocitose das bactérias também foram prejudicadas após bloqueio de C5aR. Evidenciando, assim, um papel crucial da interação C5a-C5aR na regulação da expressão de CR3 e subsequente explosão oxidativa e fagocitose induzidos por *E. coli*.



**Fig. 3.** Esquema representativo do componente C5.

### 1.1.3 Os Receptores de Anafilatoxinas (ATRs)

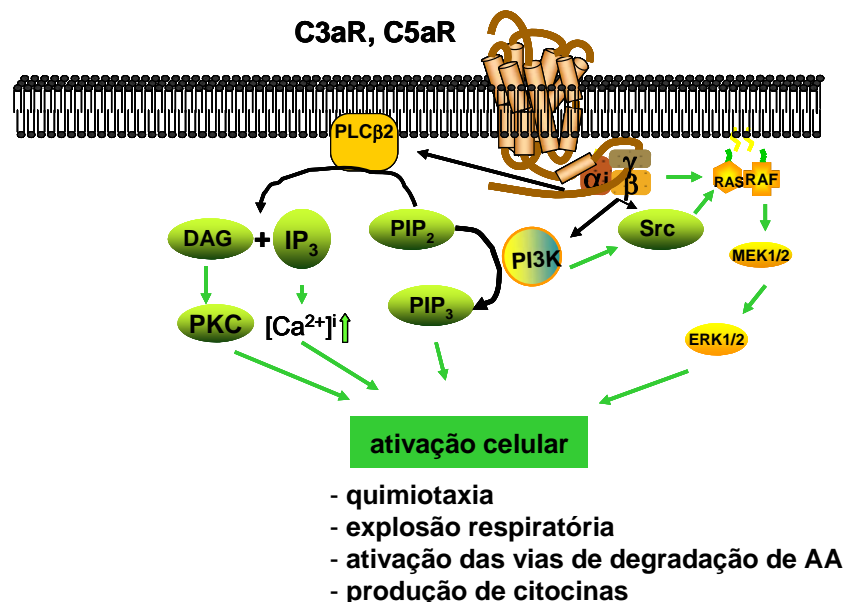
#### 1.1.3.1 Receptores Clássicos

Os fragmentos C3a e C5a exercem suas funções após ligação com seus receptores C3aR (Crass et al., 1996) e C5aR (Gerard e Gerard, 1991), respectivamente. O gene *C3aR* está localizado no cromossomo 12p13 em humanos e no cromossomo 6 em camundongos e o gene *C5aR* encontra-se no cromossomo 19q13.3 em humanos e no cromossomo 7 em camundongos. Ambos os receptores pertencem a uma grande família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). As proteínas G são compostas por 3 subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e, durante a sinalização, o sinal é transmitido via  $G_\alpha$  ou  $G_{\beta\gamma}$  (**Fig. 4**). O C5aR pode acoplar-se a duas subunidades  $G_\alpha$  distintas:  $G_{\alpha i}$  [sensível à toxina pertussis (PTX)] e  $G_{\alpha 16}$  ( $G_{\alpha 15}$  em camundongos; PTX resistente). Já C3aR, acopla-se a  $G_{\alpha 12}$  e  $G_{\alpha 13}$  (Schraufstatter et al., 2002).

As vias de sinalização ativadas após ligação do C5a ao C5aR têm sido mais estudadas, principalmente em neutrófilos humanos, onde C5aR sinaliza via  $G_{\alpha i}$  e ativa

fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)- $\gamma$ . PI3K $\gamma$  pertence a uma família de lipídeo-quinases envolvidas na geração de diferentes fosfoinositídeos que atuam como segundo mensageiro na sinalização intracelular. C5a parece ativar PI3K $\gamma$  por 2 vias de sinalização distintas (Hawlich et al., 2005): (1) G $\alpha_i$ , que ativa a GTPase Ras; e (2) G $\beta\gamma$ . Ras ou PI3K $\gamma$  ativam a cascata *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) quinase (MEK)/ ERK, induzindo a ativação de fatores de transcrição e translocação destes para o núcleo (**Fig. 4**).

A ligação de C5aR com G $\alpha_i$  e G $\alpha_{16}$  também foi descrita em monócitos e macrófagos. As subunidades G $\alpha_{16}$  e G $\beta\gamma$  podem ativar fosfolipase C (PLC), gerando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Estas moléculas medeiam a mobilização de Ca<sup>2+</sup> e ativação da proteína quinase C (PKC). Após ativação da PKC há ativação do sinal transdutor e ativador da transcrição (STAT) 3, sugerindo um papel do C5a na proliferação celular (**Fig. 4**) (Lo et al., 2003). Como todas as células de origem mielóide, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos, podem expressar estes ATRs, estas moléculas têm a habilidade de mediar a inflamação local e sistêmica e participar de processos pró- e anti-inflamatórios (Hawlich et al., 2005), regulando a liberação de citocinas e quimiocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-8 (Ember et al., 1998).



**Fig. 4. Esquema representativo das vias de sinalização ativadas após ligação de C3aR ou C5aR.** Ligação de C3a e C5a aos seus respectivos receptores ativa vias intracelulares, com conseqüente ativação celular. AA- ácido aracádico.



### 1.1.3.2. C5L2

Além do C5aR (CD88), um outro receptor chamado C5L2, foi descrito como capaz de se ligar a C5a, C3a e os produtos derivados da degradação destes fragmentos, C5adesArg e C3adesArg (Ohno et al., 2000; Cain e Monk, 2002; Okinaga et al., 2003; Kalant et al., 2003). Estes estudos concordam sobre a ligação de C5a e C5adesArg ao C5L2 e também demonstram que C5adesArg liga-se ao C5L2 com uma afinidade 10 vezes maior que ao CD88 (Cain e Monk, 2002; Okinaga et al., 2003). Por outro lado, a ligação de C3a/C3adesarg ao C5L2 é controversa. Os mesmos grupos que inicialmente relataram esta ligação não foram capazes de confirmar os resultados em um estudo mais recente, onde utilizaram um ensaio de ligação mais eficiente (Johswich et al., 2006).

Diferente do CD88, o C5L2 não se encontra acoplado à proteína G devido a mutações no domínio DRY localizado no final do terceiro segmento transmembrana. Os primeiros trabalhos envolvendo C5L2 sugeriram que a ligação deste receptor não desencadeia respostas funcionais como desgranulação, aumento da liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular ou internalização do receptor, sugerindo que a sinalização por este receptor não segue as vias já conhecidas dos GPCRs (Cain e Monk, 2002; Okinaga et al., 2003). A inibição deste receptor (Gao et al., 2005) e o uso de animais C5L2<sup>-/-</sup> (Gerard et al., 2005) em um modelo de sepse e de doença causada por deposição de imunocomplexos revelaram uma exacerbação da resposta inflamatória na ausência de C5L2. Estas propriedades anti-inflamatórias poderiam resultar da (1) atuação como um *decoy receptor* para AT; (2) oligomerização com CD88 (Klco et al., 2003; Milligan 2004) e/ou (3) ativação de vias de GPCR não clássicas (Shenoy e Lefkowitz, 2005).

Em contraste com estas observações, Chen et al. (2007a) mostraram evidências de que C5L2 funciona como um regulador positivo nas respostas induzidas por C3a e C5a. Usando células como neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, os dados sugerem que a sinalização pelo C5L2 leva à ativação de ERK e PI3K. Concordando com estes dados, Kalant et al. (2005) mostraram que C5L2 sinaliza em resposta a C3adesArg, induzindo a síntese de triglicerídeos em adipócitos. De modo geral, os dados disponíveis até o momento sugerem um complexo papel do C5L2 na resposta imune, dependendo do tipo celular e ambiente onde as ATs exercem suas funções biológicas.

## 1.2 As Células Dendríticas

Um outro componente do sistema imune inato que está intimamente relacionado com a modulação da resposta imune adquirida é a célula dendrítica. Estas células foram primeiramente identificadas em 1868, na epiderme, e nomeadas células de Langerhans. A presença destas células em outros tecidos foi notada somente um século mais tarde (Steinman e Cohn, 1973), sendo que o termo dendrítica veio da sua forma estrelada, devido a finas projeções de membrana conhecidas como dendritos. Elas representam uma população de células heterogêneas, que residem em quase todos os tecidos, especialmente pele e mucosas, onde representam 1 a 2% do número total de células locais. As células dendríticas agora são reconhecidas como integrantes do sistema hematopoético e funcionam como sentinelas do sistema imune, já que apresentam antígenos capturados nos tecidos periféricos aos linfócitos T *naïves* (Cella et al., 1997).

As células dendríticas são consideradas como as APCs mais potentes, sendo capazes de iniciar a resposta imune pela ativação de linfócitos T *naïve*. Além disso, têm um importante papel na regulação da resposta imune mediada por linfócitos T, determinando o balanço entre respostas Th1, Th2, Th17 e o desenvolvimento de linfócitos T reguladores (Treg) (de Jong et al., 2005).

No organismo, progenitores de células dendríticas podem ser encontrados no sangue e em outros tecidos, onde se diferenciam inicialmente como células dendríticas imaturas. Após a captura de antígenos, na presença de mediadores inflamatórios, as células maduras ativam linfócitos T nos órgãos linfóides secundários (Cella et al., 1997). Como será discutido mais adiante, células dendríticas maduras sintetizam altos níveis de IL-12, influenciando tanto a resposta inata (células NK) quanto a adquirida (linfócitos T e B).

Durante a maturação, o fenótipo das células dendríticas altera-se bastante; as células imaturas possuem altos níveis de alguns receptores para quimiocinas (CCR) como CCR1, CCR5 e CCR6, baixos níveis de CCR7, CD54, CD58 e das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40. Estas células têm uma alta capacidade de endocitose e apresentam altos níveis de receptor para região Fc de IgG tipo II (Fc $\gamma$ RII) e receptor para manose. Enquanto isso, as células maduras caracterizam-se pela grande expressão de moléculas de MHC classe II, CCR7, moléculas de adesão como CD54 e CD58, moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40 e baixos níveis de FcR (Caux et al., 1997). Ou seja, a maturação transforma uma célula captadora de antígenos em uma

eficiente célula apresentadora, provocando uma mudança essencial ao desenvolvimento da resposta imune.

Além de interagir com os linfócitos T nos órgãos linfóides, as células dendríticas também podem ter contatos com outros tipos celulares, incluindo linfócitos B e células NK e também podem permanecer nos tecidos periféricos, atuando como mediadores inflamatórios. Acredita-se que diferentes subpopulações de células dendríticas sejam responsáveis por diferentes funções realizadas por estas células (Shortman e Liu, 2002). Os subtipos encontrados em animais e humanos incluem células dendríticas plasmocitóides, produtoras de IFN tipo I e células dendríticas convencionais, localizadas em tecidos linfóides e não linfóides e na circulação (Wu e Liu, 2007). Estas subpopulações de células dendríticas serão abordadas em maiores detalhes nas próximas páginas.

### 1.2.1 As Células Dendríticas Humanas

Em contraste com os inúmeros estudos realizados em células dendríticas murinas, há relativamente poucos estudos em células dendríticas humanas isoladas de tecidos. Células provenientes do sangue são as mais estudadas e, na grande maioria compreendem células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas imaturas (Shortman e Liu, 2002). As células dendríticas encontradas no sangue humano são bastante heterogêneas e em contraste com as células murinas não expressam o marcador CD8 (Shortman e Liu, 2002).

A maior parte das informações referentes a células dendríticas humanas provem de estudos *in vitro*. A partir destes estudos surgiu o conceito da existência de diferentes vias de diferenciação de células dendríticas humanas (Shortman e Liu, 2002). Até o momento, foram descritas três populações precursoras destas células: (1) células CD34<sup>+</sup>, que podem ser isoladas da medula óssea ou de cordão umbilical (Young et al., 1995; Caux et al., 1996); (2) precursores plasmocitóides CD45RA<sup>hi</sup>CD11c<sup>lo</sup>IL-3R<sup>hi</sup>, encontrados no sangue, amídalas e timo (Weijer et al., 2002); e (3) monócitos sanguíneos (Sallusto e Lanzavecchia, 1994).

Sallusto e Lanzavecchia (1994) observaram que células mononucleares aderentes, isoladas do sangue periférico humano, diferenciam-se em células dendríticas que podem, por sua vez, ser mantidas em cultura por semanas na presença das citocinas

fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-4 e meio contendo soro. As células diferenciadas podem ser caracterizadas fenotipicamente, por meio de marcadores de membranas, e são consideradas células dendríticas se forem positivas para a presença dos marcadores CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, CD205, CD209, HLA-DR e negativas para o marcador CD14. Xie et al. (2005) mostraram que a diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos está relacionada com aumento na ativação das vias PI3K e MEK/ERK. Os autores observaram que a ativação de PI3K aumenta os níveis de expressão de CD1a, CD40, CD80 e HLA-DR e que a ativação da via MEK também eleva os níveis de HLA-DR. Por outro lado, a ativação da via p38 está relacionada com inibição da diferenciação, influenciando negativamente os níveis de expressão de CD1a, CD40, CD80, CD86 e HLA-DR. A inibição das vias PI3K ou MEK induziu a apoptose das células em diferenciação.

Mais recentemente foi demonstrado que estas células também expressam as moléculas CD205 e CD209. A molécula CD205 ou DEC205 é um receptor endocítico com domínios de lectina tipo C e está envolvido com o processamento de antígenos (Jiang et al., 1995). A molécula CD209 ou *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) foi caracterizada por Geijtenbeek et al. (2000). Esta molécula é uma lectina tipo C presente exclusivamente em células dendríticas, liga-se com alta afinidade nas moléculas de adesão intercelular (ICAM)-3 presente nos linfócitos e internaliza antígenos que poderão ser apresentados aos linfócitos T (Engering et al., 2002).

### **1.2.2 As Células Dendríticas Murinas**

Neste trabalho utilizamos um modelo animal onde focamos nossos estudos nas células dendríticas esplênicas, já que o baço é uma boa fonte destas células. As células dendríticas encontradas no baço diferem daquelas encontradas nos linfonodos, pois o baço não contém as células dendríticas “migratórias”, ou seja, aquelas células inicialmente presentes nos tecidos que migraram através de vasos linfáticos em resposta a algum estímulo inflamatório. No baço, estão somente células dendríticas residentes, que capturam e apresentam antígenos presentes no próprio órgão (Shortman e Naik, 2007).

Foram caracterizadas três subpopulações de células dendríticas convencionais no baço: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Vremec et al., 2000). As células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> também expressam CD205, mas não expressam *signal regulatory*

*protein-α* (Sirp- $\alpha$ ). Por outro lado, as populações CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> não expressam CD205 e expressam Sirp- $\alpha$  (Vremec et al., 2000; Lahoud et al., 2006). As células CD8<sup>-</sup>CD205<sup>-</sup> estão localizadas na zona marginal, enquanto as CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> localizam-se na área de linfócitos T (Shortman e Naik, 2007). Kamath et al. (2000) demonstraram que estas três subpopulações desenvolvem-se a partir de diferentes precursores e não representam diferentes estágios de maturação de uma mesma linhagem. Grande parte destas células dendríticas são geradas *in situ* a partir de precursores localizados no baço (Naik et al., 2006; Diao et al., 2006). Hochrein et al. (2001) demonstraram que cada um destes subtipos tem diferente habilidade na produção de citocinas. As células dendríticas CD8<sup>+</sup> podem produzir pequenas quantidades de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e produzem grandes quantidades de IL-12. Por outro lado, as células dendríticas CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> produzem IFN- $\gamma$  em resposta a IL-12 e IL-18 exógenas. E acredita-se que as células dendríticas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> não sejam grandes produtoras de citocinas.

As células dendríticas plasmocitóides também são encontradas no baço e são definidas como CD11c<sup>int</sup>CD45RA<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>. Estas células podem adquirir a morfologia e fenótipo de células dendríticas convencionais, após ativação com estímulos microbianos (Wu e Liu, 2007). Provavelmente estas células vêm do sangue, pois não são encontrados precursores no baço (Naik et al., 2006; Diao et al., 2006).

Células dendríticas murinas também podem ser obtidas após diferenciação de precursores de medula óssea na presença de GM-CSF e IL-4 (Inaba et al., 1992). Jackson et al. (2004) demonstraram que a diferenciação de células dendríticas a partir de precursores de medula é dependente das proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS). IL-4 induz um aumento nos níveis de expressão de SOCS1 através de um mecanismo dependente de STAT-1, enquanto GM-CSF induz a expressão de SOCS3. Os autores também observaram que a ativação de STAT-1 está relacionada com um aumento nos níveis de expressão de CD11c e CD40.

### 1.3 TLRs

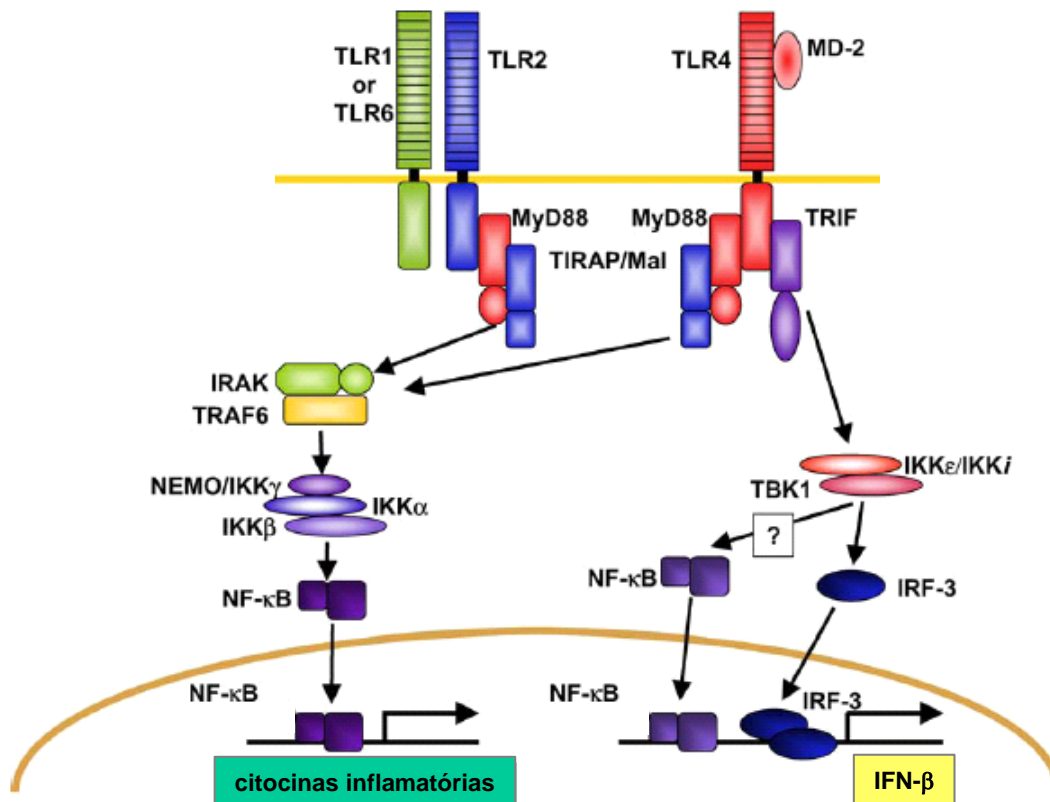
Mais de uma dúzia de TLRs foram descritos em mamíferos até o momento, os quais reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos. Alguns destes receptores, como os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6, são expressos na superfície da célula e reconhecem componentes derivados de bactérias como lipoproteínas (TLRs 1, 2 e 6), LPS (TLR4) ou flagelina (TLR5). Outros estão localizados em compartimentos intracelulares e

detectam DNA viral e bacteriano (TLR9), RNA dupla-fita (TLR3) ou RNA de fita simples (TLRs 7 e 8) (Kawai e Akira, 2007).

A porção citoplasmática dos TLRs apresenta grande similaridade com proteínas da família de IL-1R e foi denominada de domínio Toll/IL-1R (TIR). Apesar desta semelhança, as porções extracelulares destes receptores não são relacionadas. Os IL-1R possuem domínios semelhantes a imunoglobulinas e os TLRs possuem domínios de repetições ricos em leucina (LRR) (Kawai e Akira, 2007). A ligação dos TLRs leva ao recrutamento de uma série de moléculas adaptadoras que interagem com o domínio TIR. Estas moléculas são: fator mielóide de diferenciação 88 (MyD88), *MyD88-adaptor-like* (MAL ou TIRAP), *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$*  (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) e *sterile  $\alpha$ - e armadillo-motif containing protein* (SARM) (Kawai e Akira, 2007).

Neste trabalho, concentraremos nossos estudos nos TLRs 2 e 4, os quais reconhecem ligantes distintos e acoplam-se a diferentes moléculas adaptadoras. O TLR2 interage exclusivamente com o complexo MAL/MyD88, enquanto o TLR4 pode também se acoplar ao complexo TRAM/TRIF (**Fig. 5**). As moléculas adaptadoras acoplam-se posteriormente a quinases que induzem a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e membros da família de fatores reguladores de IFN (IRF). O modelo aceito atualmente é que MyD88 ativa não somente o NF- $\kappa$ B, mas também IRFs1,3 e/ou 7, resultando na indução de IFNs tipo I (Honda et al., 2005; Kawai et al., 2004). Também foi demonstrado que MAL e TRAM atuam como uma ponte, onde MAL recruta MyD88 para o TLR2 e 4 (Horng et al., 2002; Kagan e Medzhitov, 2006) e TRAM recruta TRIF para o TLR4 (Oshiumi 2003; Yamamoto 2003a; Yamamoto 2003b), permitindo a ativação de IRF-3 e subsequente produção de IFN tipo I. Foi mostrado que SARM tem um papel negativo na regulação de TRIF, sem afetar as vias dependentes de MyD88 (Carty et al., 2006).

As vias ativadas *downstream* MyDD88 envolvem a quinase associada ao IL-1R (IRAK) 4 e IRAK-1, um importante alvo do fator associado ao receptor de TNF (TRAF) 6. TRAF-6 recruta diversas outras quinases, ativando p38, *Jun-N-terminal kinases* (JNK) e MAPK, com consequente ativação de NF- $\kappa$ B. Esta via culmina na ativação da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e reguladoras incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e citocinas da família da IL-12 (Takeda e Akira, 2004).



**Fig. 5. Esquema representativo das vias de sinalização ativadas após ligação de TLR2 e TLR4.** MyD88 é uma molécula adaptadora presente no domínio TIR, essencial na indução de citocinas inflamatórias. TIRAP/MAL também são moléculas adaptadoras do domínio TIR que modulam especificamente as vias dependentes de MyD88. A via de sinalização independente de MyD88, ativada pelo TLR4, leva a ativação de IRF-3 via TBK1 e IKK. A molécula adaptadora TRIF, também presente no domínio TIR modula esta via independente de MyD88. Modificado de Takeda e Akira (2004).

Os TLRs 2 e 4 usam MAL como molécula adaptadora para o recrutamento de MyD88 e ativação das vias MAPK e NF-κB. MAL é recrutado para domínios da membrana celular contendo fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) e é fosforilado pela tirosino-quinase de Bruton (BTK), permitindo assim o recrutamento de MyD88 (Kagan e Medzhitov, 2006; Gray et al., 2006). Assim, BTK está criticamente envolvida nas vias de sinalização dependente de MyD88. BTK é um membro da família Tec de tirosino-quinases e possui um importante papel na diferenciação de linfócitos B e T (Schwartzberg et al., 2005). A ativação de receptores para antígenos presentes em linfócitos B (BCR) e T (TCR)

(Schwartzberg et al., 2005), assim como de GPCRs (Lachance et al., 2002) também provocam a fosforilação de BTK, sugerindo que os GPCRs possam regular a ativação induzida por TLR 2/4 através da molécula BTK. Além disso, o fato que C3aR e C5aR ativam PI3K (**Fig. 4**), um evento que regula o balanço entre PIP<sub>2</sub> e PIP<sub>3</sub>, sugere que a sinalização pelos ATRs possa afetar o recrutamento de MAL para a superfície celular.

## **1.4 Indução e Regulação de Respostas de Linfócitos T por Complemento e TLRs**

### **1.4.1 Ativação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> por Células Dendríticas**

A habilidade das células dendríticas em promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T está associada com o estado de “maturação” desta célula. Como dito anteriormente, células dendríticas não estimuladas são consideradas imaturas e apresentam grande capacidade endocítica, expressam baixos níveis de MHC-II e moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e não são capazes de ativar linfócitos T *naïve* (Schuler e Steinman, 1985). Estímulos para maturação como citocinas inflamatórias, ligação de TLRs ou de CD40 ligante (CD40L) presente nos linfócitos T ativados diminuem a captura de antígenos e aumentam a expressão de MHC-II e de moléculas coestimuladoras, aumentando a habilidade destas células estimularem linfócitos T. Dados recentes mostram que citocinas podem promover o aumento da expressão de MHC-II e de moléculas coestimuladoras e também induzir a proliferação de linfócitos T, entretanto, a ligação de TLR é essencial para induzir a produção de citocinas como IL-12, a qual participa na diferenciação dos linfócitos T (Sporri e Reis e Sousa, 2005).

Podemos dizer de uma maneira didática que três sinais provenientes das células dendríticas são requeridos na indução da proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve*: (i) Sinal 1, que corresponde à apresentação de complexos peptídeo/ MHC-II para os TCRs; (ii) Sinal 2, correspondendo à coestimulação; e (iii) Sinal 3, relacionado com a produção de citocinas que determinam a diferenciação das células Th em Th1, Th2, Th17 ou Treg. É sabido que células Th1 produzem grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , induzindo a ativação de macrófagos, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e são particularmente importantes na indução de IgE (Mosmann e Coffman, 1989). Mais recentemente, foi descrita a população de linfócitos Th17. Estes, além de produzirem IL-17, também secretam baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 e atuam como potentes células pró-inflamatórias. A citocina IL-23 atua na expansão de células já diferenciadas, enquanto IL-6



e TGF- $\beta$  induzem a diferenciação destas células (Langrish et al., 2005; Bettelli et al., 2007).

Também foi demonstrado que células dendríticas podem induzir a diferenciação de linfócitos T com fenótipo Treg (Steinman et al., 2003). Foi descrito que células dendríticas maduras podem promover a proliferação de Tregs naturais (nTreg) ou a geração de Tregs induzíveis (iTreg). Sabe-se que Tregs são uma população heterogênea de linfócitos T com capacidade imunossupressora. As nTregs são derivadas do timo e apresentam fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Sakaguchi, 2005), sendo que o marcador CD25 corresponde à cadeia  $\alpha$  do IL-2R e Foxp3 refere-se ao fator de transcrição *forkhead box P3*. Estas se originam no timo, necessitam de IL-2 para seu funcionamento e expansão e atuam por um mecanismo que requer contato celular (Jonuleit e Schmitt, 2003). Já as iTregs, incluindo Tr1 (Akbari et al., 2002; Akbari et al., 2001) e Th3 (Zuany-Amorim et al., 2002), são geradas na periferia, podem expressar ou não Foxp3, também necessitam de IL-2 e o efeito supressor provém principalmente através de IL-10 (Tr1) ou *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (Th3) (Bluestone e Abbas, 2003).

#### **1.4.2 Complemento e TLRs Regulam a Maturação e Função de APCs**

##### **1.4.2.1 Papel do Complemento e TLRs na Regulação dos Sinais 1 e 2**

A molécula MHC-II é uma glicoproteína de superfície de importância central na indução de respostas de linfócitos T. Com a maturação das células dendríticas, complexos MHC-II/peptídeos são transportados para a superfície celular, um evento que está associado ao aumento dramático na meia-vida destes complexos (Cella et al., 1997) e a inibição da síntese *de novo* de moléculas MHC-II (Landmann et al., 2001). Este fato se deve a uma rápida redução na síntese do transativador de classe II (CIITA), o qual atua como um dos principais reguladores da expressão do gene *MHC-II* (Reith et al., 2005).

Moléculas coestimuladoras incluem moléculas da família B7, como CD80, CD86 e também CD40. Vários estudos mostraram que citocinas inflamatórias e ligação de TLRs aumentam a expressão destas moléculas nas células dendríticas (Cella et al., 1997). A literatura referente à regulação destas moléculas por complemento é pobre, porém alguns desses estudos serão discutidos no item “Células Dendríticas e Sistema Complemento”.

### 1.4.2.2 Papel do Complemento e TLRs na Regulação do Sinal 3

As citocinas IL-12, IL-10 e IL-6 enviam sinais importantes para a modulação da diferenciação de linfócitos T. IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por 2 subunidades, p35 e p40. É produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos e seu papel principal na ponte imunidade inata-adquirida é atribuído a habilidade em induzir uma polarização Th1 com conseqüente produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos CD4<sup>+</sup> (Trinchieri, 2003). A ligação de TLRs 3, 4 juntamente com TLRs 7 e 8 desencadeia a produção de citocinas da família IL-12 de maneira sinérgica (Napolitani et al., 2005). Linfócitos T ativados, por sua vez, podem induzir a produção de IL-12 através da interação CD40-CD40L, demonstrando a natureza bidirecional da regulação da resposta imune inata. Também vale lembrar que a expressão de CD40 é dependente de TLRs (Schulz et al., 2000).

A ligação de CR3 (Marth e Kelsall, 1997) e de CD46 (Karp et al., 1996) por fragmentos derivados da ativação de C3 promovem síntese de IL-12, induzida por PRR em monócitos humanos. Também foi mostrado que a ligação de C5aR, nestas mesmas células ou em macrófagos peritoneais de camundongos, suprime a produção de IL-12, induzida por *Staphylococcus aureus Cowan strain 1* (SAC) ou LPS (Braun et al., 2000; Wittman et al., 1999; Hawlisch et al., 2005; Zhang et al., 2007). Hawlisch et al. (2005) mostraram que o C5a tem um impacto negativo na produção de IL-12 induzida por TLR4, em macrófagos peritoneais. Este fato está envolvido com a sinalização pelas vias ERK1/2 e PI3K. C5a também suprime a produção de citocinas da família IL-12, induzida pela ligação do CD40. Estes dados indicam que o C5a regula a produção de IL-12, interferindo tanto em vias da resposta inata (TLR4) quanto da adquirida (CD40). Em contraste, também foi observado que a inibição conjunta de C5aR e C5L2 diminui a produção de IL-12, induzida por SAC, em monócitos humanos (Karp et al., 2000) e a inibição de C5a reduziu a produção de IL-12 induzida por SAC em macrófagos murinos (Karp et al., 2000). Estes resultados aparentemente conflitantes puderam ser melhor entendidos após a observação de que C5a sozinho leva a um aumento de IL-12 por macrófagos murinos não tratados, por outro lado, ocorre uma diminuição na produção desta citocina por macrófagos tratados com C5a e LPS (Lalli et al., 2007). Estas observações confirmam o *cross-talk* entre as vias ativadas por C5aR e TLR e a importância do C5a na polarização da resposta imune adaptativa.

Resultados conflitantes também foram obtidos quando foi avaliado o impacto de C3a na produção de IL-12. Hawlisch et al. (2005) mostraram menor produção

de IL-12p70 em resposta a C3a por macrófagos murinos e este impacto negativo também foi observado por Zhang et al. (2007), em resposta a TLR9. Por outro lado, Kawamoto et al. (2004) observaram maior produção de IL-12 induzida por C3a em células dendríticas esplênicas de camundongos.

IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória que pode inibir a ativação e as funções efetoras de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por vários mecanismos, incluindo inibição da produção de IL-12 (Macatonia et al., 1993) e a indução de linfócitos Tr1 (Bluestone e Abbas, 2003). A produção de IL-10 por células dendríticas pode ser induzida por vias dependentes de MyD88 e TRIF através da ligação de TLRs 2, 3, 4 ou 9 (Boonstra et al., 2006). Além disso, IL-10 também pode ser induzida pela ligação de zimosan em dectina-1 (Rogers et al., 2005) ou DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2003). A literatura compreendendo o papel do complemento na produção de IL-10 é escassa, porém Weinmann et al. (2003) demonstraram que C5a, na presença de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), induz maior produção de IL-10 por células dendríticas humanas. A administração combinada de C3a e C5a *in vivo* resultou em aumento de IL-10 produzida por macrófagos peritoneais em resposta a LPS (Zhang et al., 2007).

A IL-6 é uma citocina multifuncional que pode ser produzida por células dendríticas em resposta a ligação de TLR. Foi mostrado que IL-6 tem um papel na regulação da diferenciação Th1/Th2 por ter impacto negativo na produção de IL-2 (Dodge et al., 2003) ou IL-10 (Schmidt et al., 2006), dependendo do tipo de célula estudado. Além disso, a produção de IL-6 é crítica para ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> que foram suprimidos por Tregs (Pasare e Medzhitov, 2003). Zhang et al. (2007) também observaram que a produção de IL-6 por macrófagos peritoneais, induzida por TLR4, foi regulada positivamente em resposta a C3a e C5a.

#### **1.4.2.3 Papel do Complemento e TLRs na Ativação e Diferenciação de Linfócitos T**

Como dito anteriormente, a ligação de TLRs nas células dendríticas, além de modular os sinais 1, 2 e 3 provenientes destas células, promovem, conseqüentemente a proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Há um crescente número de trabalhos demonstrando que receptores de complemento e alguns reguladores presentes na membrana também podem modular o desenvolvimento de respostas de linfócitos CD4<sup>+</sup>. É sabido que animais deficientes de C3 apresentam menor resposta (dependente de linfócitos T CD4 e CD8) contra infecções causadas pelo vírus influenza e pelo vírus causador da

coriomeningite linfocítica (LCMV), sugerindo uma contribuição de C3 e/ou C5 (Suresh et al., 2003; Kopf et al., 2002) na imunidade contra estas doenças. De modo similar, a ativação de linfócitos T, em decorrência de um transplante renal, é substancialmente reduzida na ausência da produção local de C3 por alo-enxertos (Pratt et al., 2002).

Os mecanismos envolvidos na ativação de linfócitos T por C3 ainda não foram esclarecidos. Produtos de clivagem proteolítica podem se ligar a CR3, CR4, CD46 (MCP) e/ou CD55 (DAF), e a ativação destes receptores pode estar envolvida direta ou indiretamente com a eficiência com que as APCs apresentam os antígenos. As conseqüências da sinalização pelo CD46 para a resposta adquirida são bem complexas. A ativação do CD46 em linfócitos CD4<sup>+</sup> pode tanto promover a proliferação destes quanto suprimir a função destas células (Marie et al., 2002). Além disso, a ativação CD3/CD46 nos linfócitos CD4<sup>+</sup> pode induzir a produção de IL-10 por linfócitos Tr1 (Kemper et al., 2003).

Além do CD46, CD55 foi recentemente descrito como capaz de regular a função de linfócitos T (Liu et al., 2005; Heeger et al., 2005). Em contraste com o complexo papel exercido pelo CD46, parece estar claro que o CD55 atua como um regulador negativo na resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Animais deficientes de CD55 sofrem com ativação vigorosa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e superprodução de IFN- $\gamma$  e IL-2 em resposta a antígenos (Liu et al., 2005). Este efeito protetor do CD55 foi relacionado com a ativação de C5 e estes dados concordam com as observações de que animais deficientes de C5 ou de C5aR mostram menor ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em resposta ao desafio com determinados antígenos, em modelos murinos de asma (Karp et al., 2000; Köhl et al., 2006).

Outros exemplos do papel do complemento na ativação e diferenciação de linfócitos T serão discutidos na próxima seção.

## **1.5 Células Dendríticas e Sistema Complemento**

### **1.5.1 O Componente C1q e Células Dendríticas**

O componente C1q, além de participar da ativação da via clássica, também atua na remoção de células apoptóticas e sua ausência está intimamente associada com o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Walport, 2001a).

Castellano et al. (2004) mostraram que células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos ou células CD34<sup>+</sup> são uma rica fonte de C1q. O C1q produzido por estas células é funcionalmente ativo na lise de eritrócitos de carneiro e liga-se a células apoptóticas. Também observaram que esta produção de C1q encontra-se diminuída em células dendríticas maduras. Em um trabalho mais recente, o mesmo grupo demonstrou que a presença de C1q durante a diferenciação de células dendríticas levou a menores níveis de expressão de moléculas coestimuladoras e menor produção de citocinas inflamatórias. Estas mesmas células têm menor capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T, os quais produzem níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  (Castellano et al., 2007). Esta modulação na ativação das células dendríticas causada pelo C1q foi correlacionada com o papel regulador desta molécula na prevenção da super-ativação do sistema imune.

A opsonização de células apoptóticas por C1q ou MBL aumenta a ingestão destas por células dendríticas imaturas de modo dose dependente. A ingestão de células apoptóticas opsonizadas por C1q, mas não por MBL, estimula a produção de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  pelas células dendríticas e não tem qualquer efeito na síntese de IL-12p70 (Nauta et al., 2004). Por outro lado, Yamada et al. (2004) observaram que C1q inibe a produção de IL-12p40 e TNF- $\alpha$  em células dendríticas derivadas de medula óssea. Estas células, quando tratadas com C1q, mostraram uma redução na atividade do NF- $\kappa$ B e atraso na fosforilação do p38 e quinase c-Jun, após estímulo com LPS.

Vegh et al. (2003) também observaram a produção de C1q por células dendríticas. Além disso, os receptores gC1qR e cC1qR (receptores para a porção globular e para a porção similar a colágeno de C1q, respectivamente) estão presentes na membrana de células dendríticas imaturas e diminuem em número após a maturação destas mesmas células.

### **1.5.2 O Componente C3 e Células Dendríticas**

Células dendríticas intersticiais, isoladas da pele ou diferenciadas em cultura expressam C3aR (Kirchhoff et al., 2001; Gutzmer et al., 2004). Kirchhoff et al. (2001) observaram que a expressão deste receptor é inibida quando as células dendríticas são expostas a fatores que provocam a maturação, como TNF- $\alpha$ . Outro grupo (Gutzmer et al., 2004) observou que após o aumento da expressão do C3aR em células dendríticas estimuladas com IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou PGE<sub>2</sub>, C3a induziu aumento da expressão de CD54, CD83 e CD86, mas não alterou a expressão de CD40, CD80 e HLA-DR. Além disso, C3a

é capaz de atrair monócitos e células dendríticas imaturas para a cavidade peritoneal de camundongos portadores de imunodeficiência combinada grave (SCID), revelando uma nova função para o C3a na atração de células dendríticas (Soruri et al., 2003a).

Verbovetski et al. (2002) observaram que células apoptóticas opsonizadas por iC3b são mais eficientemente fagocitadas por células dendríticas imaturas. De modo interessante, essa fagocitose iC3b-dependente induziu nas células dendríticas diminuição da expressão de CD86 e HLA-DR e um aumento de CCR7.

Também foi demonstrado que células dendríticas presentes no baço fagocitam células apoptóticas via CR3 e CR4 (Morelli et al., 2003). Após a ingestão de células apoptóticas, as células dendríticas apresentaram uma diminuição na expressão de RNAm e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e TNF- $\alpha$ .

O fragmento iC3b também está envolvido com aumento da infecção de células dendríticas pelo HIV-1. Bajtay et al. (2004) observaram que este aumento foi abolido após o bloqueio do CR3 com anticorpos específicos.

Recentemente, o grupo de S.H. Sacks demonstrou que células dendríticas murinas são capazes de secretar o componente C3 e que esta síntese está relacionada com uma melhor habilidade destas células na ativação de linfócitos T. Células dendríticas C3<sup>-/-</sup> e C3aR<sup>-/-</sup> induzem uma resposta de linfócitos T com uma polarização Th2 (Peng et al., 2006; Peng et al., 2008).

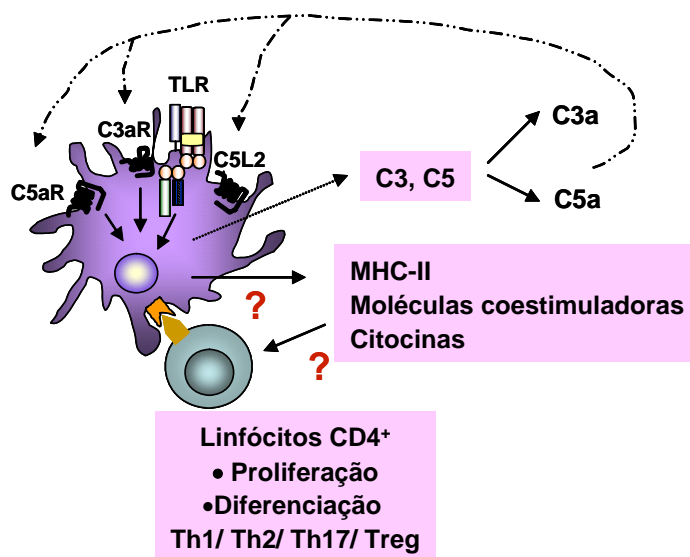
### **1.5.3 O Componente C5 e Células Dendríticas**

Células dendríticas imaturas e maduras expressam C5aR e são responsivas ao C5a no que se refere à polimerização de actina e mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Sozzani et al., 1995). Outro estudo demonstrou que a atividade quimiotática de C5a observada sobre células dendríticas não interfere na capacidade destas em liberar IL-12p70 após estímulo com CD40L (Braun et al., 2000).

Recentemente foi demonstrado que C5a induz o recrutamento de monócitos para a cavidade peritoneal de camundongos SCID, e sua diferenciação para células dendríticas (Soruri et al., 2003b). Estas células dendríticas diferenciadas *in vivo* pelo C5a são parcialmente ativadas, expressam CCR7 e podem produzir IL12-p70 após estímulo com CD40L. Esses efeitos do C5a na diferenciação das células dendríticas são indiretamente mediados pela liberação de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> por células residentes.

## 2 RESUMO E HIPÓTESE

Sabemos que vários componentes da imunidade inata são responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e indução da resposta adquirida. Entre estes componentes estão os TLRs e o sistema complemento. O estado de maturação das células dendríticas, influenciado pela ativação dos TLRs é um fator crucial nesta modulação da resposta imune. Dados da literatura atual sugerem uma participação dos ATRs no desenvolvimento de respostas de linfócitos CD4<sup>+</sup>, porém nosso conhecimento sobre esta modulação ainda é muito restrito. Deste modo, nossa hipótese é que a produção de proteínas do complemento por células dendríticas aumente em resposta ao reconhecimento de PAMPs e que estas proteínas ou fragmentos derivados da ativação interajam com receptores como C3aR, C5aR e/ou C5L2 influenciando na diferenciação e/ou maturação das células dendríticas, o que, por consequência pode afetar o curso da resposta adquirida (**Fig. 6**).



**Fig. 6. Esquema da hipótese de trabalho.** Aumento da produção de proteínas do complemento por células dendríticas em resposta ao reconhecimento de PAMPs. Proteínas ou fragmentos derivados da ativação interagem com receptores como C3aR, C5aR e/ou C5L2 influenciando na diferenciação e/ou maturação das células dendríticas, o que, por consequência, pode afetar o curso da resposta imune adaptativa.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo central deste trabalho é verificar se células dendríticas são capazes de expressar proteínas do complemento, definir o papel regulador destas proteínas na diferenciação e maturação das células dendríticas e as conseqüências desta regulação na modulação da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Análise da expressão de RNAm de proteínas do complemento, extraídos de células dendríticas humanas imaturas e maduras;
2. Análise qualitativa das proteínas encontradas no sobrenadante das células dendríticas;
3. Análise da presença de receptores de complemento na membrana das células dendríticas antes e após ativação;
4. Estudo do papel do componente C3 na diferenciação e maturação de células dendríticas humanas: análise da expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas em células imaturas ou ativadas com LPS;
5. Estudo do papel de C3aR, C5aR e C5L2 na diferenciação e maturação de células dendríticas murinas: análise da expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas em células imaturas ou ativadas com LPS ou Pam3Cys;
6. Estudo do efeito de C3aR, C5aR e C5L2, presente nas células dendríticas, na indução de respostas de linfócitos CD4<sup>+</sup>.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Experimentos com células dendríticas humanas**

#### **4.1.1 Obtenção de células precursoras e cultura de células dendríticas humanas**

Para obtenção de células precursoras, coletamos por leucoferese o sangue periférico de 35 doadores sadios, após solicitação do Termo de Consentimento Informado. Utilizamos 10 mL do sangue, o qual foi colocado em tubo de 50 mL contendo 12 mL de Ficoll-Paque. O tubo foi centrifugado a 600 x g por 30 min a 18 °C e as células mononucleares foram transferidas para outro tubo, onde foi adicionado meio de cultura RPMI-1640, seguindo-se centrifugação a 400 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas em meio RPMI e centrifugadas a 259 x g por 10 min, seguindo-se nova lavagem com RPMI e centrifugação a 90 x g por 10 min. Ao final desta etapa, o rendimento foi de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células mononucleares.

Células dendríticas foram obtidas segundo Sallusto e Lanzavecchia (1994). As células mononucleares ( $2 \times 10^7$ / poço) foram colocadas em placas de seis poços e incubadas por 2 h a 37 °C. As células não-aderentes foram desprezadas e as aderentes cultivadas por sete dias em meio de cultura RPMI contendo GM-CSF (50 ng/mL), IL-4 (50 ng/mL) e 10% de soro humano normal (NHS- mistura de soros de 130 indivíduos sadios), soro de paciente deficiente de C3 (C3DS) (Reis et al., 2004; Ulbrich et al., 2001) ou soro fetal bovino (SBF) inativado a 56 °C por 30 min. No 3º e 5º dias de cultura, 50% do meio foi retirado, completando-se com meio RPMI novo, suplementado com citocinas e soro. Quando indicado, acrescentou-se LPS (1 µg/mL), IL-1 (5 ng/mL) ou dexametasona (25 ng/mL), no 6º dia de cultura. Células cultivadas na ausência de GM-CSF e IL-4 não se diferenciaram em células dendríticas e por esta razão foram utilizadas como controle (macrófagos). Ao final do 7º dia de cultura, a viabilidade das células, verificada pelo teste de exclusão do azul de Tripán, foi sempre igual ou superior que 95%.

Nos experimentos de reposição, C3 purificado (50, 100 ou 150 µg/mL- Calbiochem- EMD biosciences) foi adicionado à cultura nos dias 1, 3 e 5.

#### **4.1.2 Soro deficiente de C3**

O soro deficiente de C3 foi obtido (após assinatura do Termo de Consentimento Informado) de um paciente com deficiência completa de C3, previamente

estudado em nosso laboratório (Ulbrich et al., 2001). Esta deficiência decorre da presença de um códon de parada prematura (R848Ter) no RNAm de C3 do paciente em questão (Reis et al., 2004). Este soro não apresenta qualquer atividade hemolítica mediada pela via clássica ou alternativa do complemento, no entanto, a adição de C3 purificado em concentração fisiológica (1 mg/mL- Calbiochem- EMD biosciences) restaura a habilidade hemolítica deste soro dentro de um padrão dose-dependente. A dosagem por ELISA detectou níveis baixíssimos de C3 no soro do paciente: 0,15 µg/mL, enquanto em indivíduos normais, estes níveis apresentam-se entre 0,8 e 1,9 mg/mL (Ritchie et al., 2004). Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram mantidas no gelo por 60 min e centrifugadas a 600 x g por 15 min a 4 °C. Alíquotas de soro foram mantidas a -80 °C e descongeladas somente na hora do uso.

#### **4.1.3 Extração do RNA total de células humanas**

Para a extração do RNA total das células dendríticas e macrófagos humanos, foi utilizado "*RNAgents® Total RNA Isolation System*" (Promega) conforme Perry et al. (1972) e Chirgwin et al. (1979). As células foram lavadas com PBS gelado, adicionando-se em seguida 300 µL de solução de desnaturação [citrato de sódio 26 mM (pH 6,8); N-lauril sarcosina 0,5%; β-mercaptoetanol 0,125 M e tiocianato de guanidina 4 M]. Foi adicionado o volume de 30 µL de NaOAc 2 M e 300 µL de uma solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 99:24:1, respectivamente, para a separação de proteínas, DNA e RNA. Depois de 15 min em banho de gelo, as células foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a 4 °C e a fase superior foi transferida para outro tubo, onde se acrescentou igual volume de isopropanol. Este tubo foi incubado a -20 °C por 24 h para precipitação do RNA. Após incubação, o conteúdo foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de EtOH 75% gelado e ressuspenso em água livre de nucleases.

O RNA extraído foi quantificado por leitura da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro *GeneQuant* (Amersham Pharmacia Biotech), considerando-se 1 D.O.= 40 µg/mL de RNA na absorbância de 260 nm. Foram utilizadas aquelas amostras que apresentaram valor de 260/ 280 nm entre 1,7 e 2,0.

#### **4.1.4 Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**

RNA total foi utilizado em RT-PCR para amplificação de cDNAs específicos. Para a síntese da primeira fita de cDNA, 200 ng de RNA total e oligo dT 500 mM foram aquecidos a 70 °C por 5 min, seguindo-se a adição dos reagentes nas concentrações finais: tampão 1x [Tris-HCl pH 8,3 50 mM; KCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM e DTT 10 mM], dNTP 0,4 mM cada e a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega) 100 U, os quais foram aquecidos a 42 °C por 1 h.

Para a amplificação de cDNAs específicos foram utilizados tampão 1x [KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; Tris-HCl pH 9,0 10 mM], dNTPs 0,4 mM cada, 0,8 pmoles de cada oligonucleotídeo (**Quadro 1**), cDNA (**Quadro 1**) e H<sub>2</sub>O para um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas por: 2 min a 94 °C; 1 min a 95 °C; 40 ciclos de 1 min de desnaturação a 95 °C, 1 min de pareamento (**Quadro 1**) e 1 min de extensão a 72 °C seguidos por uma extensão final de 5 min a 72 °C.

Os resultados foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x [pH 8,0: ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e 0,4% de EDTA 0,5 M] e coloração do gel com brometo de etídeo (1 µg/mL). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de tamanho de DNA "100 base-pair ladder" (GE Helthcare).

**Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs com cDNAs humanos.**

cDNA	volume de reação (cDNA- µL)	seqüência (5'-3')	temperatura de pareamento (°C)	fragmento amplificado (pb)
C3 humano	2	GAA GAA GCA GGA GCT CTC GG CCA CAG TTT TGT TGA TTC TGA TTC	56	1550
C5 humano	4	ACT GAT GCT CCA GAT CTT CC CAG TGA ATG TCA CCA AGT GA	54	1390
C9 humano	5	GAT GCA TAA AGA TGC GAC TTC GGC TCA CTT TCA CAA TCA TCC	50	85
Fator I humano	5	GAT GAC TTC TTT CAG TGT AGC CAG AAA CGA TGC ATG	50	744
Fator H humano	5	AAT TCT TGG AAG AGG AGA AC TTT TAA GGC ATA TGT ATA CTG	50	1483
Fator B humano	2,5	CAC CAC TCC ATG GTC TTT GGC CAC TCT GCC TTC CTG ACA GTC	54	222
Properdina humana	2	TGC TGT CTC AAC ACT GCC TT TCG TGT CTC CTT AGG TTC GT	56	407
Fator D humano	2	ATG CGC TCG GTG CAG CTG AA TCC AGC ACT GGC AAG AGC AC	56	407
CR1 humano	2,5	CTA CCA ACC TAA CTG ATG AG ATC GTC ATT GCT GGT GCA GT	56	500
CR2 humano	2,5	GAG GAA GGA GTG AAC TTC ATG CGT ATT TCC ACC TGT ATG ATG	56	1105
GAPDH humano	0,5	TCT CTG CTC CTC CTG TTC GAC GGA TCT CGC TCC TGG AAG ATG	50	319

**4.1.5 Western blot**

A análise qualitativa de proteínas encontradas nos sobrenadantes celulares foi feita por *Western blot*. O sobrenadante celular [em tampão Tris-HCl pH 6,8 50 mM; dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,1%; ditioneitol (DTT) 40 mM] foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida [solução de acrilamida 10%; Tris pH 8,8 375 mM; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; N,N,N,N-tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,04%] em tampão Tris-glicina pH 8,3 [Tris básico 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%] para separação das proteínas conforme a massa molecular. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose no tampão Tris-HCl 15,6 mM e glicina 120 mM (pH 8,3), utilizando "*Semi-Dry blotter*" (Sigma), onde se aplicou uma corrente de 0,8 mA por cm<sup>2</sup> de membrana durante 4 h. A membrana foi lavada por 5 min com TBST [Tris 5 mM pH 8,0; NaCl 75 mM e tween 20 0,028%] e então bloqueada por 18h com TBST contendo leite desnatado 5%. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 3 vezes com 25 mL de TBST, quando se

adicionou o 1º anticorpo na diluição determinada previamente (**Quadro 2**) em TBST/ leite desnatado 5 % por 18h. Foi realizada nova lavagem com TBST e a adição do 2º anticorpo (**Quadro 2**) por 2 h. A membrana foi lavada novamente com TBST e depois com APB [NaCl 100 mM; Tris 100 mM pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM]. A membrana foi então incubada em 10 mL de APB acrescidos de 6 µL de NBT (Nitro Blue Tetrazolium- 1mg/mL em dimetilformamida 70% em EtOH) e 3 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indodil fosfato- 0,25 mg/mL em dimetilformamida 100%) para revelação.

**Quadro 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de Western blot para identificação de proteínas do sistema complemento humano.**

<b>Especificidade</b>	<b>1º Anticorpo</b>	<b>2º Anticorpo</b>
anti-C1q humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-C3 humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:2.000	
anti-C5 humano	fonte: coelho (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:500	
anti-C7 humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-C8 humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-C9 humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-fI humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-fH humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-fB humano	fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-fD humano	fonte: carneiro (The Binding Site) diluição 1:1.000	
anti-C4bp humano	fonte: coelho (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:1.000	
anti-IgG de cabra		fonte: coelho (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:10.000
anti-IgG de carneiro		fonte: coelho (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:10.000
anti-IgG de coelho		fonte: cabra (Calbiochem EMD biosciences) diluição 1:10.000

#### 4.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A presença das citocinas IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas de células dendríticas foi analisada por meio de ensaios imunoenzimáticos com *Human ELISA Set* ou *Mouse ELISA Set* (BD OptEIA™ BD Biosciences). O anticorpo específico para a proteína de interesse foi diluído (1:250) em tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M) e imobilizado em placa de poliestireno para ELISA (50  $\mu$ L/ poço) a 4 °C por 18h. A placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween pH 7,5 [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05 %] e bloqueada com 100  $\mu$ L/ poço de PBS contendo 10% SBF por 1 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente por 3 vezes com PBS/Tween, em seguida foram adicionados 50  $\mu$ L do sobrenadante das culturas e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 h. Após 5 lavagens, 50  $\mu$ L do segundo anticorpo conjugado com biotina (diluído 1:250 em PBS/ 10% SBF) e reagente de detecção (peroxidase conjugada com estreptavidina na diluição de 1:250) foram adicionados, seguindo-se mais uma incubação à temperatura ambiente por 1 h e nova lavagem. Por fim, acrescentou-se o substrato tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas à temperatura ambiente de 20 a 40 min, quando a reação foi bloqueada com 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A densidade óptica foi determinada após leitura em espectrofotômetro a 405 nm e a concentração protéica foi definida a partir de curva padrão. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

#### 4.1.7 Citometria de fluxo para células humanas

Para verificar a expressão de moléculas de superfície em macrófagos e células dendríticas humanas, as células foram marcadas, em vários momentos da cultura, com anticorpos monoclonais e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur).

Em um tubo,  $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  células foram misturadas com anticorpo específico (**Quadro 3**) para o marcador de interesse em tampão PBS, albumina de soro bovino (BSA) 1%, NaN<sub>3</sub> 0,02% em um total de 25  $\mu$ L e incubados por 30 min a 4 °C. O tubo foi então centrifugado e as células lavadas duas vezes com 200  $\mu$ L de tampão PBS/BSA. Por fim, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão para citometria de fluxo [PBS contendo 0,5% de BSA, 0,02% de azida sódica e 2% de formaldeído] e analisadas no citômetro usando-se o programa *CellQuest* (BD Biosciences).

### Quadro 3. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo com células humanas.

Especificidade	Marcação	Isotipo	Fabricante
anti-CD1a humano	FITC/ PE/ APC	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD11c humano	FITC/ PE	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD14 humano	FITC	IgG2a camundongo	BD Biosciences
anti-CD18 humano	PE	IgG1 camundongo	Dako
anti-CD35 humano	FITC	IgG1 camundongo	Dako
anti-CD40 humano	FITC/ PE	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD80 humano	FITC/ PE	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD83 humano	FITC/ PE	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD86 humano	FITC/ PE	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-CD205 humano	FITC	IgG2b camundongo	AbD Serotec
anti-CD209 humano	FITC	IgG2b camundongo	BD Biosciences
anti-HLA-DR humano	FITC/ PE/ APC	IgG1 camundongo	BD Biosciences
anti-C3 humano	–	soro de cabra	Calbiochem- EMD Biosciences
anti-IgG cabra	FITC	soro de coelho	SIGMA

FITC- isotiocianato fluoresceína, PE- ficoeritrina, APC- alofococianina.

## 4.2 Experimentos com células dendríticas murinas

### 4.2.1 Animais

Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos no biotério de experimentação do Cincinnati Children's Hospital- Cincinnati, Ohio, EUA e os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética desta instituição.

Camundongos Balb/c foram obtidos do *Jackson Laboratories* (Bar Harbor) e os camundongos DO11.10/RAG2KO da *Taconic* (Germantown). Os animais DO11.10/RAG2KO são deficientes para o gene de ativação da recombinase 2 e possuem linfócitos T CD4 transgênicos para um TCR $\alpha\beta$  específico para o peptídeo de ovalbumina (OVA)<sub>-323-339</sub> (Murphy et al., 1990). Animais deficientes para o receptor de C3a (C3aRKO) (Humbles et al., 2000), C5a (C5aRKO) (Gerard e Gerard, 1991) e C5L2 (C5L2KO) (Gerard et al., 2005) foram retrocruzados para o *background* Balb/c (n=7). No momento dos experimentos, os animais utilizados (machos e fêmeas) possuíam entre 8 a 12 semanas de vida.

#### 4.2.2 Obtenção e cultura de células murinas

Para obtenção de células dendríticas esplênicas, o baço foi tratado por 45 min a 37 °C em uma solução de 0,5 mg/mL de Liberase C1 (Boehringer) e 0,5 mg/mL de DNase (Sigma) em 5 mL de RPMI, seguindo-se com lise dos eritrócitos com tampão de lise [155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub> e 0,1 mM EDTA]. A suspensão de células foi mantida durante todo o processo no tampão 0,5% BSA e 2 mM EDTA em PBS gelado. A seleção positiva das células CD11c<sup>+</sup> (células dendríticas) foi realizada com microesferas magnéticas conjugadas com anti-CD11c (Miltenyi Biotec), alcançando-se pureza sempre ≥ 95%.

Linfócitos B *naïve* também foram isolados do baço por seleção negativa, utilizando-se um coquetel de anticorpos (marcados com biotina) contra CD43, CD4 e Ter-119 e microesferas magnéticas conjugadas com anti-biotina (Miltenyi Biotec), resultando em uma população de ≥ 98% de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* foram selecionados negativamente por eliminação, após tratamento das suspensões de células esplênicas utilizando-se um coquetel de anticorpos (marcados com biotina) contra CD8a, CD45R, CD49b, CD11b e Ter-119 e microesferas magnéticas conjugadas com anti-biotina (Miltenyi Biotec). A pureza alcançada foi ≥ 90%.

Macrófagos foram conseguidos após lavagem peritoneal com 7 mL de PBS. Após lise das hemácias com tampão de lise, as células foram plaqueadas (1 x 10<sup>7</sup>/poço em placas de 6 poços) em RPMI suplementado com 10% de SBF inativado. Após 2 h a 37 °C, as células foram lavadas com PBS para retirada das células não aderentes. As células aderentes foram cultivadas por 24 h a 37 °C na presença ou ausência de 2 ng/mL de IFN- $\gamma$ .

Células de medula óssea foram obtidas após lavagem do interior de fêmures e tíbias com PBS e lise das hemácias. Para obtenção de células dendríticas, as células provenientes da medula foram plaqueadas (1 x 10<sup>6</sup> células/mL em placas de 6 poços) em RPMI suplementado com 10% de SBF e 10 ng/mL de GM-CSF. O meio de cultura foi renovado nos dias 2, 4 e 6 (Inaba et al., 1992). Onde indicado, um antagonista de C5aR e C5L2 (C5aRA) (Heller et al., 1999) foi utilizado (400 nM) durante todo o período de diferenciação.



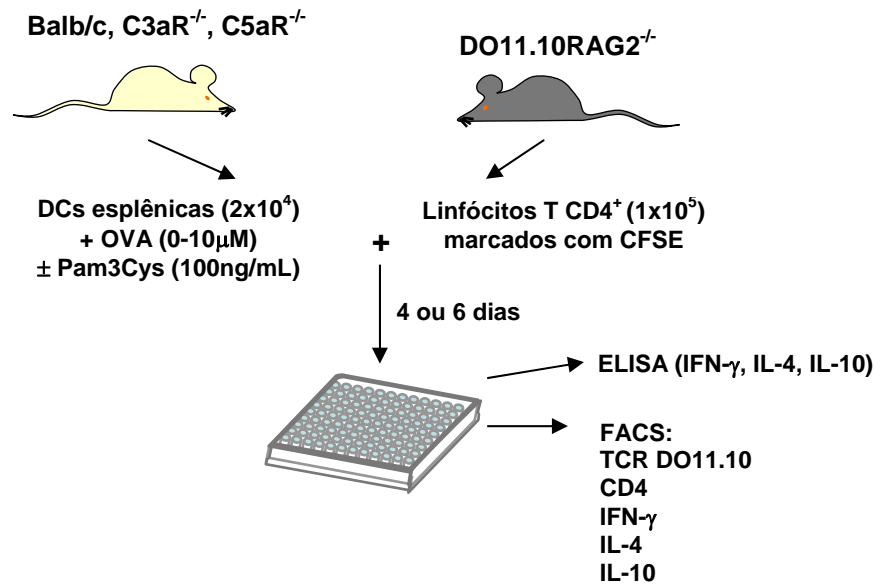
#### 4.2.3 Cultura de células dendríticas esplênicas murinas

Após isolar as células CD11c<sup>+</sup>, estas ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas em 500  $\mu$ l de RPMI e 10% de SBF, em placas de 48 poços. Onde indicado, as células foram estimuladas com LPS (200 ng/mL- Sigma) ou Pam3Cys (ligante sintético de TLR2- 100 ng/mL-Sigma) por 18-20 h. Em alguns experimentos, as células foram estimuladas simultaneamente com Pam3Cys e anti-CD40 (10  $\mu$ g/mL, clone FGK45- agonista, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. D. Hildeman- University of Cincinnati) e/ou anti-IL-10R (1  $\mu$ g/mL, clone 1B1.3a- neutralizante, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. F. Finkelman- University of Cincinnati) ou os isotipos apropriados. O anti-IL-10R foi administrado 1 h antes da estimulação com Pam3Cys.

#### 4.2.4 Co-cultura de células dendríticas e linfócitos CD4<sup>+</sup>

Células dendríticas esplênicas ( $2 \times 10^4$ ) estimuladas ou não com Pam3Cys foram cultivadas na presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* ( $1 \times 10^5$ ) em placas de 96 poços, em um volume total de 200  $\mu$ l de meio de cultura. As culturas foram realizadas na presença de 0; 0,01; 1,0 ou 10  $\mu$ M de OVA (Sigma), conforme Boomstra et al. (2003). Após seis dias, as células foram utilizadas para detecção de citocinas intracelulares por citometria de fluxo e os sobrenadantes foram utilizados para detecção de citocinas por ELISA (**Fig. 7**).

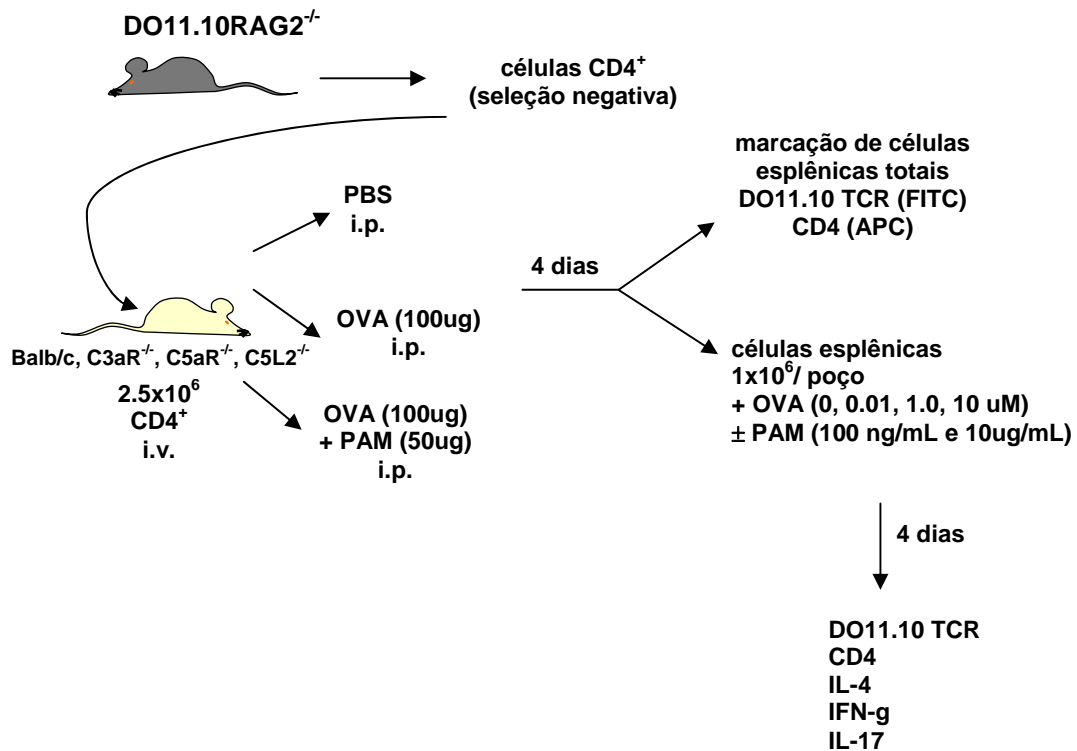
Nos ensaios de proliferação celular, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram marcados com 2  $\mu$ M de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE- Molecular Probes) em PBS por 15 min à temperatura ambiente. A co-cultura célula dendrítica- linfócito T foi feita como descrito anteriormente e incubada por quatro dias, seguida de leitura no citômetro de fluxo.



**Fig. 7. Esquema representativo do experimento *in vitro*.** Este envolve a co-cultura de células dendríticas (DCs) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para o TCR que reconhece o peptídeo OVA<sub>323-339</sub> associado a MHC-II tipo I-A<sup>d</sup>.

#### 4.2.5 Experimentos *in vivo*

Animais controle, C3aRKO, C5aRKO e C5L2KO, todos com *background* genético Balb/c receberam  $2,5 \times 10^6$  linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* (em 400  $\mu$ L de PBS) via endovenosa e PBS, OVA (100  $\mu$ g) ou OVA (100  $\mu$ g) + Pam3Cys (50  $\mu$ g) via intraperitoneal (em 200  $\mu$ L de PBS) (Dillon et al., 2004). Após quatro dias, os animais foram sacrificados, os baços foram isolados e  $1 \times 10^6$  células de cada animal foram utilizadas para marcação (CD4/ TCR DO11.10- específico para o TCR dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais DO11.10/RAG2KO) e análise após citometria de fluxo. O restante das células do baço foi utilizado para isolamento das células CD4<sup>+</sup> e re-estimulação *in vitro* na presença de anti-CD3 e anti-CD28 (5 $\mu$ g/mL) em 200  $\mu$ L de RPMI ( $1 \times 10^6$  por poço-placa de 96 poços). Após três dias, as células foram utilizadas para detecção de citocinas intracelulares por citometria de fluxo e os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de citocinas por ELISA (**Fig. 8**).



**Fig. 8. Esquema representativo do experimento in vivo.** Este envolve a co-cultura de células esplênicas e linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para o TCR que reconhece o peptídeo OVA323-339 associado a MHC-II tipo I-Ad.

#### 4.2.6 Extração do RNA total de células murinas

Para extração do RNA de macrófagos e células dendríticas murinos foi utilizado *Trizol<sup>®</sup> Reagents* (Invitrogen) (Chomczynski e Sacchi, 1987). As células foram lisadas diretamente em 1 mL de Trizol, passando-as várias vezes por uma agulha 21G1 e utilizando seringas de 5 mL. O lisado foi colocado em um tubo de 2 mL, onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa e incubação por 3 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C e a fase superior foi transferida para outro tubo, onde se acrescentou igual volume de isopropanol. Este novo tubo foi incubado por 10 min à temperatura ambiente e novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. O precipitado de RNA foi lavado com EtOH 75% e ressuspenso em água livre de nucleases. O DNA genômico residual foi removido após incubação de 1 µg de RNA com 1 U de *RNase-free DNase I* (Sigma) em tampão 1X [20 mM Tris-HCl pH 8,3 e 2 mM MgCl<sub>2</sub>] por 10 min à temperatura ambiente. A reação foi

interrompida após adição de EDTA em uma concentração final de 5 mM, seguindo-se incubação a 70 °C por 10 min para desnaturação de ambos, DNase e RNA.

#### 4.2.7 PCR em tempo real

A reação para amplificação de cDNAs foi realizada conforme descrito anteriormente (item 4.1.4.). Esta reação contendo cDNAs foi diluída (1/5) e 9 µl foram utilizados, juntamente com 1 µl da mistura dos oligonucleotídeos (100 nM) de interesse (**Quadro 4**) e 11 µl de *iQ™ SYBR® Green Supermix* [2X mix: 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,4 mM de cada dNTP; 50 U/mL iTaq DNA polimerase; 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I; 20 nM fluoresceína] (Bio-Rad Laboratories). O ciclo de amplificação utilizado foi: 95°C por 10 s, 54°C -58°C por 5 s e 72°C por 20 s, utilizando-se o *iQ™5 Optical System* (iCycler- Bio-Rad Laboratories). A amplificação de cDNAs específicos foi quantificada a partir de uma curva padrão baseada em concentrações conhecidas de cDNA. Análise da curva de dissociação e do gel de agarose confirmaram a amplificação de um único produto.

**Quadro 4. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs com cDNAs murinos.**

cDNA	quantidade cDNA (µL)	seqüência (5'-3')	temperatura de pareamento (°C)	fragmento amplificado (pb)
MHC-II camundongo	9	GGCACCATCTTCATCATT CAGCACACCACTTCTTCC	58	124
CIITA total	9	GCTACCTGGAACCTTAAC AGGTCCATCTGGTCATAGAG	54	70
CIITA tipo I	9	AAGAGCTGCTCTCACGGGAAT GGTCGGCATCACTGTTAAGGA	54	264
CIITA tipo III	9	ATCACTCTGCTCTCTAAATC AGGTCCATCTGGTCATAG	54	178
GAPDH camundongo	9	TGCACCACCAACTGCTTA GGATGCAGGGATGATGTTTC	54	195

#### 4.2.8 Citometria de fluxo para células murinas

A detecção de marcadores de superfície em macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T foi realizada como descrito anteriormente (item 4.1.7.) utilizando anticorpos específicos (**Quadro 5**).

Para detecção de citocina intracelular, as células em cultura foram re-estimuladas com 50 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA- Sigma) e 500 ng/mL de ionomicina (Calbiochem- EMD biosciences) por 3 h, na presença de brefeldina A (10 µg/mL- Sigma), a qual é responsável pelo bloqueio do complexo de Golgi. As células foram então fixadas utilizando-se 500 µL de formaldeído 2% em PBS por 20 min, seguindo-se 2 lavagens com 1 mL de PBS/BSA. Após esta etapa, as células foram permeabilizadas por 10 min em 500 µL de saponina 0,5% em PBS/ BSA, seguindo-se lavagem com PBS/BSA e incubação por 30 min com os anticorpos específicos (**Quadro 5**) diluídos em tampão PBS/ BSA/ saponina. As células foram, então, lavadas novamente por 2 vezes e analisadas no citômetro de fluxo citômetro (FACSCalibur) utilizando o programa *CellQuest* (BD Biosciences).

**Quadro 5. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo com células murinas.**

Especificidade	Marcação	Isotipo	Fabricante
anti-MHC-II (I-A <sup>b</sup> )	FITC	IgG2a camundongo	BD Biosciences
anti-MHC-II (I-A <sup>d</sup> )	FITC	IgG3 camundongo	BD Biosciences
anti-CD4 murino	FITC/ APC	IgG2a rato	e-Biosciences
anti-CD11b murino	APC	IgG2b rato	BD Biosciences
anti-CD11c murino	APC	IgG1 hamster	e-Biosciences
anti-CD19 murino	PE	IgG2a rato	BD Biosciences
anti-CD40 murino	APC	rat IgG2a	e-Biosciences
anti-CD45 murino	APC	rato IgG2b	BD Biosciences
anti-CD80 murino	PE	IgG2 hamster	BD Biosciences
anti-CD86 murino	PE	IgG2a rato	BD Biosciences
anti-F4/80 murino	PE	IgG2b rato	AbD Serotec
anti-DO-11.10 TCR	FITC	IgG2a camundongo	e-Biosciences
anti-IL-4 murino	PE	IgG1 rato	e-Biosciences
anti-IL-10 murino	APC	IgG2b rato	e-Biosciences
anti-IL-17 murino	PE	IgG2a rato	e-Biosciences
anti-IFN-g murino	APC	IgG1 rato	e-Biosciences

FITC- isotiocianato fluoresceína, PE- ficoeritrina, APC- alofocianina.

### **4.3 Análise Estatística**

Os dados obtidos por citometria de fluxo, ELISA e PCR em tempo real foram submetidos ao teste *t Student* (análise pareada- dados humanos) ou ao teste ANOVA (dados murinos) utilizando-se o programa SigmaStat 3.5. Distribuição normal foi assumida para todas as amostras. Consideramos os dados significantes quando  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

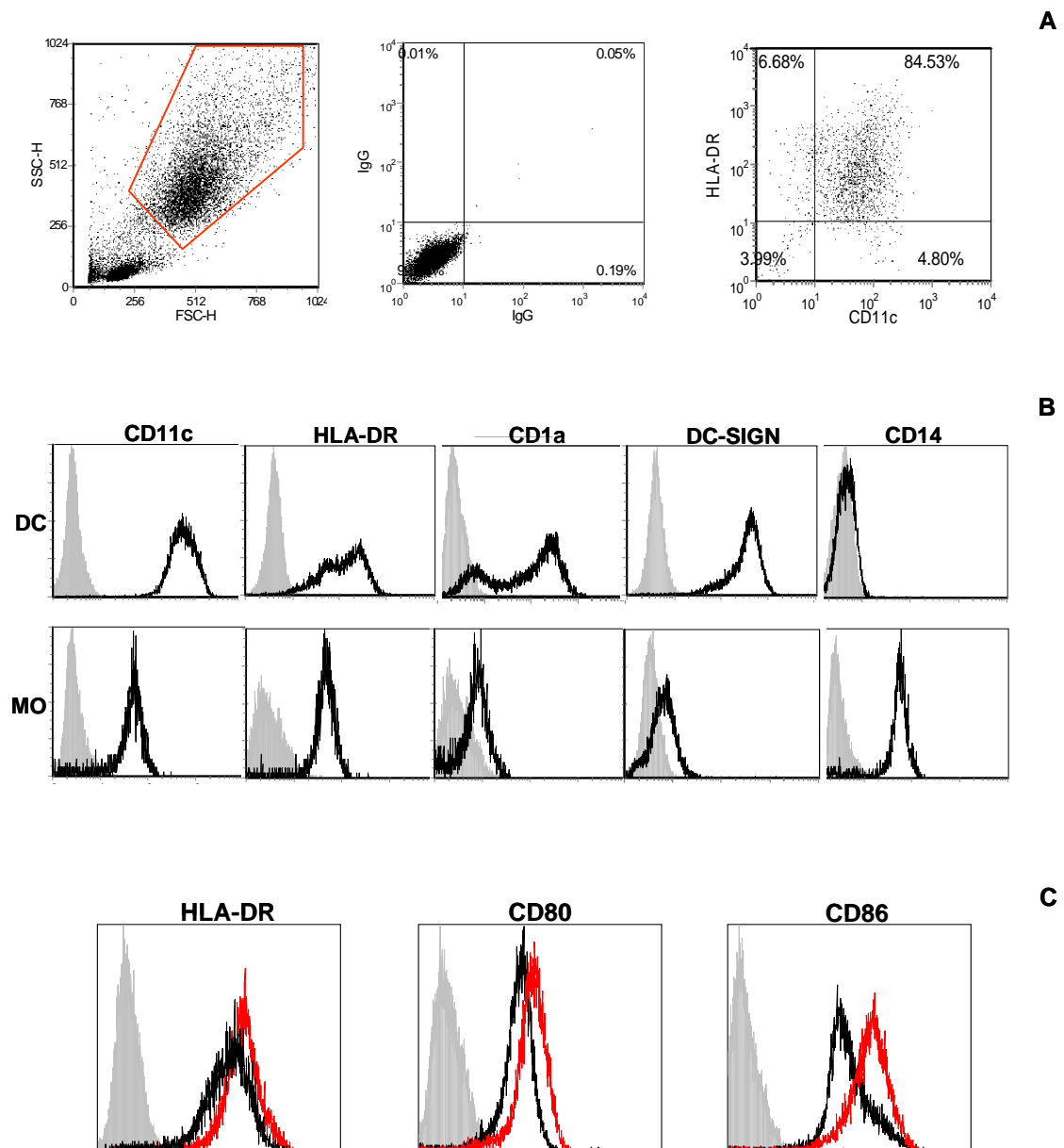
### ***Parte 1. Produção de Proteínas do Complemento por Células Dendríticas Humanas***

Os resultados descritos nesta seção encontram-se publicados em:

- ES Reis, JAM Barbuto, L Isaac. Human monocyte-derived dendritic cell are a source of several complement proteins. *Inflamm. Res.* (2006) 55: 179-184.
- ES Reis, JAM Barbuto, L Isaac. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiol.* (2007) 212: 151-157.

#### **5.1.1 Fenótipo de células dendríticas e macrófagos humanos**

Células dendríticas e macrófagos foram derivados *in vitro* a partir de monócitos humanos do sangue periférico. Após a diferenciação, as células dendríticas foram caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo e mostraram-se como uma população duplo positiva para a expressão de HLA-DR e CD11c (**Fig. 9A**). As células dendríticas puderam ser fenotipicamente diferenciadas dos macrófagos, pois apresentaram maior expressão de CD11c, HLA-DR, CD1a, DC-SIGN e menor expressão de CD14, quando comparadas com os macrófagos (diferenciados a partir dos mesmos monócitos humanos, porém na ausência de citocinas) (**Fig. 9B**). As células dendríticas imaturas apresentaram menor expressão de HLA-DR e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, quando comparadas com as células maduras, obtidas após estímulo com LPS (**Fig. 9C**).



**Fig. 9. Fenótipo de células dendríticas e macrófagos humanos.** Células dendríticas (DC) e macrófagos (MO) foram diferenciados por 7 dias na presença de GM-CSF e IL-4 e a expressão de moléculas de superfície foi analisada por citometria de fluxo. **A.** Delimitação do *gate* (em vermelho), marcação com os isotipos controle (IgG) e dupla marcação para CD11c e HLA-DR em DCs imaturas. **B.** Expressão de moléculas de superfície em DCs e macrófagos. **C.** Expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em DCs imaturas (preto) e após estímulo com LPS (1 $\mu$ g/mL) por 24h (vermelho). Histogramas em cinza correspondem ao isotipo controle. Resultados similares foram obtidos em diferentes experimentos usando células de diferentes doadores.

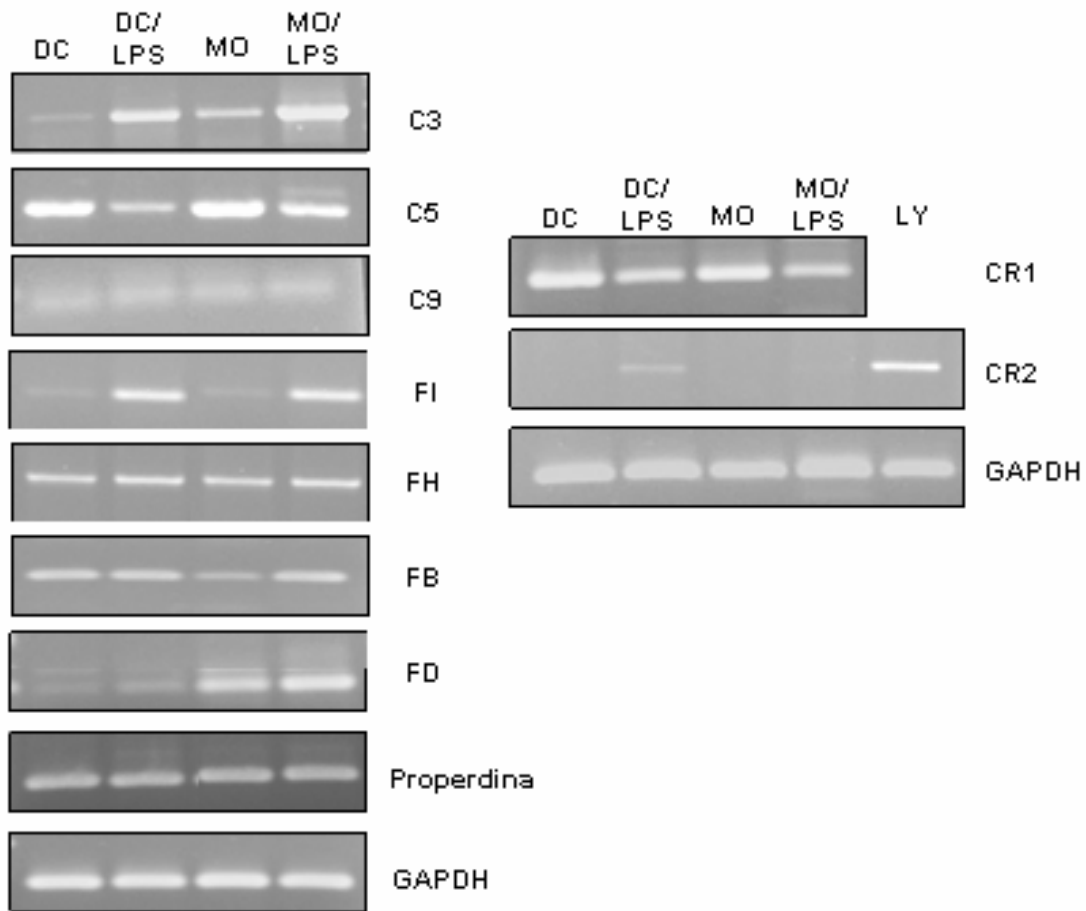


### 5.1.2 Expressão de RNAm de proteínas do complemento

Para avaliar a expressão de RNAm de proteínas do complemento, extraiu-se o RNA total das células dendríticas imaturas e maduras, bem como de macrófagos. Os respectivos RNAs foram amplificados por RT-PCR e, conforme mostrado na **Fig. 10**, pudemos observar a expressão de RNAs de quase todas as proteínas testadas (C3, C5, C9, fI, fH, fB, fD, properdina e CR1), em diferentes graus, tanto pelas células dendríticas imaturas quanto maduras, assim como pelos macrófagos.

Há aumento na expressão de RNAm de C3 e fI e diminuição na expressão de RNAm de C5 e CR1 nas células dendríticas maduras, ao passo que a expressão de RNAm de C9, fH, fB e fD não se alterou durante a maturação das células dendríticas. A amplificação dos RNAs foi muito parecida entre células dendríticas e macrófagos, com exceção de fB e fD. Não se observou aumento na expressão de RNAm de fB em células dendríticas estimuladas com LPS, mas houve aumento dessa expressão de fB nos macrófagos estimulados com LPS. Já a expressão de RNAm de fD, mostrou-se menor nas células dendríticas, quando comparada com os macrófagos (**Fig. 10**).

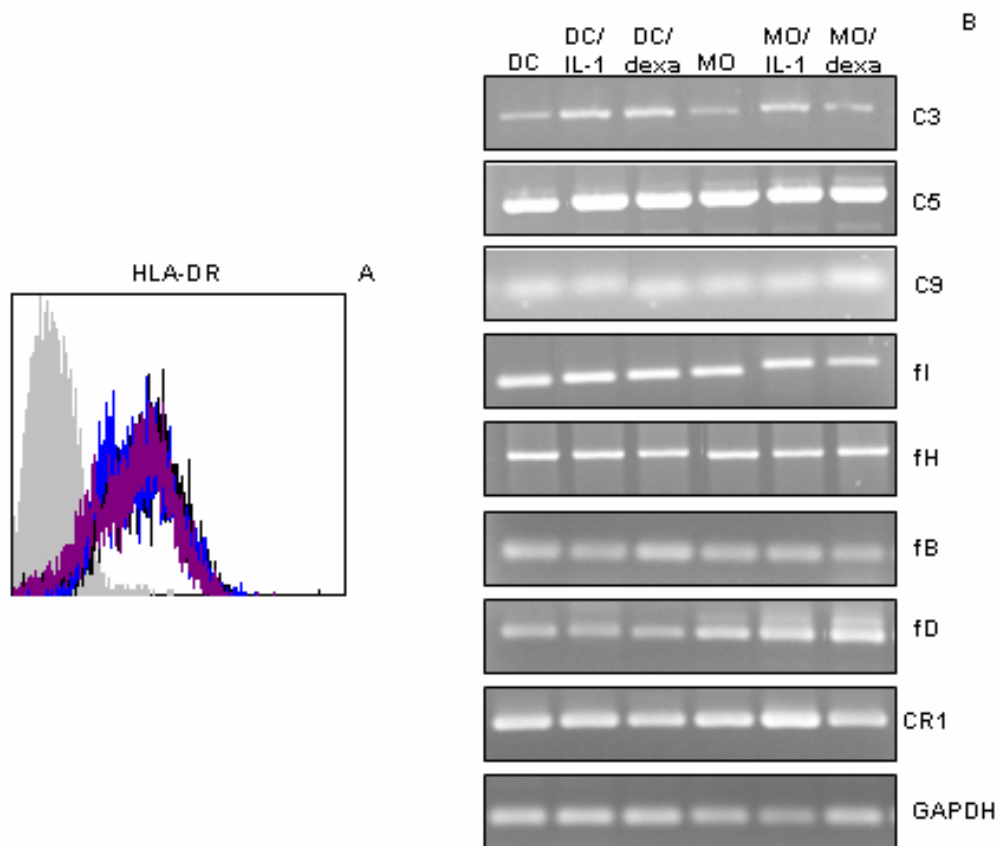
Também analisamos a expressão de RNAm de CR1 e CR2. A expressão de CR1 mostrou-se um pouco diminuída nas células ativadas com LPS. Observamos expressão de CR2 em linfócitos B transformados com o vírus Epstein-Barr (controle positivo) e uma fraca amplificação de CR2 quando utilizamos RNA de células dendríticas ativadas com LPS, porém não observamos expressão de CR2 em células dendríticas imaturas ou macrófagos. A amplificação de *GAPDH*, um gene expresso constitutivamente, foi incluída como controle positivo das reações e, como controle negativo, incluímos uma reação sem adição de cDNA (**Fig. 10**).



**Fig. 10. Expressão de RNAm de proteínas do complemento humano.** RNA extraído de células dendríticas (DC), macrófagos (MO) ou linfócitos B transformados (Ly), estimulados ou não com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h foram empregados na amplificação de fragmentos de C3, C5, C9, fi, fH, fB, fD, properdina, CR1, CR2 e GAPDH, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Quadro 2). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e comparados com um marcador de massa molecular, após coloração com brometo de etídeo. Esta figura ilustra um experimento representativo de 3 experimentos realizados.

Perguntamo-nos se esse aumento na expressão de algumas proteínas e diminuição em outras seria consequência da maturação celular ou simplesmente decorrente do estímulo específico, neste caso o LPS. Assim, estimulamos as células com IL-1 (5 ng/mL) ou dexametasona (25 ng/mL). Ambos os estímulos, utilizados nas concentrações indicadas, inibem a maturação das células dendríticas (Luft et al., 2002; Piemonti et al., 1999), porém regulam de maneira célula-específica a expressão de vários genes de proteínas do complemento (Morley e Walport, 2000). Ou seja, células dendríticas cultivadas na presença de IL-1 ou dexametasona permanecem com fenótipo de células imaturas, não ocorrendo aumento na expressão de HLA-DR, como pode ser observado na **Fig. 11A**.

O RNA total foi extraído destas células e utilizado na amplificação de RNAm das proteínas de interesse por RT-PCR. A **Fig. 11B** mostra os resultados obtidos. Observamos que tanto IL-1 como dexametasona provocaram um aumento (discreto) somente na expressão de C3 tanto em células dendríticas, quanto em macrófagos. A expressão de C5, C9, fI, fH, fB, fD e CR1 não se alterou em resposta a IL-1 ou dexametasona. Deste modo, a expressão de RNAm de proteínas do complemento por células dendríticas parece não ser regulada conforme a maturação da célula, mas sim dependente de estímulo específico. Ainda mais, a expressão de RNAm de proteínas do complemento parece ser regulada da mesma forma em células dendríticas e macrófagos, com exceção do fD que é mais expresso pelos macrófagos, quando comparados com células dendríticas (**Fig. 11B**). A amplificação de GAPDH foi incluída como controle positivo das reações e como controle negativo realizamos as mesmas reações sem adição de cDNA (**Fig. 11B**).



**Fig. 11. Expressão de RNAm de proteínas do complemento em células dendríticas e macrófagos tratados com IL-1 ou dexametasona . A.** Expressão de HLA-DR em células dendríticas imaturas (preto) e estimuladas com IL-1 (azul) ou dexametasona (roxo) por 24h. Histograma cinza- controle isotípico. **B.** RNA foi extraído de células dendríticas (DC) ou macrófagos (MO), estimulados ou não e empregados na amplificação de RNAm de proteínas do complemento. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e comparados com um marcador de massa molecular após coloração com brometo de etídeo. Esta figura ilustra um experimento representativo de 3 experimentos realizados.

### 5.1.3 Produção de proteínas do complemento

Para avaliar a produção e estrutura geral das proteínas solúveis, utilizamos os sobrenadantes das culturas em experimentos de *Western blot*. As proteínas C3, fI e fB foram encontradas nos sobrenadantes tanto das células dendríticas imaturas quanto maduras e os tamanhos das cadeias polipeptídicas correspondem ao esperado (**Fig. 12A**).

Na **Fig. 12A** observamos que o anti-fI utilizado revela preferencialmente a cadeia pesada do fI de 50 kDa. O mesmo já foi observado anteriormente em nosso laboratório e deve ser consequência da maior reatividade do anticorpo policlonal contra epítopos da cadeia pesada de fI.

No caso da produção do fB, observamos que ela é maior nas células dendríticas e macrófagos ativados com LPS, apesar de não termos notado diferença na expressão de RNAm de fB entre células dendríticas imaturas e maduras (**Figs. 10 e 12A**).

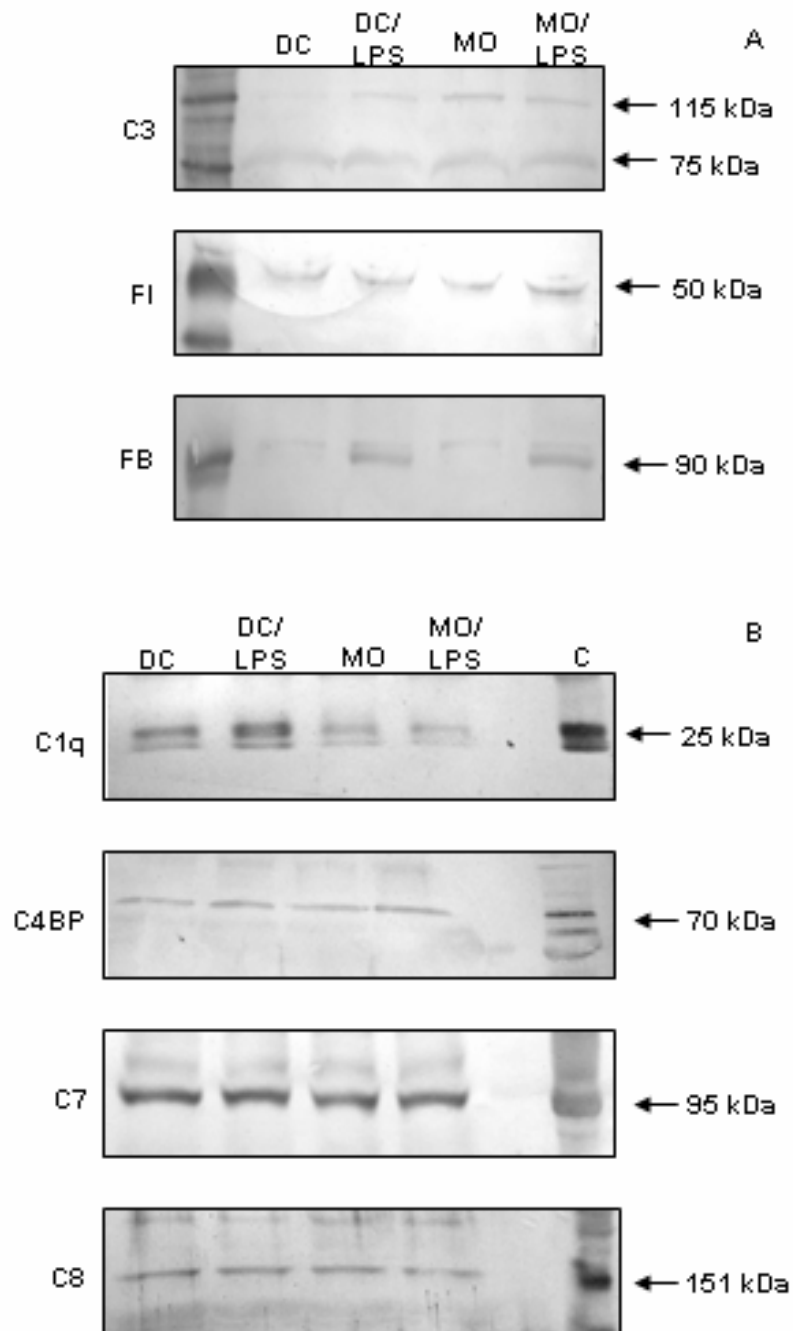
A presença de C1q, C4BP, C7 e C8 também foi analisada nos sobrenadantes das culturas, usando anticorpos específicos. Meio de cultura foi incluído como controle negativo e nenhuma banda foi visualizada (**Fig. 12B**).

O componente C1q é formado por três cadeias polipeptídicas: cadeia A (27.5 kDa), cadeia B (25.2 kDa) e cadeia C (23.8 kDa), as quais co-migram em gel de poliacrilamida (Kishore e Reid, 2000). Uma banda de aproximadamente 25 kDa, correspondente às três cadeias de C1q foi detectada nos sobrenadantes de células dendríticas e macrófagos (**Fig. 12B**).

A presença de C4BP foi observada como uma banda de 45 kDa nos sobrenadantes das culturas celulares (**Fig. 12B**). C4BP é uma proteína oligomérica e é composta de duas cadeias:  $\alpha$  (70 kDa) e  $\beta$  (45 kDa) (Dahlback e Hildebrand, 1983). Apesar de usarmos anti-C4BP policlonal, somente a cadeia  $\beta$  foi observada em nossos experimentos.

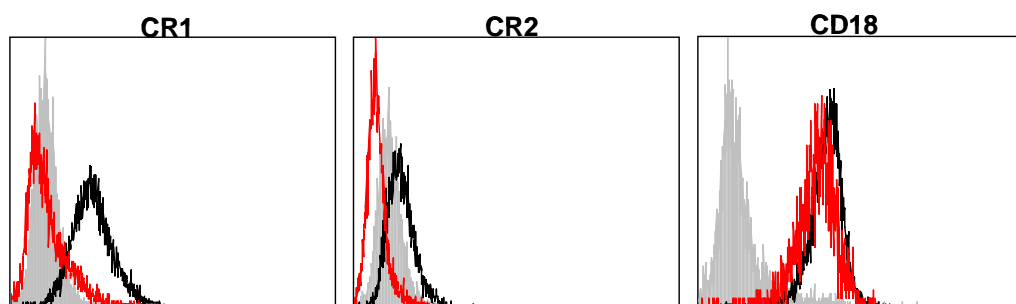
C7 é uma proteína de cadeia única de aproximadamente 95 kDa que pôde ser detectada nos sobrenadantes das culturas de células dendríticas e macrófagos (**Fig. 12B**). Também observamos uma banda de 150 kDa correspondendo ao componente C8 (**Fig. 12B**), após eletroforese em SDS-PAGE sem redução.

Nenhuma diferença significativa na produção de C1q, C4BP, C7 e C8 foi observada entre as culturas tratadas ou não com LPS (**Fig. 12B**).



**Fig. 12. Secreção de proteínas do complemento por células dendríticas humanas.** Células dendríticas (DC) e macrófagos (MO) foram diferenciados durante 7 dias e os sobrenadantes foram coletados e analisados por *Western blot*. **A.** Secreção de C3, fI e fB. **B.** Secreção de C1q, C4BP, C7 e C8. C- soro humano normal diluído foi utilizado como controle positivo. Todas as amostras, com exceção de C8, foram aplicadas em SDS-PAGE sob condições de redução. Resultados similares foram obtidos em 3 experimentos independentes, utilizando células de diferentes doadores. À direita estão representados em kDa os pesos moleculares.

A expressão dos receptores de membrana CR1, CR2 e CD18 (cadeia comum para CR3 e CR4) também foi observada, por citometria de fluxo. Na **Fig. 13** notamos que o CR1 é amplamente expresso nas células imaturas e perde sua expressão após o estímulo com LPS, concordando com os resultados obtidos por RT-PCR (**Fig. 10**). Ao contrário, o CD18 mantém a expressão, independente do estado de maturação da célula (**fig. 13**). Uma baixa expressão de RNAm de CR2 foi observada por RT-PCR somente nas células dendríticas tratadas com LPS (**Fig. 10**), porém este receptor não foi observado na membrana de células dendríticas maduras (**Fig. 13**).



**Fig. 13. Expressão de receptores de complemento na superfície de células dendríticas humanas.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de soro e citocinas por 7 dias e a expressão de CR1, CR2 e CD18 em células imaturas (preto) ou estimuladas com LPS (vermelho) foi analisada por FACS. Histograma cinza- isotipo controle. Esta figura ilustra um experimento representativo.

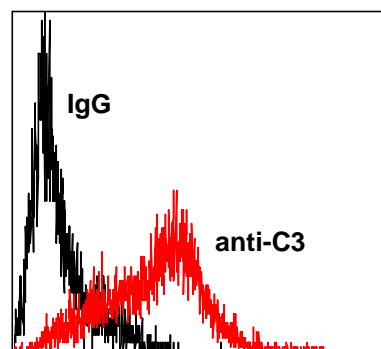
## **Parte 2. Papel do Componente C3 na Diferenciação e Maturação de Células Dendríticas Humanas**

Os resultados descritos nesta seção encontram-se publicados em:

- ES Reis, JAM Barbuto, J Köhl, L Isaac. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol. Immunol.* (2008) 45: 1952-1962.

### **5.2.1 Presença de C3 na superfície de células dendríticas**

O fato que as células dendríticas produzem várias das proteínas do complemento levou-nos a questionar se estas proteínas interagiriam com as células dendríticas e de alguma forma modulariam sua função. Assim, em primeiro lugar perguntamo-nos se o componente C3, principal proteína do sistema complemento e presente em altas concentrações no soro de indivíduos normais (0,8 a 1,9 mg/mL- Ritchie et al., 2004), poderia se ligar à superfície das células dendríticas. Deste modo, as células dendríticas foram diferenciadas normalmente, a partir de monócitos humanos, na presença de meio de cultura e citocinas. Porém, suplementamos o meio com NHS (10%- mistura de soros de 130 indivíduos normais; concentração de C3: 1,3 mg/mL), ao invés de SBF. Como demonstrado na **Fig. 14**, pudemos detectar a presença de C3 na superfície das células dendríticas diferenciadas.

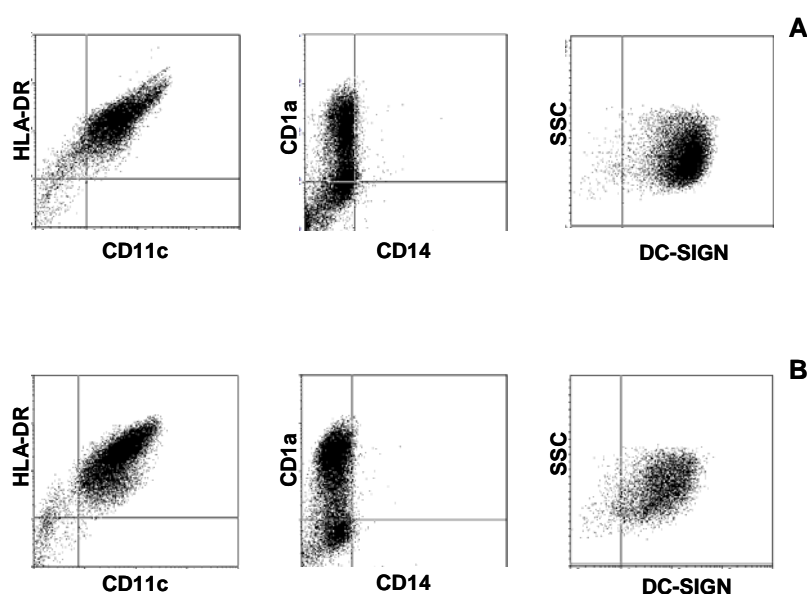


**Fig. 14. Presença de fragmentos do complemento na superfície de células dendríticas humanas.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de citocinas e 10% de soro humano normal, marcadas para C3 ou IgG controle e analisadas por FACS.



### 5.2.2 Fenótipo de células dendríticas cultivadas na presença de soro humano

Na tentativa de investigarmos o papel do complemento, mais especificamente do componente C3, na diferenciação e maturação das células dendríticas, estas foram derivadas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico na presença de GM-CSF e IL-4 e meio suplementado com NHS ou soro de paciente com deficiência total de C3 (C3DS). As células dendríticas resultantes, diferenciadas tanto na presença de NHS quanto de C3DS, também se comportaram como uma população CD11c<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>+</sup> e CD209<sup>+</sup> (**Fig. 15**). Portanto, ambos os soros permitiram que os monócitos sanguíneos se diferenciasssem em células dendríticas.

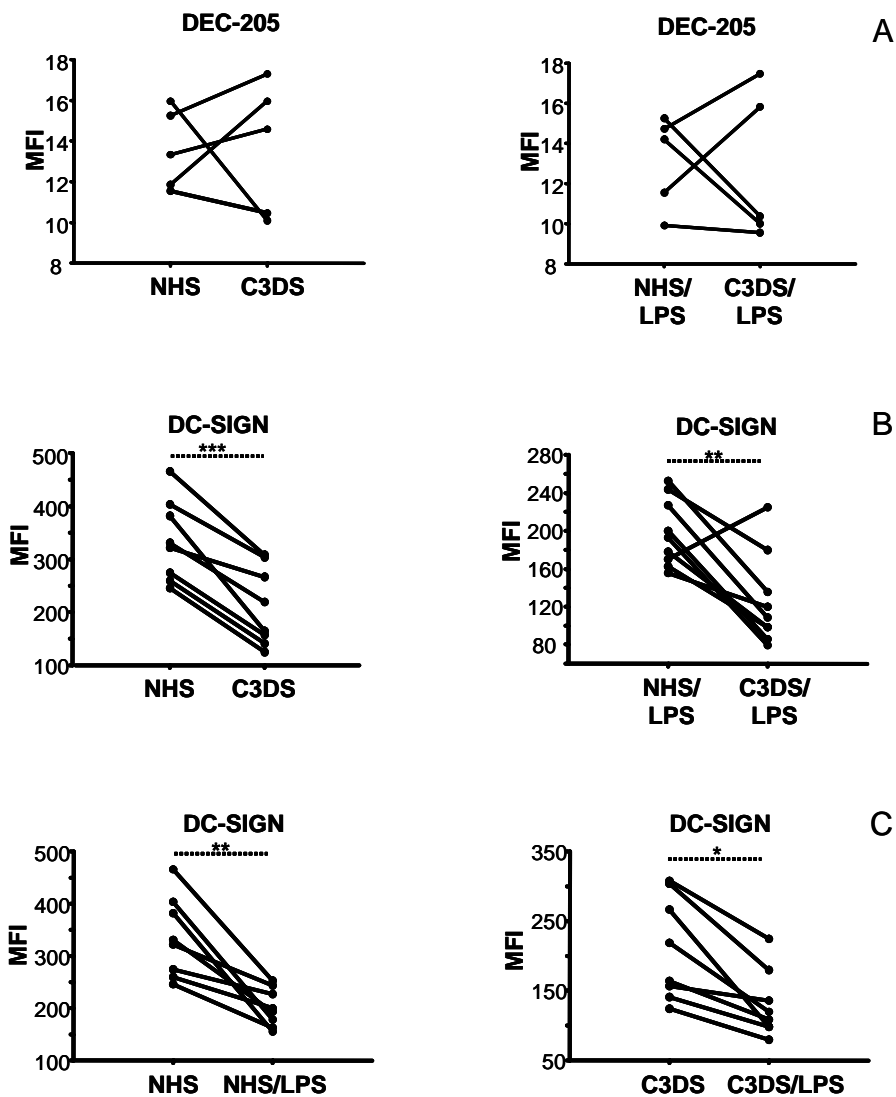


**Fig. 15. Fenótipo de células dendríticas diferenciadas na presença de soro humano.** Células dendríticas foram diferenciadas por 7 dias na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (**A**) ou soro deficiente de C3 (**B**). A expressão de moléculas de superfície foi analisada por citometria de fluxo. Resultados similares foram obtidos em diferentes experimentos usando células de diferentes doadores.

### 5.2.3 Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas interfere na expressão de DC-SIGN

DEC-205 (CD205) e DC-SIGN (CD209) são lectinas do tipo C que medeiam a captura de antígenos por células dendríticas. Nós observamos baixa expressão de DEC-205 (MFI: 11,55 – 15,96) (**Fig. 16A**) e alta expressão de DC-SIGN (MFI: 245,82 – 465,55) (**Fig. 16B**), após a diferenciação das células dendríticas tratadas com NHS. A ausência de C3 durante a diferenciação resultou em menor expressão de DC-SIGN (**Fig. 16B- painel esquerda**), porém não afetou a expressão de DEC-205 (**Fig. 16A**).

A maturação destas células, provocada pelo tratamento com LPS, não afetou a expressão de DEC-205 (dado não mostrado), porém induziu uma acentuada redução nos níveis de expressão de DC-SIGN, independente da presença de C3 (**Fig. 16B, C**). A menor expressão de DC-SIGN, observada nas células diferenciadas na ausência de C3, foi mantida mesmo após o tratamento com LPS (**Fig. 16B- painel direita**). Apesar da diferença nos níveis de expressão, não observamos diferenças na porcentagem de células positivas para DEC-205 ou DC-SIGN, entre as culturas com e sem C3 (dado não mostrado).



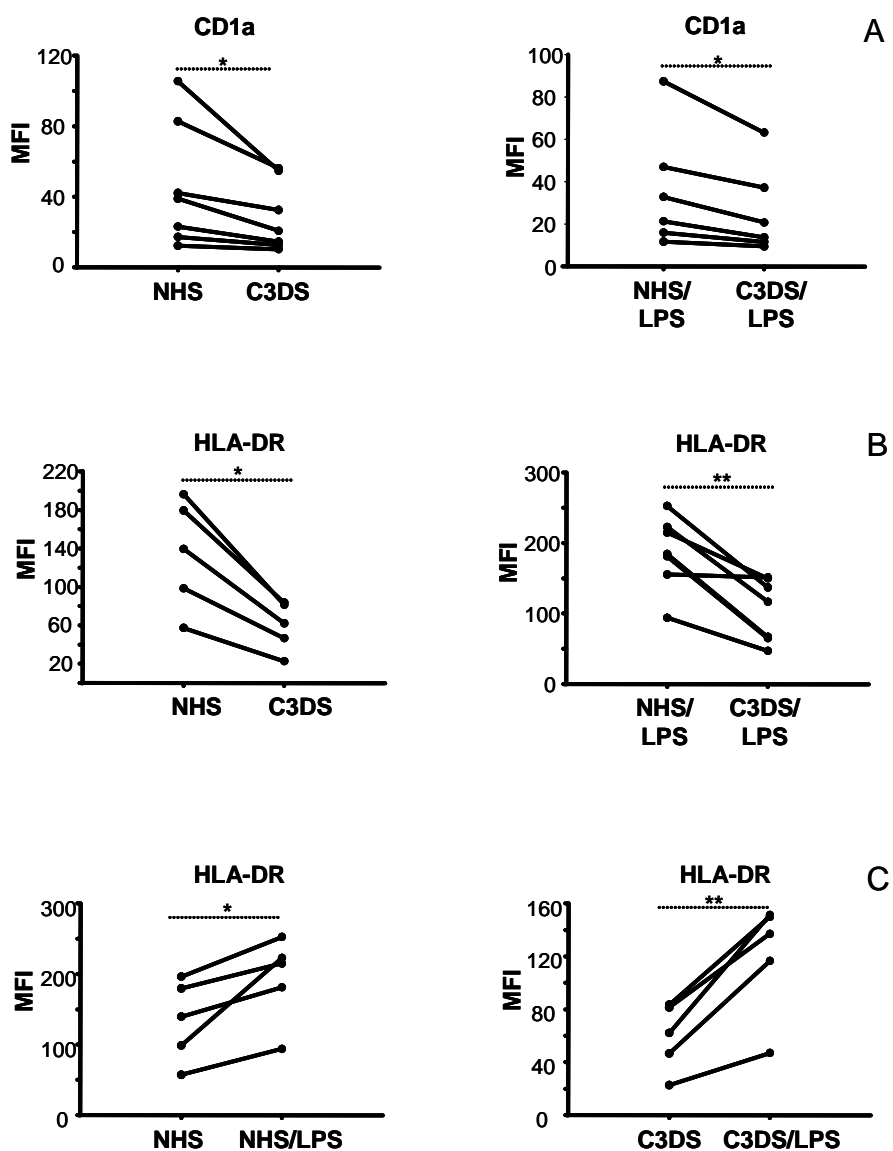
**Fig. 16. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de DC-SIGN.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS). Onde indicado, as células foram tratadas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h. Após 7 dias de cultura, a expressão de DEC-205 (A) e DC-SIGN (B, C) foi analisada por citometria de fluxo. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. Cada histograma representa uma medida individual. Histograma cheio: isotipo controle, linha preta: células tratadas com NHS, linha cinza: células tratadas com C3DS. *P* valor foi comparado usando teste *Student* pareado. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,011$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### **5.2.4 Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas interfere na expressão de CD1a e MHC-II**

Como a diferenciação de monócitos humanos em células dendríticas é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos e coestimulação (**Fig. 9B**), também perguntamo-nos se a ausência de C3 durante a diferenciação interferiria na expressão destas moléculas.

CD1a e MHC-II são moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos por células dendríticas para linfócitos T. Observamos baixa expressão de CD1a (MFI: 12,3 – 105,54) (**Fig. 17A**) e expressão moderada de HLA-DR (MFI: 57,25 – 196,32) (**Fig. 17B**) após a diferenciação de monócitos para células dendríticas imaturas, na presença de NHS. Na ausência de C3, observamos menores níveis de expressão tanto de CD1a quanto de HLA-DR (**Fig. 17A, B- painel esquerda**), sugerindo uma participação do C3 na expressão destas moléculas.

O tratamento com LPS não interferiu na expressão de CD1a (dado não mostrado), porém levou a um aumento na expressão de HLA-DR, independentemente da presença de C3 (**Fig. 17C**). Apesar do tratamento com LPS levar a um aumento de HLA-DR, mesmo na ausência de C3, os níveis de expressão de HLA-DR apresentam-se sempre menores nas células diferenciadas na ausência de C3 (**Fig. 17B- painel direita**). Estes dados sugerem que o LPS, sozinho, não é capaz de induzir o mesmo aumento na expressão de HLA-DR, obtido na presença de LPS + C3. Novamente, apesar da diferença nos níveis de expressão, não observamos diferenças na porcentagem de células positivas para CD1a ou HLA-DR, entre as culturas com e sem C3 (dados não mostrados).

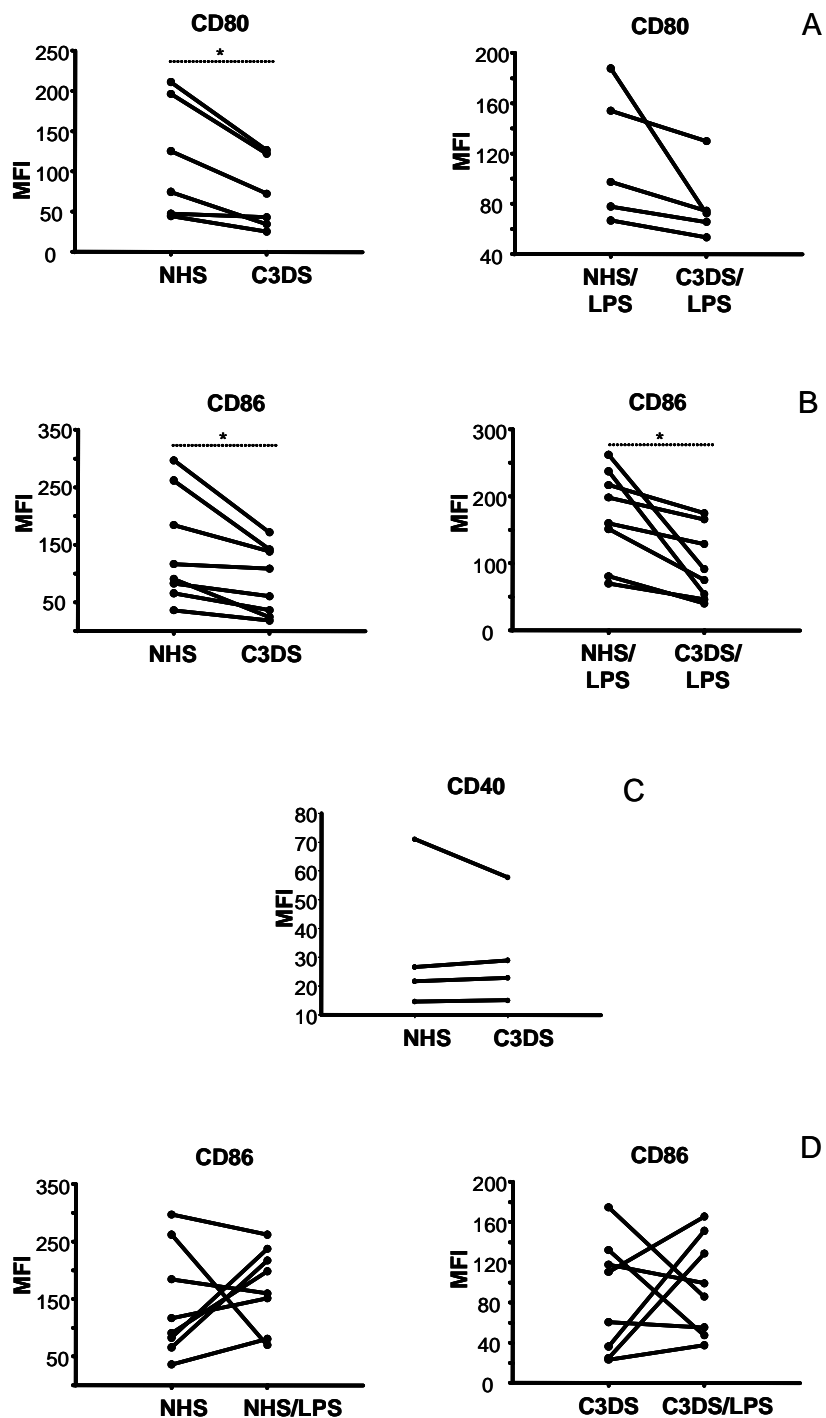


**Fig. 17. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de CD1a e HLA-DR.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS). Onde indicado, as células foram tratadas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h. Após 7 dias de cultura, a expressão de CD1a (A) e HLA-DR (B, C) foi analisada por citometria de fluxo. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. Cada histograma representa uma medida individual. Histograma cheio: isotipo controle, linha preta: células tratadas com NHS, linha cinza: células tratadas com C3DS. *P* valor foi comparado usando teste *t* Student pareado. \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,011$ .

### 5.2.5 Ausência de C3 regula a expressão de CD80 e CD86 durante a diferenciação e maturação de células dendríticas

Em seguida, pesquisamos se a ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas interferiria na expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e também CD40. A cultura das células em meio contendo NHS resultou em níveis de expressão entre baixo a moderado de CD80 (MFI: 44,51 – 210,97) (**Fig. 18A**), CD86 (MFI: 36,03 – 184,34) (**Fig. 18B**) e CD40 (MFI: 14,59 -71,05) (**Fig. 18C**), na maioria dos doadores. Interessante notar que 2 doadores apresentaram maiores níveis de expressão de CD86 (MFI: 261,8 e 296,93) (**Fig. 18B**). Quando a diferenciação foi realizada na presença de C3DS, observamos uma expressão menor ainda de CD80 e CD86 (**Fig. 18A, B- painel esquerdo**). Também notamos que a redução na expressão de CD86, na ausência de C3, foi mais pronunciada nos 2 doadores que exibiram maiores níveis desta molécula (**Fig. 18B**). Por outro lado, a ausência de C3 não interferiu na expressão de CD40 (**Fig. 18C**). Estes dados sugerem que a presença de C3 durante a diferenciação de monócitos para células dendríticas deva ser importante para a regulação dos níveis de expressão de moléculas coestimuladoras.

O tratamento com LPS resultou em aumento na expressão de CD86 nas células de 5 doadores com expressão baixa-moderada de CD86. Por outro lado, nos 2 doadores com alta expressão de CD86, foi observada uma diminuição da expressão desta molécula em resposta ao LPS (**Fig. 18D- painel da esquerda**). Mesmo após termos observado menor expressão de CD86, o estímulo com LPS na ausência de C3 levou a redução da expressão de CD86 na maioria dos doadores (em 3 de 7 doadores). O tratamento com LPS não alterou a expressão de CD80 ou CD40 (dados não mostrados), tanto na presença quanto na ausência de C3. Como descrito anteriormente para DC-SIGN e HLA-DR, a estimulação apenas com LPS não foi suficiente para resgatar a reduzida expressão de CD86 nas células diferenciadas na ausência de C3 (**Fig. 18B- painel direita**). Não observamos diferenças na porcentagem de células positivas para nenhuma das moléculas coestimuladoras, quando comparamos as culturas com e sem C3 (dados não mostrados).



**Fig. 18. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas interfere na expressão de CD80 e CD86.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS). Onde indicado, as células foram tratadas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h. Após 7 dias de cultura, a expressão de CD80 (A), CD86 (B, D) e CD40 (C) foi analisada por citometria de fluxo. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. Cada histograma representa uma medida individual. Histograma cheio: isotipo controle, linha preta: células tratadas com NHS, linha cinza: células tratadas com C3DS. *P* valor foi comparado usando teste *t Student* pareado. \*  $P < 0,05$ .

### 5.2.6 C3 não regula a expressão de CD11c e CD83

Como já mostrado na **Fig. 9B**, a diferenciação de monócitos para células dendríticas está associada com um aumento do marcador CD11c. Encontramos, nas células diferenciadas, que os níveis de expressão desta molécula variam entre moderado e alto (MFI: 39,95 – 777,37), independente da presença de C3 (**Fig. 19A**). O tratamento com LPS não interferiu na expressão deste marcador e não houve diferença na porcentagem de células positivas para CD11c, quando comparamos as células diferenciadas na presença ou ausência de C3 (dados não mostrados).

Encontramos baixa expressão do marcador de maturação CD83, independente da presença de C3 (**Fig. 19A**) ou do estímulo com LPS (dado não mostrado). Também não encontramos diferença na porcentagem de células positivas para este marcador, nas culturas com ou sem C3 (dado não mostrado).

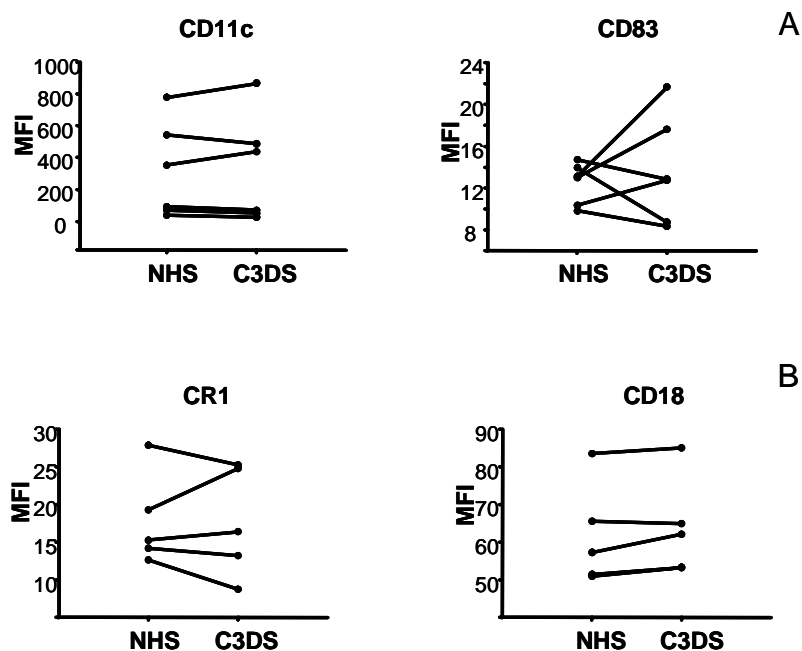
### 5.2.7 C3 não regula a expressão de receptores de complemento

Nossos dados sugerem que, durante o processo de diferenciação, o componente C3 regula a expressão de várias moléculas de superfície presente nas células dendríticas. Além disso, observamos que estas células expressam receptores para complemento (**Fig. 13**). Assim, investigamos se o C3 também poderia modular a expressão de CR1 e da cadeia CD18, presente em CR3 e CR4.

Encontramos baixa expressão de CR1 (MFI: 12,63 – 27,88) e CD18 (MFI: 50,94 – 83,54) nas células dendríticas, independentemente da presença de C3 durante a diferenciação (**Fig. 19B**). Também não observamos nenhuma diferença relacionada com a porcentagem de células positivas para estes receptores (dado não mostrado).

Resumidamente, nossos dados sugerem que o componente C3 possa ter um importante papel na regulação da expressão de moléculas de superfície durante a diferenciação das células dendríticas. Estes marcadores foram investigados pela sua importância na captura e apresentação de antígenos por tais células. Além disso, nossos dados também evidenciam que o C3 tem um papel modulador na maturação induzida por LPS, regulando a expressão de DC-SIGN, HLA-DR e CD86 nas células dendríticas diferenciadas.





**Fig. 19. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas não modula a expressão de CD11c, CD83 e de receptores do complemento.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS). Após 7 dias de cultura, a expressão de CD11c, CD83 (A) e receptores do complemento (B) foi analisada por citometria de fluxo. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. *P* valor foi comparado usando teste *t* Student pareado.

### 5.2.8 Ausência de C3, durante a diferenciação ou maturação das células dendríticas, interfere na produção de citocinas

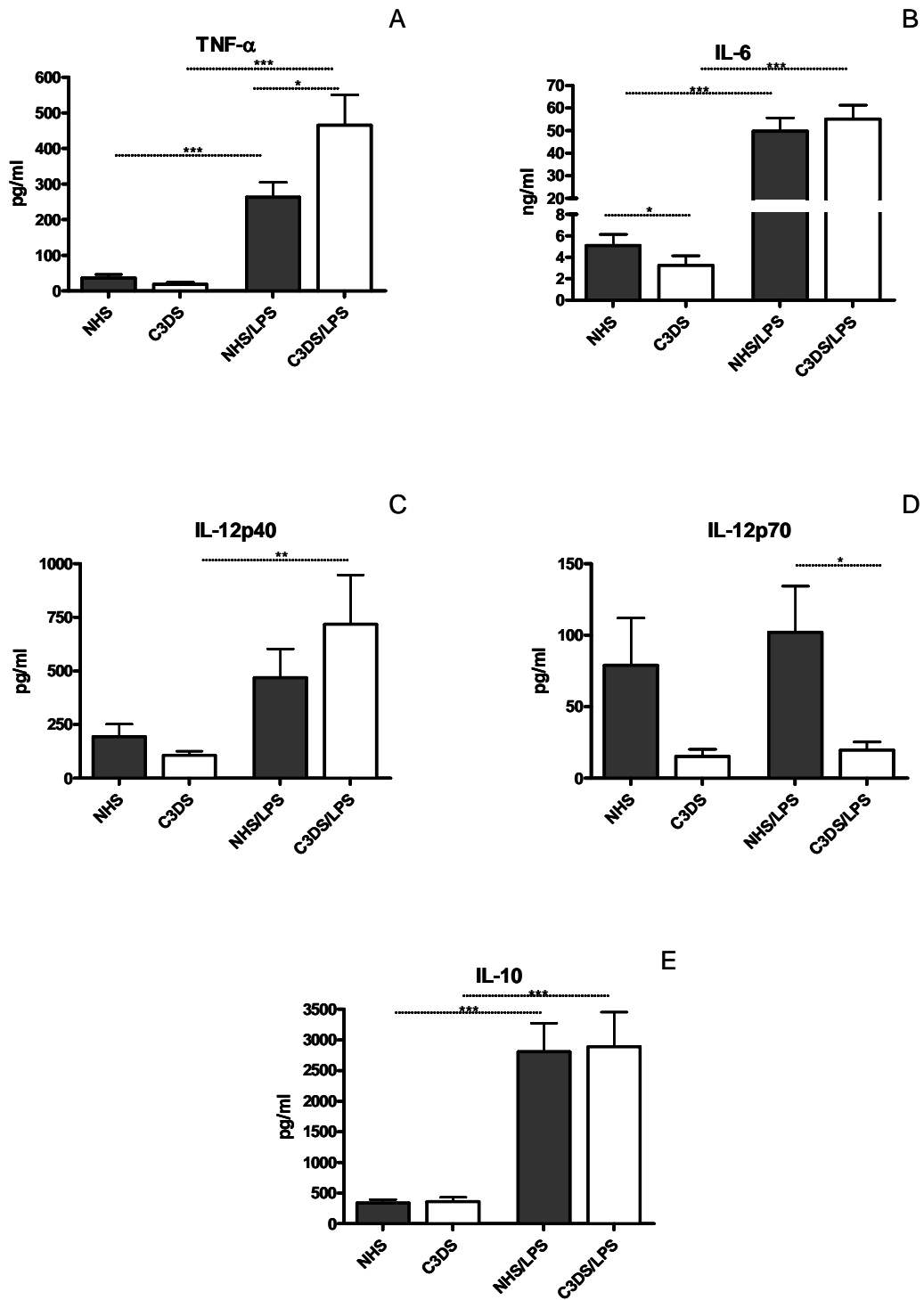
Na etapa seguinte, indagamos se o componente C3 também regularia a habilidade das células dendríticas em produzir citocinas importantes para a ativação e diferenciação de linfócitos Th, como IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Encontramos baixa produção de TNF- $\alpha$  por células imaturas, a qual foi independente da presença de C3 durante a diferenciação (Fig. 20A). Por outro lado, as células diferenciadas na presença de C3 produziram níveis consideráveis de IL-6, níveis estes reduzidos na ausência de C3 (Fig. 20B).

Além disso, também observamos que as células dendríticas imaturas produzem IL-12p40 e IL-12p70 (Fig. 20C, D). Pudemos observar uma clara tendência de menor produção de IL-12p40 e IL-12p70 pelas células diferenciadas na ausência de C3. Entretanto, devido a grandes variações entre os doadores, estes valores não atingiram

significância estatística (**Fig. 20C, D**). Também encontramos produção significativa de IL-10, independente de C3 (**Fig. 20E**).

O tratamento com LPS resultou em aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 e IL-10 (**Fig. 20A-C, E**). Por outro lado, a produção de IL-12p70 não foi afetada pela presença do LPS (**Fig. 20D**). Interessante notar que a produção de IL-12p70 encontra-se diminuída nas células dendríticas maduras que foram diferenciadas na ausência de C3 (**Fig. 20D**), sugerindo que este componente tenha um papel na indução da produção de IL-12p70 nestas células.

Diferente do que foi encontrado na produção de IL-12p70, observamos um aumento na produção de TNF- $\alpha$  pelas células maduras diferenciadas na ausência de C3 (**Fig. 20A**), sugerindo que o C3 atue como um regulador negativo na produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS. A ausência de C3 não alterou a produção de IL12p40 e IL-10 pelas células dendríticas maduras (**Fig. 20C, E**).



**Fig. 20. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas modula a produção de citocinas.** Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS). Onde indicado, as células foram tratadas com LPS (1 µg/mL). Após 7 dias de cultura, a produção de citocinas foi medida por ELISA. *P* valor foi comparado usando teste *t* Student pareado. \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,011$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### 5.2.9 Adição de C3 restaura os níveis de expressão de moléculas de superfície nas células dendríticas

Nossos dados mostram que o C3DS induz efeitos reguladores sobre o fenótipo e função das células dendríticas. Porém, sabemos que os efeitos observados podem não resultar exclusivamente da ausência do componente C3, mas também de outros fatores primários ou secundários presentes no soro do paciente, talvez desencadeados por toxinas liberadas em infecções recentes e não diagnosticadas. Sendo assim, decidimos adicionar diferentes concentrações de C3 purificado às culturas e analisar o efeito desta proteína na expressão dos marcadores de superfície. Como mostrado na **Tabela 1**, concentrações crescentes de C3 (50-150 µg/mL) aumentaram a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 de maneira dose-dependente. Também observamos um aumento na expressão de DC-SIGN após o C3DS ser reconstituído com 100 µg/mL de C3 purificado (**Tabela 2**). Por outro lado, os níveis de expressão de CD1a não foram alterados pela adição de C3 (dados não mostrados). Sendo assim, a ausência de C3 é responsável pela maioria dos efeitos reguladores negativos sobre os níveis de expressão de moléculas de superfície em células dendríticas.

**Tabela 1. Expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 (MFI) em células dendríticas humanas após adição de C3 purificado.**

C3 purificado (µg/mL)	Experimento 1			Experimento 2		
	HLA-DR	CD80	CD86	HLA-DR	CD80	CD86
0	125,21	11,04	31,06	103,66	11,14	20,35
50	171,54	21,58	34,6	11,4	29,43	35,23
100	203,51	29,69	34,6	164	33,98	50,03
150	399,54	34,6	53,28	294,27	35,55	67,32

Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e diferentes concentrações de C3 purificado. Após 7 dias de cultura, a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 foi analisada por citometria de fluxo. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. Estão mostrados 2 experimentos independentes.

**Tabela 2. Expressão de DC-SIGN em células dendríticas humanas após tratamento com C3 purificado.**

<b>DC-SIGN (MFI)</b>		
	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>
<b>NHS</b>	78,44	313,4
<b>C3DS</b>	44,11	67,93
<b>C3DS + C3 (100 µg/mL)</b>	113,42	88,96

Células dendríticas foram diferenciadas na presença de GM-CSF, IL-4 e 10% de soro humano normal (NHS) ou soro deficiente de C3 (C3DS) ou C3DS + 100 µg/mL de C3 purificado. Após 7 dias de cultura, a expressão de DC-SIGN foi analisada por citometria de fluxo. Estão mostrados 2 experimentos independentes. MFI: mediana de intensidade de fluorescência.

### **Parte 3. Papel de Receptores do Complemento na Diferenciação e Maturação de Células Dendríticas Murinas**

O manuscrito contendo os resultados descritos nesta seção encontra-se em preparação.

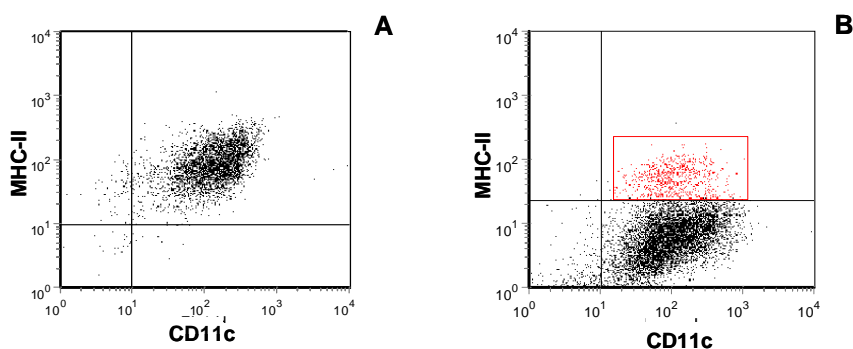
#### **5.3.1 Complemento e Células Dendríticas Murinas**

As observações descritas até o momento indicam participação do componente C3 na diferenciação e maturação das células dendríticas humanas. Utilizamos um modelo *in vitro*, onde diferenciamos as células na presença de NHS ou soro de um paciente deficiente do componente C3. Este soro, além de não conter o componente C3, conseqüentemente não possui os fragmentos derivados de sua ativação como C3a, C3b, iC3b, C5a e C5b. Assim, não podemos afirmar se os efeitos observados são resultantes de interação covalente (após hidrólise da ligação tiol-éster) entre a cadeia  $\alpha$  da molécula de C3 e as células (monócitos e/ou células dendríticas) ou da interação entre os fragmentos e seus respectivos receptores, C3aR, CR1, CR3, CR4, C5aR ou C5L2, presentes nestas células.

Sabemos que os receptores para as ATs C3a e C5a estão acoplados à proteína G e transduzem sinais de ativação/ inibição, regulando a expressão de algumas moléculas de superfície e a produção de citocinas em diversos tipos celulares. Consideramos as moléculas C3a e C5a boas candidatas como responsáveis pelos efeitos descritos anteriormente e decidimos aprofundar nossas descobertas utilizando células dendríticas de animais deficientes em C3aR, C5aR ou C5L2.

### 5.3.2 Fenótipo de células dendríticas murinas

Nos experimentos que serão discutidos a seguir, utilizamos células dendríticas residentes do baço e também células de medula óssea que foram diferenciadas na presença de GM-CSF. As células dendríticas esplênicas foram isoladas após seleção positiva das células CD11c<sup>+</sup>. Em ambos os casos centramos nossa atenção no estudo na população duplo-positiva para CD11c e MHC-II (**Fig. 21**).



**Fig. 21. Fenótipo de células dendríticas murinas.** Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>) (A) e células dendríticas diferenciadas a partir de precursores de medula óssea por 7 dias na presença de GM-CSF (B). *Gate* em vermelho representa as células duplo positivas para MHC-II e CD11c.

### 5.3.3 Sinalização pelos ATRs regula a expressão de MHC-II em APCs

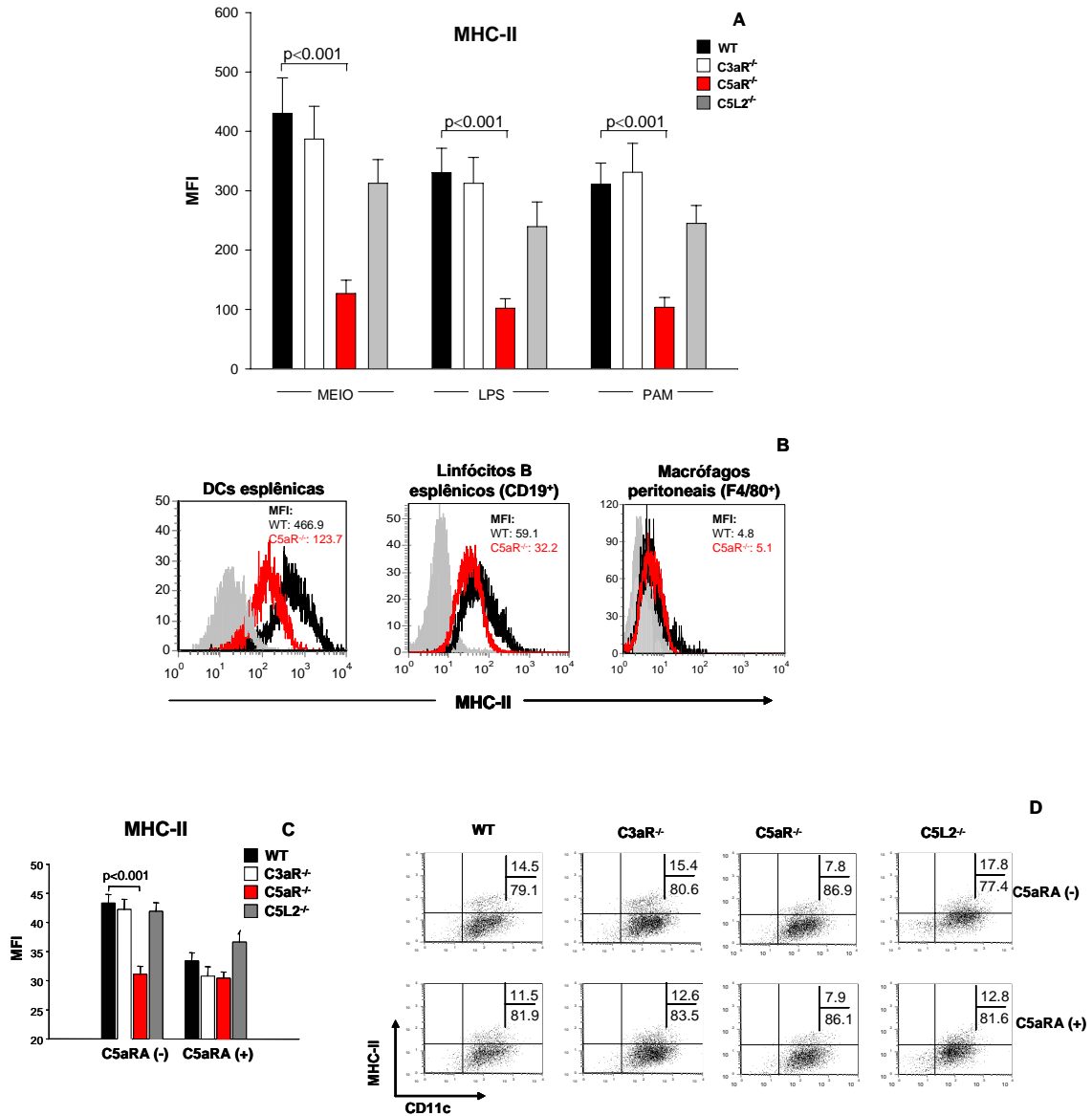
Células dendríticas esplênicas expressam níveis consideráveis de MHC-II e o estímulo com ligantes de TLRs 2 e 4 não aumentam a expressão de MHC-II nestas células. Determinamos a expressão de MHC-II nestas células dendríticas esplênicas residentes, provenientes tanto de animais WT como de animais deficientes para C3aR (C3aR<sup>-/-</sup>), C5aR (C5aR<sup>-/-</sup>) e C5L2 (C5L2<sup>-/-</sup>), antes e após o estímulo com LPS (ativa TLR4) ou Pam3Cys (ativa TLR2). Observamos que células dendríticas de animais C5aR<sup>-/-</sup> apresentam uma expressão de MHC-II reduzida em 70-75% (**Fig. 22A**), quando comparada com as células de animais WT, C3aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup>. Esta expressão reduzida de MHC-II nas células C5aR<sup>-/-</sup> ocorre em células estimuladas ou não com ligantes de TLR2 e TLR4 (**Fig. 22A**).

O fato de as células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> apresentarem menor expressão de MHC-II gerou a questão se este impacto negativo poderia ocorrer em outras células que igualmente expressam MHC-II. Assim, determinamos a expressão desta molécula nas

demais APCs, linfócitos B e macrófagos e, de fato, a expressão de MHC-II também se mostrou reduzida em linfócitos B esplênicos, mas não em macrófagos peritoneais residentes (**Fig. 22B**). Também observamos que estes efeitos não eram exclusivos da linhagem Balb/c, pois encontramos resultados equivalentes em animais da linhagem C57BL/6 (não mostrado).

Comprovamos estas observações em células dendríticas derivadas de precursores de medula óssea. Diferenciamos células de medula óssea dos diferentes animais na presença de GM-CSF e, após 7 dias de cultura, analisamos a expressão de MHC-II nas células CD11c<sup>+</sup>. Observamos menor expressão da molécula MHC-II (**Fig. 22C**) e também menor porcentagem de células MHC-II<sup>+</sup> nas culturas C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 22D**). Outro fato interessante foi que a utilização de um antagonista para C5aR (C5aRA) durante o período de diferenciação também resultou em níveis reduzidos de expressão de MHC-II (**Fig. 22C**) e menor porcentagem de células MHC-II<sup>+</sup> nas culturas WT, C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 22D**).





**Fig. 22. Células apresentadoras de animais C5aR<sup>-/-</sup> possuem menor expressão de MHC-II.** **A.** Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>) foram isoladas e cultivadas por 24h na presença ou ausência de LPS ou Pam3Cys (PAM) e a expressão de MHC-II foi analisada por citometria de fluxo. **B.** Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>), linfócitos B esplênicos e macrófagos peritoneais foram isolados e a expressão de MHC-II foi analisada por citometria de fluxo. **C e D.** Células dendríticas foram diferenciadas a partir de precursores de medula óssea por 7 dias na presença de GM-CSF e C5aRA onde indicado e a expressão de MHC-II foi analisada por citometria de fluxo. MFI-mediana de intensidade de fluorescência, C5aRA- antagonista do C5aR. Dados representam média ± SE de 6-8 experimentos independentes. Significância entre os grupos foi analisada por teste ANOVA.

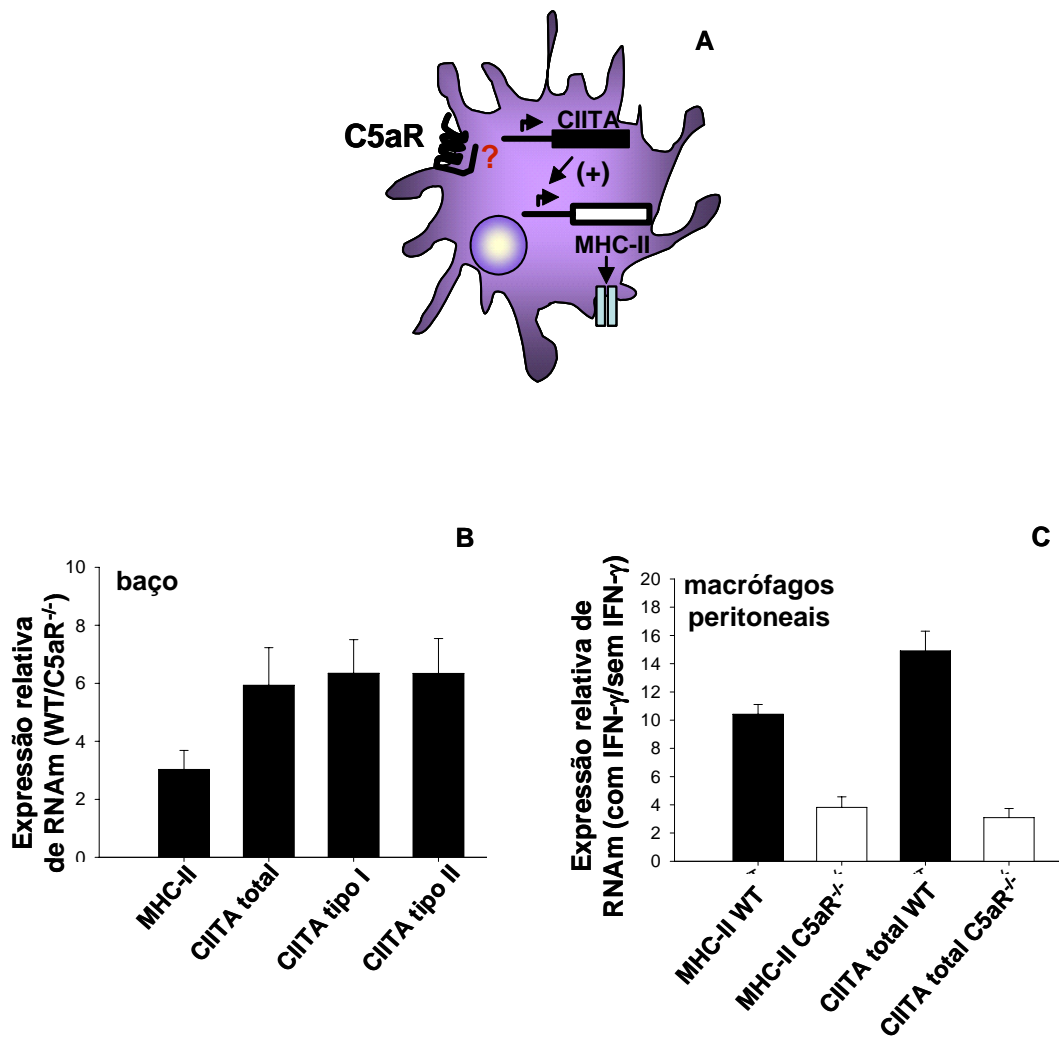
### 5.3.4 Sinalização pelo C5aR regula a expressão de MHC-II em APCs por um mecanismo dependente do transativador de MHC-II (CIITA)

A expressão do gene *MHC-II* é controlada principalmente em nível transcricional, pelo CIITA. Esta molécula é um co-ativador que não se liga diretamente ao DNA e é específico no controle da transcrição do gene *MHC-II*. Em camundongos, a transcrição do RNAm de CIITA é regulada por uma grande região promotora, que controla, de maneira célula-específica, a transcrição do CIITA tipo I (macrófagos e células dendríticas), CIITA tipo III (linfócito B) e CIITA tipo IV (induzido por IFN- $\gamma$ ) (Reith et al., 2005) (**Fig. 23A**).

Nós quantificamos por PCR em tempo real a expressão de RNAm de MHC-II nas células dendríticas esplênicas dos animais WT e C5aR<sup>-/-</sup>. Esta expressão mostrou-se 3 vezes maior nas células de animais WT, quando comparados com C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 23B**). Mais interessante, a expressão de RNAm de CIITA total apresentou-se 6 vezes maior nas células WT, quando comparadas com as células C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 23B**). O uso de oligonucleotídeos específicos para os tipos I e III também revelou menores níveis de expressão (6 vezes) destes tipos de CIITA nas células C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 23B**). Deste modo, estes resultados sugerem que a sinalização pelo C5aR afeta a expressão de MHC-II regulando a transcrição dos diferentes tipos de CIITA.

Nossos dados de citometria de fluxo mostraram que a sinalização via C5aR não interfere na expressão de MHC-II em macrófagos peritoneais (**Fig. 22B**). Entretanto, é sabido que a expressão de MHC-II e CIITA em macrófagos é regulada positivamente por IFN- $\gamma$  (Pai et al., 2002). Em acordo com dados já publicados (Pai et al., 2002), encontramos um aumento na expressão de MHC-II (10 vezes) e de CIITA total (14 vezes) em resposta ao IFN- $\gamma$ , em macrófagos peritoneais de animais WT (**Fig. 23C**). Por outro lado, a indução da expressão gênica de MHC-II e CIITA por IFN- $\gamma$  mostrou-se substancialmente prejudicada em macrófagos de animais C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 23C**).

Assim, nossos dados sugerem que a sinalização pelo C5aR regula a expressão de MHC-II em células dendríticas e linfócitos B através da regulação da transcrição de CIITA. Além disso, também regula em macrófagos, a indução da expressão de MHC-II e CIITA, dependente de IFN- $\gamma$ .



**Fig. 23. Sinalização pelo C5aR regula positivamente a expressão de MHC-II em células apresentadoras de antígenos. A.** Esquema representativo da indução da expressão de CIITA e MHC-II, dependente de C5aR. **B.** Expressão relativa de RNAm de MHC-II e CIITA em células esplências de animais WT e C5aR<sup>-/-</sup>. **C.** Expressão relativa de RNAm de MHC-II e CIITA em macrófagos peritoneais, estimulados ou não com IFN-γ, retirados de animais WT e C5aR<sup>-/-</sup>. Dados representam média ± SE de 3 experimentos independentes.

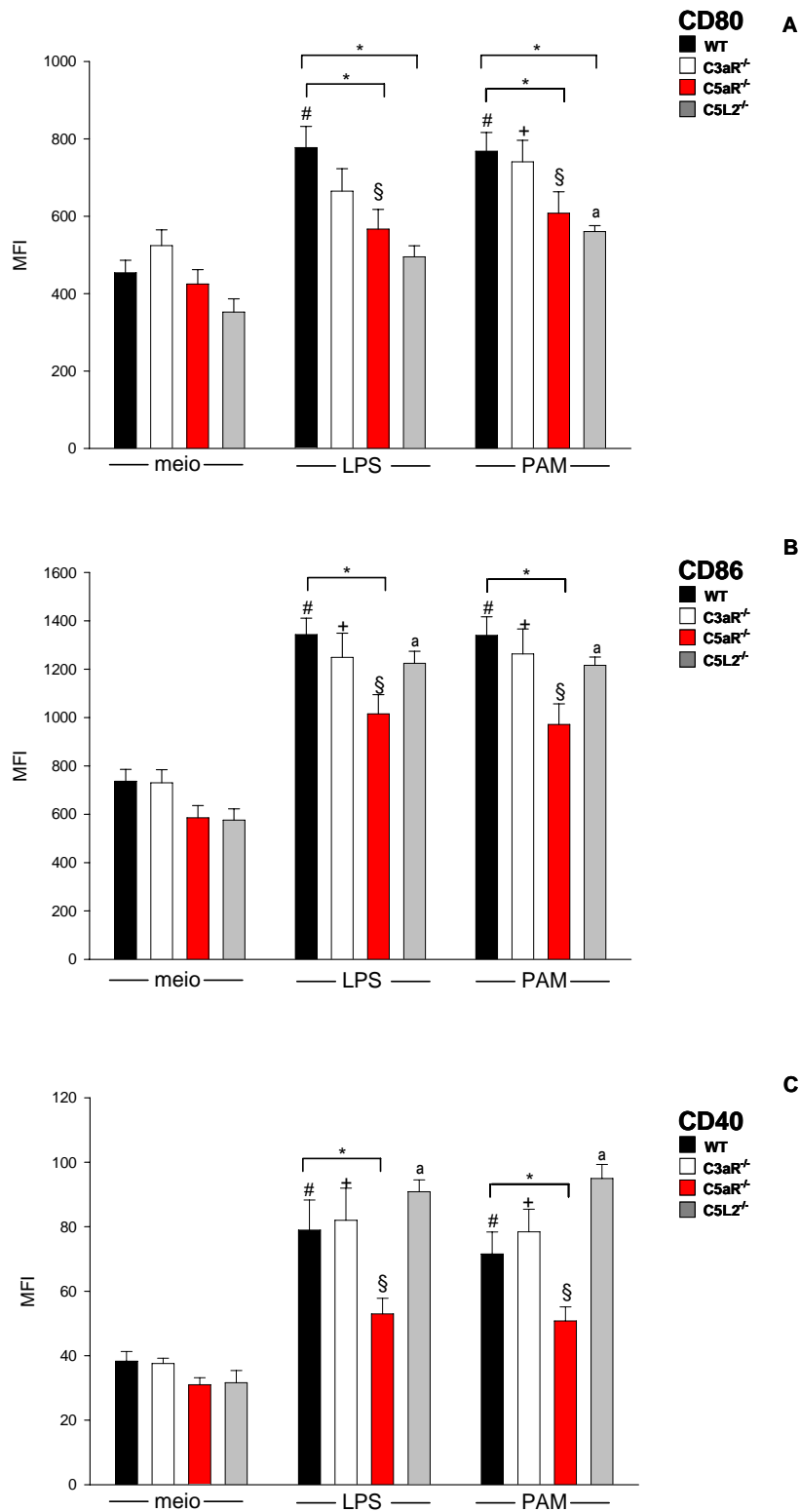
### 5.3.5 Sinalização pelos ATRs regula a expressão de moléculas coestimuladoras

Células dendríticas imaturas expressam baixos níveis de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40. O estímulo com ligantes de TLR induz a maturação destas células, o que está associado ao aumento dos níveis de expressão de moléculas coestimuladoras (Cella et al., 1997). Baseado em estudos prévios indicando que a ligação de ATRs modula a resposta induzida por TLR-4 em macrófagos (Hawlishch et al., 2005), perguntamo-nos se tal sinalização (ATR/TLR) também teria impacto na maturação de células dendríticas induzida por TLR.

Assim, determinamos a expressão de CD80, CD86 e CD40 em células dendríticas esplênicas de animais WT e ATR<sup>-/-</sup>, ativadas ou não com LPS ou Pam3Cys. Encontramos uma expressão relativamente alta de CD80 e CD86 e baixa expressão de CD40 em células dendríticas não estimuladas e não foi observada qualquer diferença de expressão destes marcadores nas células dendríticas não tratadas dos diferentes animais (WT, C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup>) (**Fig. 24**). A estimulação das células com LPS ou Pam3Cys aumentou a expressão destas moléculas coestimuladoras (**Fig. 24**), porém, após a ativação dos TLR, as células C5aR<sup>-/-</sup> apresentam menor expressão de CD80, CD86 e CD40 e as células C5L2<sup>-/-</sup> menor expressão de CD80, quando comparadas com as células WT igualmente ativadas (**Fig. 24**).

Não observamos qualquer diferença quanto à porcentagem de células positivas para os marcadores em questão, quando comparamos as células WT e as células ATR<sup>-/-</sup> (não mostrado).

Estes dados sugerem que C5aR e em menor grau C5L2 participem da regulação da expressão de moléculas coestimuladoras em resposta à ligação dos TLRs.



**Fig. 24. Menor expressão de moléculas coestimuladoras em células dendríticas de animais C5aR<sup>-/-</sup>.** Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>) foram isoladas e cultivadas por 24h na presença ou ausência de LPS ou Pam3Cys (PAM) e a expressão de CD80 (A), CD86 (B) e CD40 (C) foi analisada por citometria de fluxo. MFI- mediana de intensidade de fluorescência. \* P valor < 0.05. Os símbolos #, +, a, § indicam significância entre determinado grupo de células ATR<sup>-/-</sup> estimuladas com ligantes de TLR e respectivo grupo controle WT não estimulado. Dados representam média ± SE de 6-8 experimentos independentes. Significância entre os grupos foi analisada pelo teste ANOVA.

### 5.3.6 Sinalização por ATRs regula a produção de citocinas induzida por TLRs 2 e 4

#### 5.3.6.1 Produção de IL-12 por células dendríticas WT e ATR<sup>-/-</sup>

Observamos que células dendríticas esplênicas imaturas secretam IL-12p40 (**Fig. 25A**), porém não detectamos produção de IL-12p70 por tais células (não mostrado). A presença de Pam3Cys na cultura aumentou significativamente a produção de IL-12p40 pelas células WT, C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup>, porém as células C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> tiveram menor secreção de IL-12p40 induzida por TLR2, quando comparadas com os animais WT e C5L2<sup>-/-</sup> (**Fig. 25A**).

O papel da IL-10 na regulação de IL-12 é bem conhecido. Assim, determinamos a produção de IL-12 (dependente de TLR2), na presença de um anticorpo que neutraliza o IL-10R (anti-IL-10R). O bloqueio deste receptor restaurou a produção de IL-12p40 e IL-12p70 nas células C3aR<sup>-/-</sup>, mas não nas células C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25B, C**), sugerindo que a menor produção de IL-12 pelas células C3aR<sup>-/-</sup>, mas não C5aR<sup>-/-</sup>, seja dependente de IL-10.

Também sabemos que a ativação do CD40, durante as interações entre células dendríticas e linfócitos T, atua de maneira positiva na indução da produção de IL-12 pelas células dendríticas. Como esperado, a ativação do CD40 (utilizando anti-CD40) nas células dendríticas esplênicas em sinergia com TLR2, causou um aumento na produção de IL-12p40 e IL-12p70 nas células WT (**Fig. 25B, C**). Por outro lado, notamos que a produção destas proteínas estava reduzida nas células C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25B, C**), sugerindo que a ausência de ATRs não só suprime a produção de IL-12 induzida por TLR2, como também modula a amplificação desta produção de IL-12 mediada pela ligação do CD40.

A estimulação conjunta de TLR2 e CD40 na presença de IL-10R, resultou em aumento significativo na produção de IL-12p40 e IL-12p70 nas células WT e C3aR<sup>-/-</sup>, quando comparadas com células dendríticas estimuladas somente com Pam3Cys e anti-CD40 ou as células onde o IL-10R foi bloqueado (**Fig. 25B, C**). Em contraste, o tratamento Pam3Cys/anti-CD40/anti-IL-10R nas células C5aR<sup>-/-</sup> resultou em menor produção das proteínas p40 e p70, quando comparada com as células WT (**Fig. 25B, C**). Estes dados confirmam a dependência de C3aR, mas não de C5aR, na regulação da produção de IL-12 por IL-10 e Pam3Cys.

### 5.3.6.2 Produção de IL-10 por células dendríticas WT e ATR<sup>-/-</sup>

Como demonstrado anteriormente, C3aR interfere na secreção de IL-12 de maneira IL-10 dependente. Assim, perguntamo-nos sobre o papel dos ATRs na produção da própria IL-10. Não observamos secreção desta citocina por células não estimuladas, contudo a presença de Pam3Cys causou um aumento semelhante na produção de IL-10 pelas células WT, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> (**Fig. 25D**). Por outro lado, a produção de IL-10 foi significativamente maior nas células C3aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25D**), sugerindo que a sinalização pelo C3aR regula negativamente a produção de IL-10 induzida por TLRs.

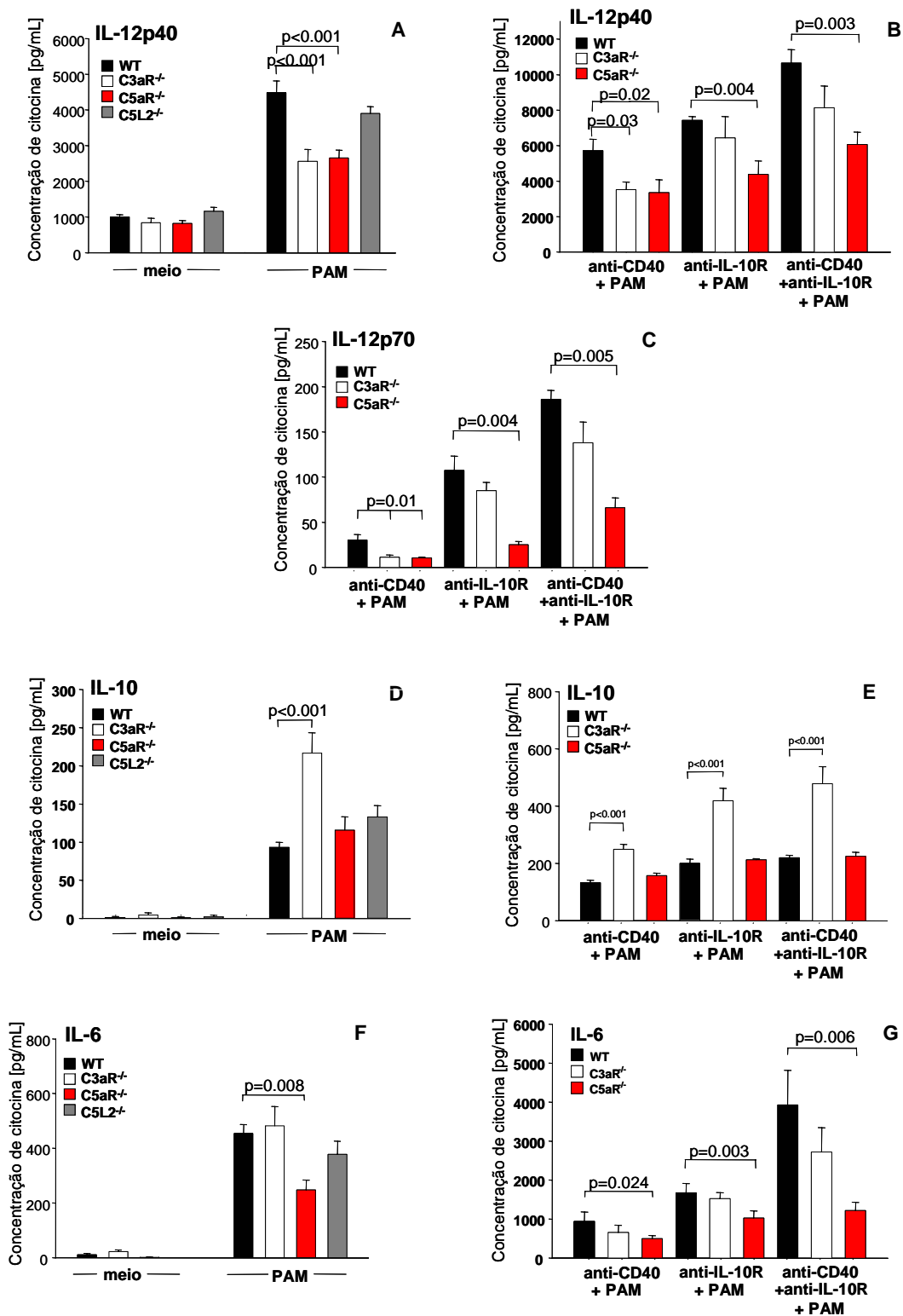
Maior secreção de IL-10 por células C3aR<sup>-/-</sup> também foi observada após estímulo de TLR2 juntamente com CD40 e a inibição do IL-10R causou maior aumento na produção desta citocina pelas células C3aR<sup>-/-</sup>, quando comparadas com as células WT e C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25E**).

### 5.3.6.3 Produção de IL-6 por células dendríticas WT e ATR<sup>-/-</sup>

Em acordo com dados previamente publicados (Dillon et al., 2004), observamos um aumento na produção de IL-6 por células dendríticas, após a ligação de TLR2 (**Fig. 25F**). Esta produção mostrou-se diminuída na células C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25F**).

Semelhantemente aos achados anteriores, o tratamento combinado das células dendríticas com Pam3Cys e anti-CD40 levou a um aumento na produção de IL-6 (**Fig. 25G**). O estímulo de TLR2 juntamente com a inibição do IL-10R ou a combinação Pam3Cys/anti-CD40/anti-IL-10R também induziram um aumento na produção de IL-6 nas células WT e C3aR<sup>-/-</sup>, porém as células C5aR<sup>-/-</sup> novamente mostram uma produção diminuída desta citocina (**Fig. 25G**).

De maneira geral, nossos dados sugerem que a sinalização via C3aR e C5aR juntamente com TLR2, em células dendríticas, regula positivamente a produção de IL-12. A sinalização via C5aR/TLR2 também regula positivamente a produção de IL-6 e a sinalização via C3aR/TLR2 regula negativamente a produção de IL-10.



**Fig. 25. Produção de citocinas por células dendríticas de animais WT e ATR<sup>-/-</sup>.** Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>) foram isoladas e cultivadas por 24h na presença ou ausência de Pam3Cys (PAM) e a produção de IL-12p40 (A, B), IL-12p70 (C), IL-10 (D, E) e IL-6 (F, G) foi avaliada por ELISA. Onde indicado, as células também foram tratadas com anti-CD40 e ou anti-IL-10R. Dados representam média ± SE de 4 experimentos independentes. Significância entre os grupos foi analisada por teste ANOVA.

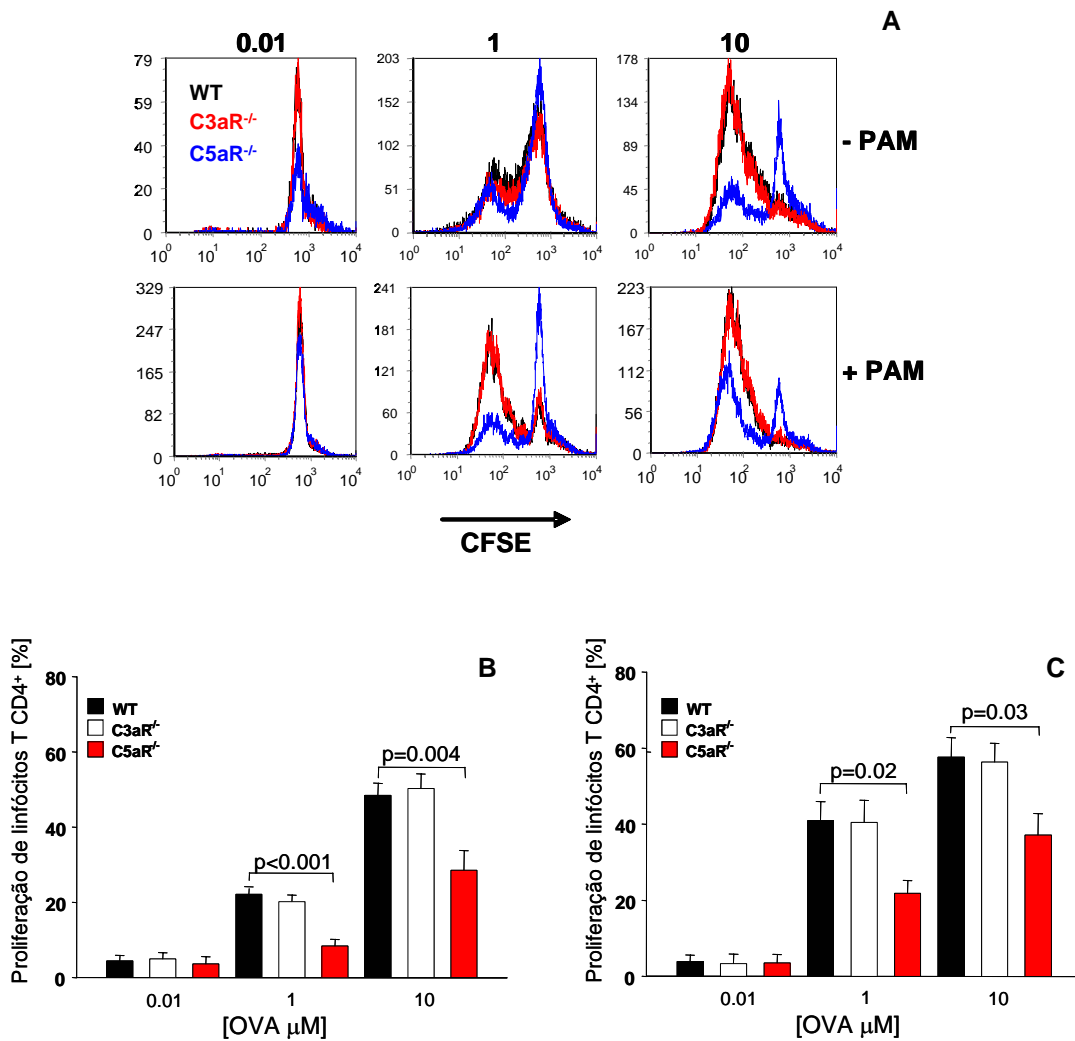


### 5.3.7 A sinalização pelos ATRs nas células dendríticas modula a proliferação de linfócitos CD4<sup>+</sup>

Sabemos que a apresentação de peptídeos por MHC-II e a coestimulação por moléculas da família B7 (CD80 e CD86) são fatores críticos pelos quais as células dendríticas modulam a indução de proliferação e polarização de linfócitos CD4<sup>+</sup> (Reis e Sousa, 2006). Deste modo, passamos a investigar a habilidade das células dendríticas deficientes de ATRs na indução da proliferação de linfócitos CD4<sup>+</sup> isolados de animais DO11.10RAG2<sup>-/-</sup>, transgênicos para o TCR que reconhece, quase exclusivamente, o peptídeo OVA<sub>323-339</sub> associado a MHC-II tipo I-A<sup>d</sup>. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* destes animais foram marcados com CFSE e incubados com células dendríticas WT, C3aR<sup>-/-</sup> ou C5aR<sup>-/-</sup> em diferentes concentrações de OVA, na presença ou ausência de Pam3Cys por 4 dias.

Observamos que o tratamento com crescentes concentrações de OVA resultou em aumento na frequência de células CD4<sup>+</sup>, incubadas com células dendríticas WT ou C3aR<sup>-/-</sup>, tanto na presença quanto ausência de Pam3Cys (**Fig. 26**). Por outro lado, também pode ser observado na **Fig. 26** que as células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> possuem menor capacidade para induzir a proliferação destes linfócitos CD4<sup>+</sup>.

A presença de Pam3Cys aumentou a proliferação de linfócitos T, independente da fonte de células dendríticas (WT, C3aR<sup>-/-</sup> ou C5aR<sup>-/-</sup>). Porém, as células C5aR<sup>-/-</sup> continuaram a induzir menor proliferação, quando comparadas com as células WT e C3aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 26B, C**). Estes dados sugerem que a ausência de C5aR nas células dendríticas regula negativamente a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, provavelmente por regular negativamente a expressão de MHC-II e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86.



**Fig. 26. Células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> têm menor habilidade de promover a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.** Análise de citometria de fluxo (*gate* analisado: células TCR DO11.10<sup>+</sup>) mostrando proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos (marcados com CFSE) de animais DO11.10RAG2<sup>-/-</sup>, em resposta a estimulação com células dendríticas (WT, C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup>), diferentes concentrações de OVA e Pam3Cys (100ng/mL). **A.** Histogramas representativos de um experimento. **B.** Linfócitos T cultivados por 4 dias na presença de células dendríticas e OVA. **C.** Linfócitos T cultivados por 4 dias na presença de células dendríticas, OVA e Pam3Cys (100ng/mL). Dados representam média ± SE de 5 experimentos independentes. Significância entre os grupos foi analisada por teste ANOVA.

### 5.3.8 A sinalização pelos ATRs nas células dendríticas modula a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

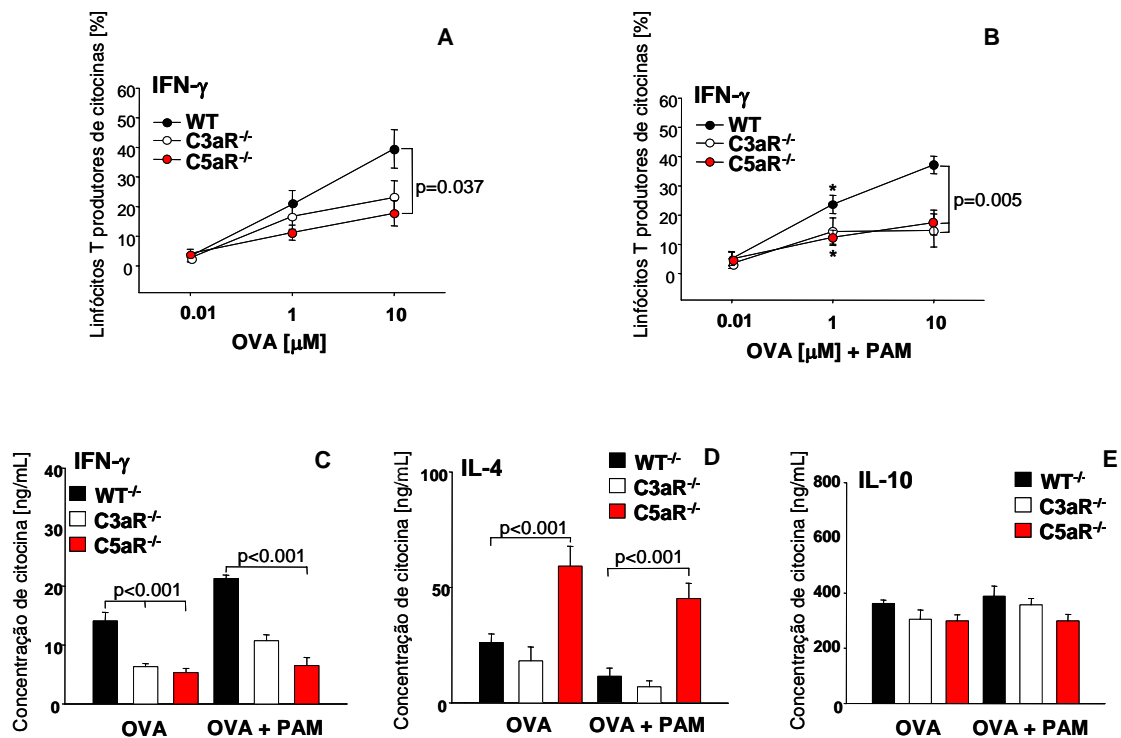
Nosso próximo passo foi determinar o impacto da sinalização pelos ATRs na produção de citocinas tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em resposta a OVA e Pam3Cys.

Em primeiro lugar, quando células dendríticas de animais WT foram utilizadas como indutoras da proliferação, independente do tratamento com Pam3Cys, notamos que maiores concentrações de OVA estavam correlacionadas com maior porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ . Esta tendência não foi notada na presença de células dendríticas de animais C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 27A, B**), de modo que observamos menor porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  na presença de células dendríticas C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 27A, B**).

Além de medir a porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$ , também dosamos a concentração desta citocina no sobrenadante das co-culturas. A **Fig. 27C** mostra maior produção de IFN- $\gamma$  nas co-culturas, onde os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram incubados com células dendríticas WT. Também notamos um aumento na produção de IFN- $\gamma$  nas culturas onde as células dendríticas WT foram estimuladas com Pam3Cys (**Fig. 27C**), o que não ocorre nas culturas onde as células dendríticas ATR<sup>-/-</sup> estão atuando como indutoras da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Ao contrário da produção de IFN- $\gamma$ , a produção de IL-4 mostrou-se aumentada nas co-culturas onde células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> estavam presentes. A presença de Pam3Cys levou a um modesto decréscimo na produção desta citocina, independente das células dendríticas estimuladoras (**Fig. 27D**). Não observamos nenhuma diferença quanto à produção de IL-10 nas diferentes co-culturas (**Fig. 27E**).

De maneira geral, nossos dados sugerem uma participação dos ATRs na diferenciação Th1/Th2 de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



**Fig. 27. Células dendríticas ATR<sup>-/-</sup> têm menor habilidade de promover a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN-γ.** Análise de citometria de fluxo (*gate* analisado: células TCR DO11.10<sup>+</sup>) e ELISA mostrando produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos, em resposta a estimulação com células dendríticas (WT, C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup>) e diferentes concentrações de OVA e Pam3Cys (PAM-100 ng/mL). **A.** Porcentagem de células produtoras de IFN-γ- citometria de fluxo. **B.** Como em A., porém na presença de PAM. **C-E.** Detecção da produção de citocinas por ELISA. Dados representam média ± SE de 5 experimentos independentes. Significância entre os grupos foi analisada por teste ANOVA.

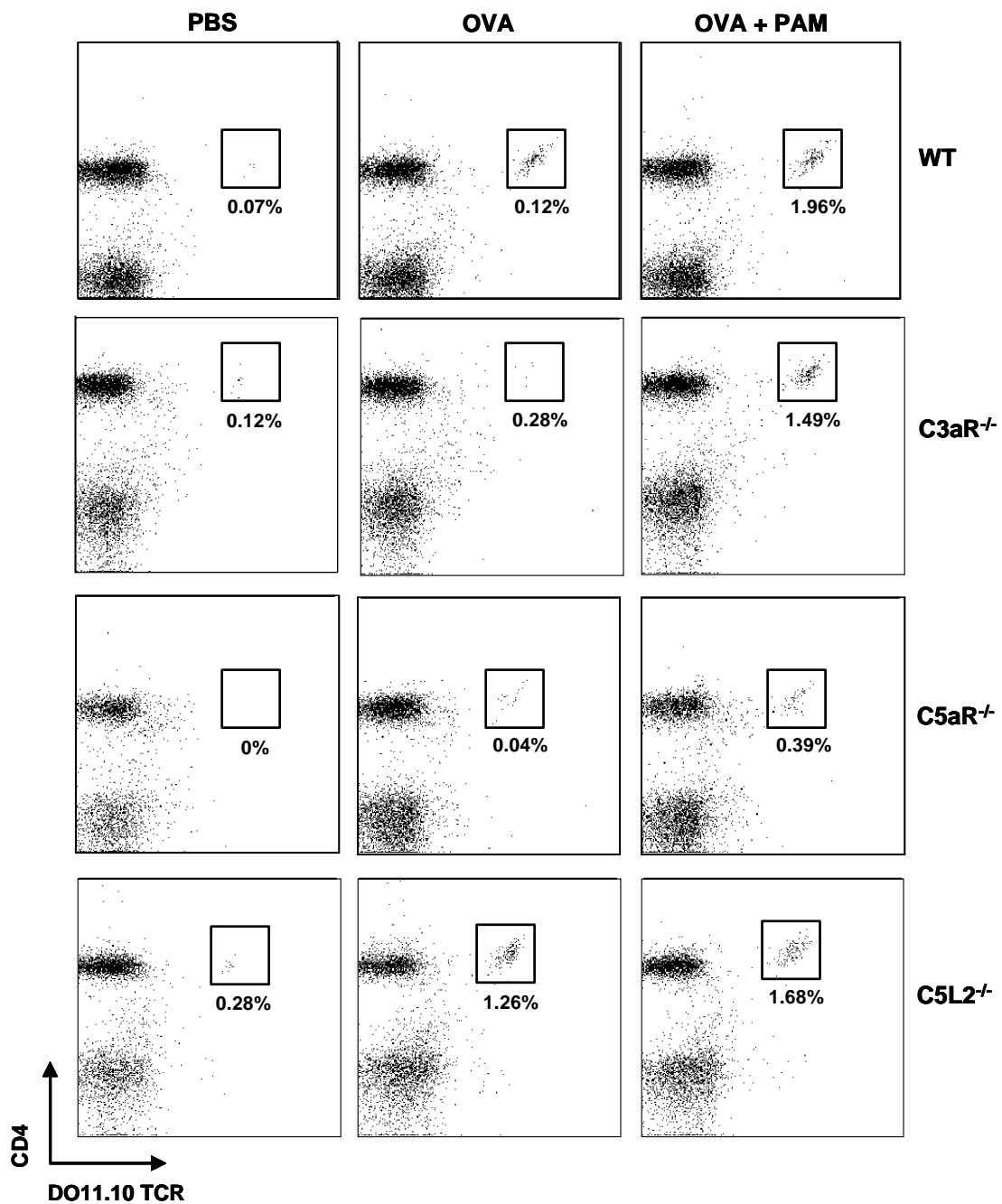
### 5.3.9 Papel *in vivo* da sinalização via ATRs em células dendríticas

Nossos dados *in vitro* sugerindo a participação dos ATRs na diferenciação Th1/Th2 de linfócitos T CD4<sup>+</sup> levaram-nos a querer comprovar este conceito em um modelo *in vivo*. Para isto, continuamos a utilizar os animais WT, C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes dos animais DO11.10/RAG2KO. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram injetadas via intravenosa nos diferentes animais que também receberam PBS, OVA ou OVA + PAM via intra-peritoneal. Após 4 dias, os baços foram coletados e analisados quanto à presença das células CD4<sup>+</sup> transgênicas para DO.11.10 TCR. A **Fig. 28** mostra que no baço dos animais controle, que receberam PBS, uma pequena porcentagem (0,28%) de células duplo positivas para CD4/DO11.10 foi detectada. Enquanto isso, a

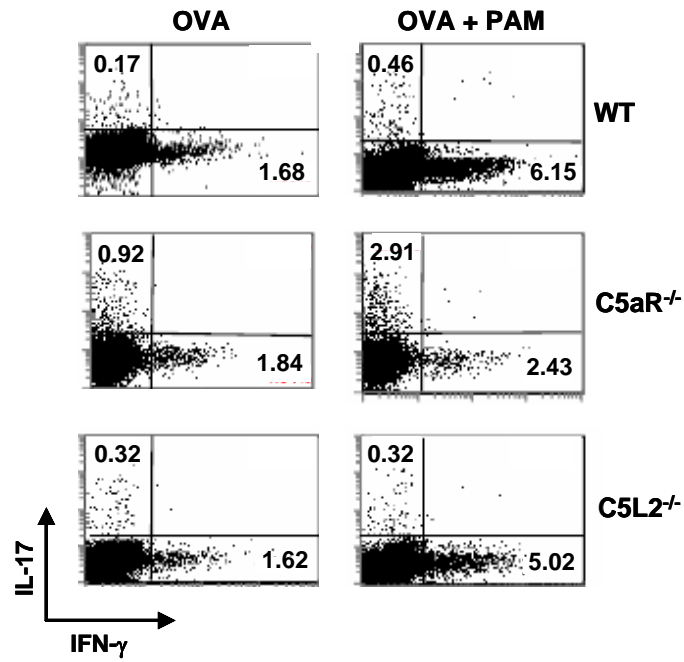
porcentagem de células duplo positivas encontrada nos animais que receberam OVA variou entre 0,04 e 1,26% e nos animais que receberam OVA + PAM entre 0,39 e 1,96% (**Fig. 28**). A porcentagem destas células duplo positivas encontrada nos baços dos animais C5aR<sup>-/-</sup> foi sempre menor, quando comparado com os animais WT, C3aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> (**Fig. 28**).

Além da marcação das células esplênicas para verificar a proliferação das células transgênicas, também utilizamos parte das células CD4<sup>+</sup> para re-estimulação com anti-CD3 e CD28 e detecção de citocinas intracelulares. Confirmamos as observações anteriores onde células dos animais C5aR<sup>-/-</sup> induzem menor porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$  (**Fig. 29**). Além disso, também observamos que esta menor indução de células produtoras de IFN- $\gamma$  está acompanhada por um aumento no número de células produtoras de IL-17 (**Fig. 29**).

Deste modo, nossos dados *in vivo* concordam com as observações anteriores de que as células C5aR<sup>-/-</sup> induzem menor proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e menor diferenciação de células Th1.



**Fig. 28. Presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/TCR DO11.10<sup>+</sup> no baço.** Animais WT, C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> receberam linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes dos animais DO11.10/RAG2KO por via intra-venosa e PBS, OVA ou OVA + PAM via intra-peritoneal. Após 4 dias, os baços foram coletados e analisados por citometria de fluxo quanto a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para OVA. Esta figura ilustra um experimento representativo, de 3 experimentos realizados.



**Fig. 29. Células de animais C5aR<sup>-/-</sup> induzem diferente polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *in vivo*.** Animais WT, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup> receberam linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes dos animais DO11.10/RAG2KO por via intravenosa e PBS, OVA ou OVA + PAM via intraperitoneal. Após 4 dias, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram isolados do baço dos diferentes animais e re-estimulados com anti-CD3 e anti-CD28 por 3 dias. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para OVA foram analisados por citometria de fluxo quanto a presença de IFN-γ e IL-17. Esta figura ilustra um experimento representativo, de 3 experimentos realizados.

## 6 DISCUSSÃO

Sallusto e Lanzavecchia (1994) foram os primeiros a estabelecer culturas de células dendríticas derivadas de monócitos humanos na presença de GM-CSF e IL-4. Nesse trabalho, os autores observaram que as células dendríticas humanas são CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>+</sup> e que, quando cultivadas nestas condições apresentavam o fenótipo de células imaturas, o qual era revertido na presença de TNF- $\alpha$  ou CD40L. Nossos resultados, relativos ao fenótipo das células dendríticas em cultura, mostraram-se de acordo com estes autores (**Fig. 9**).

As células dendríticas diferenciadas em cultura a partir de monócitos sanguíneos expressaram em grau variável RNAm para C3, C5, C9, fI, fH, fB, fD, properdina e CR1. Esta expressão mostrou-se muito semelhante em macrófagos e observamos regulação de alguns dos genes em resposta a LPS, IL-1 ou dexametasona (**Fig. 10 e 11**). Além disso, C3, fI, fB, C1q, C4BP, C7 e C8 também foram encontrados nos sobrenadantes das culturas de células dendríticas e macrófagos (**Fig. 12**).

Todos os nossos resultados encontram-se de acordo com a literatura, no que se refere à produção de proteínas do complemento por macrófagos (Morley e Walport, 2000). Fomos o primeiro grupo a demonstrar a expressão e produção destas proteínas do complemento por células dendríticas humanas. A produção de C1q já havia sido demonstrada por Castellano et al. (2004) e, mais recentemente, Peng et al. (2008) demonstraram a expressão de RNAm de C1q, C3, fB e properdina por células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongo.

As células dendríticas encontram-se presentes nos espaços intersticiais onde há menor acesso de proteínas plasmáticas do complemento (Farrar et al., 2006). O fato que estas células produzam proteínas da via alternativa nos leva a pensar que possa ocorrer ativação desta via do complemento localmente, levando à produção de fragmentos biologicamente ativos. Esta hipótese foi confirmada pelo grupo de S.H. Sacks, o qual observou a presença de C3a no sobrenadante de culturas de células dendríticas murinas (Peng et al., 2008). Considerando que as células dendríticas são as mais importantes APCs para linfócitos T *naïves*, poderíamos especular que a produção local de proteínas do complemento no micro-ambiente onde ocorre a interação com os linfócitos T, poderia afetar o estabelecimento e padrão da resposta imune.

A expressão de C3 por células dendríticas mostrou-se positivamente regulada em resposta ao LPS, IL-1 e dexametasona e, no sobrenadante das culturas



encontramos uma proteína com duas cadeias (75 e 115 kDa) (**Fig. 10-12**). Nossos dados (Reis et al., 2006a) foram endossados pelo trabalho de Peng et al. (2008) que também observaram aumento da expressão de RNAm de C3, após o estímulo com LPS.

A expressão de C5 por células dendríticas mostrou-se negativamente regulada em resposta ao LPS, mas não foi afetada pelo tratamento com IL-1 e dexametasona (**Fig. 10 e 11**). Resultados anteriores do nosso laboratório (dados não publicados) mostraram que fibroblastos humanos cultivados na presença de LPS igualmente diminuem a expressão de C5. Este componente não foi encontrado no sobrenadante das culturas de células dendríticas e macrófagos, devendo estar presente em concentração abaixo do limite do método empregado. Peng et al. (2008) não detectaram a presença de RNAm de C5 em células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos. Estes autores utilizaram LPS na cultura, o que deve ter provocado grande diminuição na expressão deste gene.

A expressão do componente C9 mostrou-se reduzida tanto em células dendríticas como macrófagos e não se alterou em resposta aos estímulos utilizados (**Fig. 10 e 11**). Este componente é produzido por hepatócitos, monócitos, fibroblastos e células da glia (Garred et al., 1990; Morgan e Gasque, 1997). Foi mostrado que IFN- $\gamma$  provoca aumento da síntese de C9 nos hepatócitos (Morgan, 2000), mas esta observação ainda não pôde por nós ser estendida a células dendríticas e macrófagos.

Quanto à expressão de fI, observamos um aumento da expressão de RNAm em resposta ao LPS (**Fig. 10**). A proteína reguladora fI pode ser produzida por hepatócitos (Morris et al., 1982), monócitos (Whaley, 1980), fibroblastos (Vyse et al., 1996), células endoteliais (Dauchel et al., 1990) e células da glia (Legoedec et al., 1995) e já foi observado um aumento de sua síntese em resposta ao LPS e IFN- $\gamma$  (Vyse et al., 1996, Dauchel et al., 1999).

A expressão do fH não se mostrou alterada em resposta aos agentes utilizados (**Fig. 10 e 11**). Esta proteína é produzida por hepatócitos (Vik et al., 1990), monócitos (Lappin et al., 1992), células endoteliais, fibroblastos e mioblastos (Legoedec et al., 1995). A síntese de fH por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos em cultura é aumentada em resposta ao IFN- $\gamma$  (Lappin et al., 1992).

A expressão de fB por células dendríticas mostrou-se positivamente regulada em resposta ao LPS, mas este aumento só foi observado em nível protéico. Após análise do sobrenadante das culturas por *Western blot*, observamos a presença de uma

cadeia polipeptídica de 90 kDa (**Fig. 12**). Além de hepatócitos, fagócitos mononucleares, fibroblastos e células endoteliais são capazes de produzir fB (Ripoche et al., 1988; Morgan e Gasque, 1997). Já foi descrito por vários autores que a expressão de RNAm de fB aumenta em resposta ao LPS, IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  (Berge et al., 1996; Lappin et al., 1990). Entretanto, em nossos experimentos não observamos aumento da expressão de fB em resposta a IL-1 $\beta$ . Este fato pode ter ocorrido devido ao uso de IL-1 em concentração inadequada ou devido à interferência da IL-4 na cultura das células dendríticas. Katz e Strunk (1990) observaram que a IL-4 inibe o aumento da expressão de fB provocado por IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

A expressão do fD também não se alterou em resposta aos agentes utilizados, mas observamos menor expressão de fD nas células dendríticas, quando comparada com os macrófagos (**Fig. 10 e 11**). A proteína não foi encontrada no sobrenadante das culturas, devendo estar presente em concentração abaixo do limite do método empregado. Diferente dos outros componentes observados, o fD é produzido principalmente por adipócitos e também pode ser produzido por monócitos e macrófagos (White et al., 1992). Barnum et al. (1992) observaram um aumento na expressão de fD em resposta a IFN- $\gamma$  em linhagens de astroglioma.

Observamos menor expressão de CR1 em células dendríticas ativadas com LPS (**Fig. 10 e 13**). A presença de CR1 em células dendríticas imaturas também foi mostrada por Nauta et al. (2004), mas fomos o primeiro grupo a demonstrar a diminuição da expressão deste receptor em células maduras (Reis et al., 2007). Nossos resultados também mostraram uma diminuição de CR1 nos macrófagos estimulados com LPS. Berger et al. (1988) mostraram que o LPS provoca um aumento na expressão de CR1 em neutrófilos, mas não encontramos na literatura referências sobre a regulação da expressão de CR1 em macrófagos. Além disso, não conseguimos detectar a presença do CR1 nos macrófagos por citometria de fluxo. Deste modo, suspeitamos que estas células com 7 dias de cultura tenham perdido este receptor da membrana.

O CR1 ou CD35 é uma glicoproteína de cadeia simples, caracterizada funcionalmente por possuir sítios de ligação para C3b, iC3b, C4b, C1q (Klickstein et al., 1997) e MBL (Ghiran et al., 2000). Destes, o fragmento C3b é o que apresenta maior afinidade pelo receptor (Klint et al., 1995). A molécula CR1 pode ser encontrada em vários tipos celulares como eritrócitos e podócitos de primatas, astrócitos, neutrófilos, basófilos,

monócitos e macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, linfócitos B e alguns linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Martin, 2007).

Quanto a expressão de RNAm e produção CR2, temos dados um pouco conflitantes já que detectamos expressão deste RNAm em células dendríticas maduras e a presença da proteína não foi observada na superfície de tais células. Acreditamos que a baixa expressão detectada por RT-PCR trata-se de contaminação da cultura com outros tipos celulares, provavelmente linfócitos que mantiveram-se viáveis devido à presença do LPS. A expressão de CR2 por células dendríticas também foi estudada por Li et al. (2000), os quais não observaram a presença desta molécula em células dendríticas humanas que foram diferenciadas na presença de GM-CSF e IL-4.

O componente C1q é essencial na ativação da via clássica, após ligação com imunocomplexos (Augener et al., 1971) e participa na remoção de células apoptóticas (Navratil et al., 2001). Diferente de outras proteínas do complemento, o C1q é produzido principalmente por monócitos e macrófagos (Petry et al., 2001). Nossos dados concordam com Castellano et al. (2004), os quais demonstraram que células dendríticas derivadas de monócitos humanos e de células CD34<sup>+</sup> são uma importante fonte de C1q, o qual é capaz de ativar complemento e ligar-se a células apoptóticas. Entretanto, diferente do que foi descrito por estes autores, não observamos uma redução na produção de C1q após tratamento com LPS (**Fig. 12**).

O C4BP é uma proteína reguladora da via clássica, sintetizado por células hepáticas (Kusada-Funakoshi et al., 1991) e monócitos ativados (Lappin e Whaley, 1990). Esta proteína encontra-se no plasma em três isoformas, cada uma delas resulta de uma combinação diferente das cadeias  $\alpha$  (70 kDa) e  $\beta$  (45 kDa). C4BP é um co-fator para fI na degradação de C3b e C4b (Dahlback e Hildebrand, 1983; Nagasawa e Stroud, 1977) e acelera o decaimento das convertases da via clássica (Gigli et al., 1979). Trabalhos recentes mostraram que o C4BP participa de outros processos, além da regulação da ativação do complemento: pode ativar linfócitos B, após ligação com CD40 (Brodeur et al., 2003) e ligar-se ao DNA de células necróticas, limitando a liberação deste DNA e conseqüente ativação do complemento (Trouw et al., 2005).

O componente C7 é sintetizado principalmente por monócitos (Hetland et al., 1986) e granulócitos (Hogasen et al., 1995) e a ligação deste componente ao complexo C5b6 permite a ligação de C8 e C9, para a formação do MAC responsável pela lise osmótica das células. O componente C8 está presente no plasma como uma forma oligomérica de 151 kDa. Ele é composto de três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), onde as cadeias  $\alpha$ -

$\gamma$  estão ligadas por uma ponte dissulfeto e a cadeia  $\beta$  está associada de maneira não covalente. Este componente é produzido principalmente por hepatócitos (Ng e Sodetz, 1987), porém monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais também secretam esta proteína. A formação do complexo C5b-9 é limitada pelas concentrações de C7 presentes no sítio de ativação do complemento e doses sublíticas de MAC podem ativar células endoteliais e células polimorfonucleares (Wurzner, 2000). Deste modo, a produção de C7 e C8 pelas células dendríticas pode influenciar na inflamação local.

Deste modo, nesta etapa do trabalho, demonstramos que as células dendríticas também podem ser consideradas uma fonte extra-hepática de algumas proteínas do complemento. Se estas moléculas são funcionais e se a síntese local é suficiente para que ocorra ativação do sistema complemento ou se tem alguma importância no momento da apresentação de antígenos aos linfócitos T, são fatos que ainda precisam ser investigados.

Estudos recentes que demonstram o papel imunoregulador do complemento em doenças inflamatórias e infecciosas, instigaram a curiosidade sobre o papel do complemento na função das células dendríticas (Köhl e Wills-Karp, 2007; Zhou et al., 2007). Alguns trabalhos sugerem que as proteínas do complemento possam regular a diferenciação de células precursoras, entretanto, até o momento, o papel do C3 na diferenciação e maturação de células dendríticas não havia sido abordado.

Foi mostrado que o C3a, por exemplo, potencia a quimiotaxia de células humanas CD34<sup>+</sup>, em resposta a CXCL12 (Reca et al., 2003). Além disso, foi relatado um aumento da mobilização de células hematopoéticas em resposta a G-CSF em camundongos deficientes de C3, sugerindo que sinais provenientes do C3aR previnem a saída de precursores da medula óssea para a circulação (Ratajczak et al., 2004). Além disso, sabe-se que os fragmentos C3a e C5a regulam a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  e a ativação do NF $\kappa$ B e STAT-3, essenciais na regeneração do fígado (Strey et al., 2003). Além das ATs, o CR2 também participa de processos de diferenciação celular. Mais especificamente, foi mostrado que o CR2 medeia a diferenciação de plasmócitos através da indução de *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp-1) e *X-box binding protein 1* (XBP-1) (Gatto et al., 2005).

Neste trabalho fornecemos evidências de que a ausência de C3 durante a diferenciação de monócitos humanos para células dendríticas interfere nos níveis de expressão de uma lectina tipo C: DC-SIGN, de moléculas apresentadoras de antígenos: CD1a e HLA-DR, de moléculas coestimuladoras: CD80 e CD86 e também na produção

das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 (**Fig. 16-19**). Como já dito anteriormente, o componente C3 é a proteína do complemento mais abundante no soro, atingindo concentrações que variam entre 0,8 a 1,9 mg/mL em indivíduos saudáveis (Ritchie et al., 2004). A clivagem desta proteína é um passo crítico na ativação do complemento e os fragmentos resultantes (C3a, C3b, iC3b, C3dg) participam da regulação da resposta inata e adaptativa através de vários receptores presentes em uma variedade de tipos celulares, incluindo fagócitos, células dendríticas e linfócitos B (Walport, 2001b; Köhl, 2006; Kemper e Atkinson, 2007; Carroll, 2004).

Utilizando este modelo de estudo não podemos dizer quais dos fragmentos, derivados da ativação de C3 contribui(em) para os efeitos observados, ou em qual/quais receptores estes fragmentos se ligam. Trabalhos do grupo de A. Erdei (Kerekes et al., 1998, 2001) demonstram que fragmentos de C3 podem ligar-se de maneira covalente a macrófagos e linfócitos B, aumentando a capacidade destas células induzirem a proliferação de linfócitos T. Deste modo, o mesmo pode ser verdade em nosso modelo, fragmentos de C3 podem estar ligados às células dendríticas de maneira covalente.

Na tentativa de determinarmos o papel de C3 no processo de diferenciação de monócitos para células dendríticas, usamos soro de um paciente deficiente de C3 (Ulbrich et al., 2001; Reis et al., 2004). Assim, durante todo o processo de diferenciação, as células não tiveram contato com altas concentrações de C3, pois não podemos descartar a produção de C3 pelas próprias células (Reis et al., 2006a; Peng et al., 2006). De fato, algumas das variações observadas nos resultados (ex: grandes diferenças encontradas na expressão de alguns marcadores como CD86) podem, em parte, ser explicadas pelas diferentes concentrações de C3 produzidas pelas células dos diferentes doadores.

A diferenciação de monócitos humanos para células dendríticas é caracterizada pelo aumento na expressão de CD1a. Nossos dados sugerem que o C3DS regule este processo, entretanto este não depende de C3, já que a reconstituição do C3DS com C3 falhou na indução do aumento da expressão de CD1a. Também observamos que o C3 é importante na regulação da expressão de MHC- II e moléculas coestimuladoras, as quais promovem dois sinais importantes na ativação de linfócitos T *naïve* (Banchereau e Steinman, 1998).

O fato que C3 também parece ser importante na produção de IL-12p70 reforça a importância deste componente no processo de diferenciação e maturação das células dendríticas, sugerindo um provável papel na polarização para uma resposta Th1 (de Jong et al., 2005). Talvez, essa expressão reduzida de moléculas coestimuladoras e baixa

produção de IL-12 também possa afetar a resposta adaptativa em pacientes deficientes de C3, visto que dos 27 casos descritos de deficiência completa de C3, 7 pacientes apresentaram manifestações autoimunes e 7 apresentaram glomerulonefrite, proteinúria ou nefropatia de IgA e grande susceptibilidade a infecções severas (Reis et al., 2006b).

Além da IL-12p70, também observamos que o C3 regula a produção de TNF- $\alpha$ , induzida por LPS. Ao contrário do que foi observado para IL-12p70, na ausência de C3 a produção de TNF- $\alpha$  encontra-se aumentada. Este impacto negativo de C3 na produção de TNF- $\alpha$  pode resultar da ausência de C3a, o qual diminui a produção de AMP cíclico (Sayah et al., 2003). O AMPc, por sua vez, inibe a produção de TNF- $\alpha$  em vários tipos celulares, incluindo células mononucleares do sangue periférico (Zidek, 1999).

Um trabalho recente (Chen et al., 2007b) mostrou que células dendríticas derivadas de monócitos humanos, diferenciadas na presença de concentrações sub-líticas de C5b-9, apresentam um aumento na expressão de HLA-DR, CD80 e CD86. Entretanto, diferente das nossas observações, C5b-9 também afetou a expressão de CD83. Além disso, células dendríticas tratadas com C5b-9 produziram maiores níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  (Chen et al., 2007b), enquanto nossos dados mostraram efeitos opostos de C3 na produção destas duas citocinas. Estes autores não investigaram o efeito de C5b-9 na expressão de lectinas tipo C, IL-6 e IL-10. Assim, enquanto alguns dos efeitos aqui observados podem ser explicados pela presença de C5b-9 no NHS, os diferentes efeitos encontrados na expressão de CD83, CD1a e na produção de citocinas sugerem que diferentes vias medeiam os efeitos aqui observados.

Candidatos como responsáveis por estes efeitos incluem o C3a, o qual foi capaz de provocar o aumento na expressão de CD54, CD83 e CD86 mas não CD40, CD80 e HLA-DR em células dendríticas derivadas de monócitos humanos, tratadas com uma combinação de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Gutzmer et al., 2004). Este tratamento levou ao aumento da produção de IL-10 e IL-12p70. Além disso, os mesmos autores mostraram que o C3a provoca migração das células dendríticas. Efeitos migratórios, provocados por C3a e C5a também foram descritos por (Soruri et al., 2003a), que detectaram aumento na migração de monócitos (injetados via endovenosa) para a cavidade peritoneal de camundongos SCID. O C5a não somente recrutou os monócitos para a cavidade peritoneal, mas também induziu a diferenciação em células dendríticas por um mecanismo dependente de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (Soruri et al., 2003b).

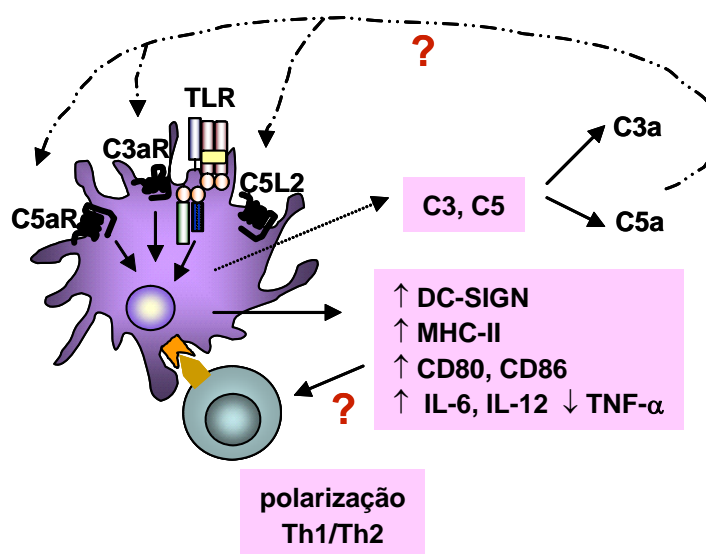
Outros trabalhos também demonstraram influência do complemento na secreção de citocinas por células dendríticas. Morelli et al. (2003) demonstraram que células dendríticas presentes no baço fagocitam células apoptóticas via CR3 e CR4, levando a uma diminuição na expressão de RNAm e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e TNF- $\alpha$ . Marth e Kelsall (1997) demonstraram que a ligação de iC3b ao CR3, presente em monócitos humanos, regula a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ . O fragmento iC3b também pode inibir a maturação de células dendríticas, com conseqüente diminuição da produção de IL-12p70 (Takahara et al., 2003). O mesmo grupo mostrou que esta inibição é controlada via MAPK após ligação iC3b-CR3 (Luo et al., 2005). De modo geral, foi mostrado que o fragmento iC3b inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Assim, não acreditamos que os efeitos visualizados em nosso modelo seja conseqüência da sinalização via iC3b-CR3, pois encontramos maior secreção de IL-6 e IL-12p70 nas células diferenciadas na presença de C3.

Também foi mostrado que a síntese de IL-6 pode ser regulada pela sinalização C3a-C3aR em células mononucleares humanas, através da ativação de NF- $\kappa$ B (Fischer et al., 1999). Este é mais um fato a favor da nossa hipótese de que o fragmento C3a seja o responsável pelo aumento da expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas pelas células dendríticas.

Deste modo, formulamos a seguinte hipótese para tentar explicar nossos resultados (**Fig. 30**): fragmentos C3a e/ou C5a presentes no soro humano normal ligar-se-iam ao C3aR e/ou C5aR presente nos monócitos. Esta ligação levaria ao acoplamento da proteína G e conseqüente ativação de uma ou mais vias de transdução de sinal (até o momento nada foi caracterizado em células dendríticas), culminando na ativação do NF- $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6, as quais atuam na própria célula levando ao aumento da expressão de moléculas como CD80, CD86 e HLA-DR e também da produção de IL-12.

O aumento da expressão de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 e também o aumento de HLA-DR e citocinas como IL-6 e IL-12, possivelmente causados por C3a/C5a, podem influenciar a apresentação de antígenos e a resposta proliferativa de linfócitos T (**Fig. 30**). Talvez o padrão de resposta dos linfócitos T (Th1/ Th2) também seja afetado, já que a ausência de C3 durante a diferenciação das células dendríticas, diminuiu a produção de IL-12.

Em resumo, descrevemos um novo papel para o componente C3 na diferenciação de células dendríticas. Além disso, nossos achados sugerem um *cross-talk* entre as vias ativadas pelo LPS e receptores de complemento, que regulam a expressão de MHC-II, moléculas coestimuladoras e produção de citocinas. Este tipo de *cross-talk* já foi demonstrado em modelos animais, sendo crítico do desenvolvimento da resposta adaptativa *in vitro* e *in vivo* (Hawlich et al., 2005; Zhang et al., 2007) e é provável que afete o desenvolvimento da resposta imune em humanos, provocando alergias e autoimunidade.



**Fig. 30. Possível ação dos fragmentos C3a/C5a na diferenciação de células dendríticas humanas.** Durante a diferenciação, fragmentos C3a e/ou C5a ligam-se a seus respectivos receptores presentes nos monócitos. Isto ativa proteínas G acopladas aos receptores, culminando com a ativação de fatores de transcrição e aumento na expressão de moléculas de superfície e na produção de citocinas. A maior expressão de MHC-II e de moléculas coestimuladoras e maior produção de IL-12 e IL-6 podem influenciar a apresentação de antígenos e a resposta de linfócitos T.

Suspeitávamos que os efeitos observados em nossos experimentos seriam decorrentes da sinalização C3a-C3aR e/ou C5a-C5aR. A molécula de C3 pode se ativar em condições fisiológicas e gerar moléculas efetoras, como C3a/C5a, que podem se ligar aos seus receptores acoplados a proteína G presentes nas células dendríticas, causando a ativação destas células (Kirchhoff et al., 2001). Por este motivo, passamos a investigar células dendríticas derivadas de animais deficientes dos receptores para as ATs C3a e C5a.



A presença de receptores do complemento na superfície de células dendríticas foi observada por diferentes grupos (Gutzmer et al., 2004; Weinmann et al., 2003; Verbovetski et al., 2002; Köhl et al., 2006). Foi mostrado que a expressão de C3aR em células dendríticas aumenta em resposta a IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PGE<sub>2</sub> (Gutzmer et al., 2004) e LPS (Peng et al., 2008) e que a expressão de C5aR também aumenta em resposta a PGE<sub>2</sub> (Weinmann et al., 2003) e LPS (Peng et al., 2008). Ohno et al. (2000) detectaram a presença de C5L2 em células dendríticas imaturas, porém não nas maduras.

Nossos dados provenientes das células dendríticas murinas concordam com a hipótese discutida anteriormente, já que as células murinas deficientes de ATRs apresentaram menor expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras. Menor expressão de MHC-II, associada com menor expressão de CIITA, foi observada nas APCs C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 22, 23**). Esta molécula CIITA é um co-ativador que não se liga diretamente ao DNA e é específico no controle da transcrição do gene *MHC-II*. Em camundongos, a transcrição do RNAm de CIITA é regulada por uma grande região promotora, que controla de maneira célula-específica, a transcrição do CIITA tipo I (macrófagos e células dendríticas), tipo III (linfócitos B) e tipo IV (induzido por IFN- $\gamma$ ) (Reith et al., 2005). Recentemente, Yao et al. (2006) observaram que a ativação da via MAPK/ERK regula negativamente a expressão de CIITA em células dendríticas. A ativação destas vias também está envolvida com a sinalização pelos ATRs. Também foi observado que a deacetilação de resíduos de lisina nas histonas está associada com a repressão da transcrição e que a exposição das células dendríticas ao LPS suprime a expressão do gene *c2ta* pela deacetilação de toda a região reguladora deste gene (Landmann et al., 2001). No futuro, pretendemos estudar uma possível ligação entre a sinalização pelos ATRs e a deacetilação de histonas para melhor entendimento destes resultados.

Nos experimentos envolvendo a expressão de MHC-II também utilizamos, além de células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup>, células derivadas de medula óssea que foram diferenciadas na presença de citocinas e C5aRA. Este antagonista é um peptídeo C5a mutado, desenvolvido por Heller et al. (1999). Este peptídeo apresenta uma deleção na porção C-terminal (aa 71-73) e possui grande afinidade para C5aR e C5L2, inibindo a ligação de C5a e C5adesArg (Otto et al., 2004).

A menor expressão das moléculas coestimuladoras foi mais evidente nas células C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 24**). A expressão de CD80 também se mostrou afetada nas células C5L2<sup>-/-</sup>. É interessante notar que trabalhos como de Soruri et al. (2003b) e Moulton et al. (2007), os quais trataram as células dendríticas com C5a e utilizaram células dendríticas

C5<sup>-/-</sup>, respectivamente, não detectaram diferença na expressão de moléculas coestimuladoras, quando estas células foram comparadas com células não tratadas ou C5<sup>+/+</sup>. Nós suspeitamos que nossas observações (menor expressão de moléculas coestimuladoras em células C5aR<sup>-/-</sup>) possam resultar da ausência de *cross-link* entre C5aR e TLR, também observado por Hawlisch et al. (2005). Deste modo, sugerimos que a sinalização pelo C5aR seja necessária para uma sinalização ótima pelos TLRs 2 e 4.

Como observado nos resultados anteriores com células humanas, também constatamos menor produção de IL-12 nas células ATR<sup>-/-</sup> (**Fig. 25**). Fato interessante foi a maior produção de IL-10 nas células C3aR<sup>-/-</sup> e a observação de que estes níveis estão relacionados com a menor produção de IL-12 por estas células, diferente do que ocorre nas células C5aR<sup>-/-</sup>. Recentemente, Peng et al. (2008) relataram menor produção de IL-12 e maior produção de IL-10 por células dendríticas derivadas de medula óssea de animais C3aR<sup>-/-</sup>.

As células C5aR<sup>-/-</sup> apresentaram menor produção de IL-12 e também de IL-6. Moulton et al. (2007) sugerem que a menor produção de IL-12p70 por células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> de animais infectados com o bacilo *Mycobacterium bovis* (BCG) esteja relacionada com a menor ativação de NF-κB. Provavelmente a sinalização pelo C5aR tenha efeitos contrários em células dendríticas e macrófagos. Hawlisch et al. (2005) demonstraram que o C5a regula de modo negativo a produção de IL-12 induzida por LPS e CD40L. Esta regulação se dá pela inibição das vias ERK e PI3K. Quanto à produção de IL-6, é bem sabido, principalmente em modelos de sepse, que C5a aumenta a produção de IL-6 (Ward, 2008). Como também detectamos uma menor produção de IL-12p40 pelas células ATR<sup>-/-</sup>, suspeitamos que a produção de IL-23 também esteja prejudicada, o que por sua vez, poderia afetar a indução da proliferação de linfócitos T de memória (Trinchieri et al., 2003).

Nossas observações seguintes, mostrando menor proliferação e indução da produção de IFN-γ pelas células ATR<sup>-/-</sup> (**Fig. 26, 27**) são totalmente coerentes com os resultados discutidos anteriormente, já que o balanço IL-4/ IFN-γ é diretamente dependente dos níveis de IL-12 produzidos pelas células dendríticas (Trinchieri, 2003). Comparadas com as células WT e C3aR<sup>-/-</sup>, as células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> induziram maior produção de IL-4 pelos linfócitos T. Como já discutido, diferente do encontrado nas células C3aR<sup>-/-</sup>, as células C5aR<sup>-/-</sup> também apresentam menor expressão de MHC-II e de moléculas coestimuladoras. Consideramos este fato como o responsável pelas diferenças encontradas

nos níveis de proliferação e produção de IL-4 provocados pelas células C3aR<sup>-/-</sup> e C5aR<sup>-/-</sup>, pois é sabido que a diferenciação de células Th1 só ocorre quando as moléculas MHC-II estão localizadas em microdomínios ricos em lipídeos presentes na superfície de células dendríticas (Buatois et al., 2003) e que o bloqueio de CD80 e CD86 reduz a agregação destas moléculas MHC-II (Wulfing et al., 2002). O trabalho de Buatois et al. (2003) também mostra que a expressão de CD40, CD80 e CD86 é essencial para produção de IL-12 de diferenciação de células Th1.

Utilizamos um modelo *in vivo* para tentar comprovar as observações anteriores. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de animais RAG<sup>-/-</sup> transgênicos para OVA foram injetados via endovenosa em animais WT, C3aR<sup>-/-</sup>, C5aR<sup>-/-</sup> e C5L2<sup>-/-</sup>, que receberam ou não Pam3Cys intra-peritonealmente. Após 4 dias pudemos recuperar estes linfócitos T transgênicos no baço dos animais recipientes (**Fig. 28**). Encontramos uma menor porcentagem destas células no baço dos animais C5aR<sup>-/-</sup>, concordando com os dados *in vitro* onde células C5aR<sup>-/-</sup> induzem menores níveis de proliferação de linfócitos T.

Após a re-estimulação *ex vivo* destas células também observamos menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-4 e TGF- $\beta$  (dados não mostrados) pelos esplênócitos dos animais C5aR<sup>-/-</sup>. E, além disso, observamos maior número de células produtoras de IL-17 nos animais C5aR<sup>-/-</sup> (**Fig. 29**). Este fato é muito interessante já que não existem dados na literatura correlacionando a sinalização por receptores de complemento e a diferenciação de células Th17. Outras observações ainda não publicadas feitas no laboratório do Dr. Jörg Köhl também indicam maior diferenciação de linfócitos Treg nos animais C5aR<sup>-/-</sup> e maior produção de IL-21 pelas células C5aR<sup>-/-</sup>. Além disso, foi observado que na presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as células dendríticas C5aR<sup>-/-</sup> produzem maiores níveis de IL-6 e que o bloqueio de IL-6 e TGF- $\beta$  nestas co-culturas leva a diminuição da produção de IL-17 pelas células C5aR<sup>-/-</sup>. Deste modo, o conjunto destas observações nos levaram a formular a seguinte hipótese, representada na **Fig. 31**.

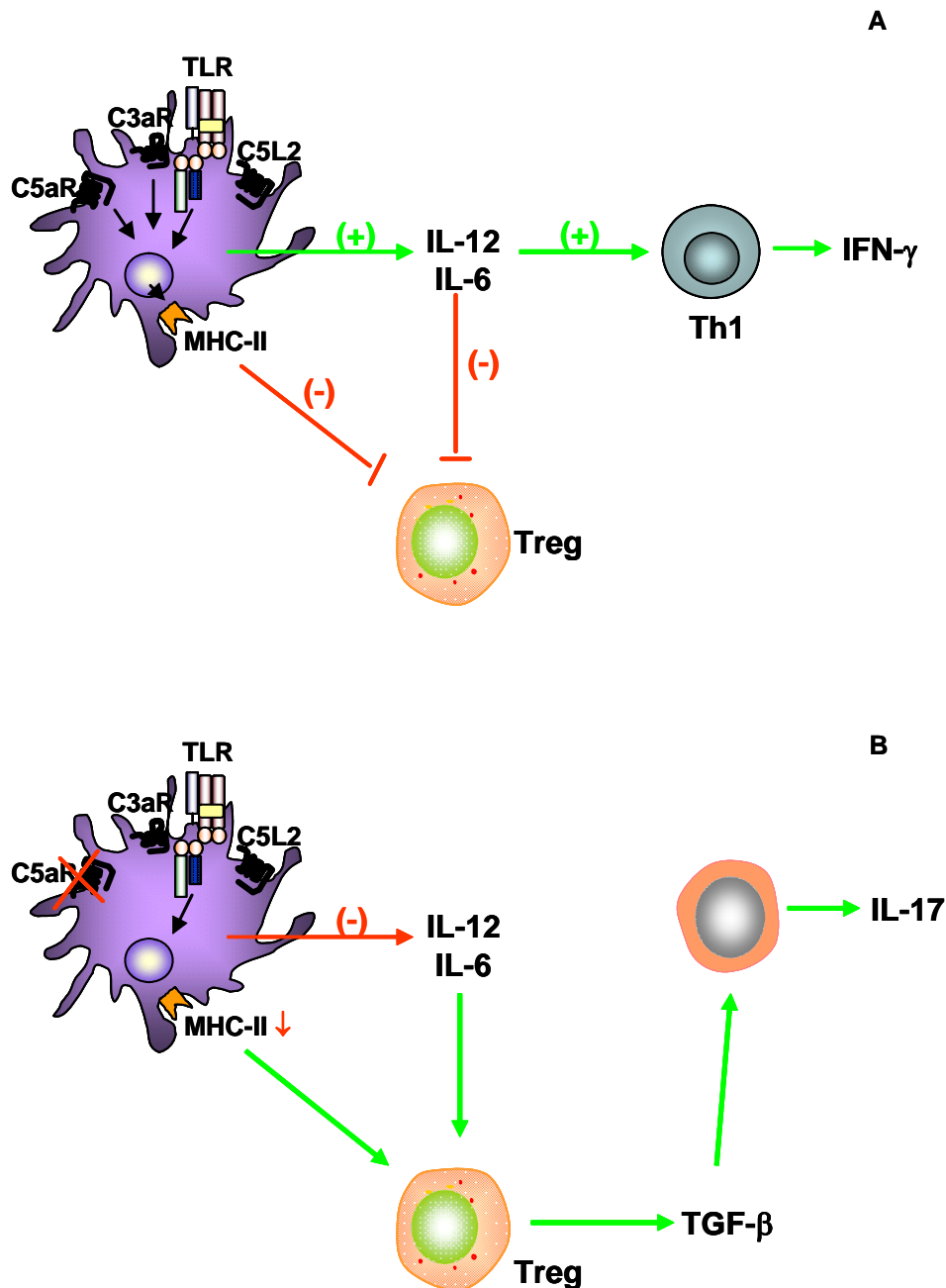
Acreditamos que, juntamente com a ativação de TLRs, a sinalização via C5aR seja necessária para a expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CD40 e também para a produção de IL-6 e IL-12. Esta produção de IL-6 e IL-12 deve ser responsável pela inibição da diferenciação de linfócitos Treg e ao contrário, pela estimulação do desenvolvimento de linfócitos Th1, secretores de IFN- $\gamma$ . Na ausência da sinalização pelo C5aR, os menores níveis de MHC-II, moléculas coestimuladoras, IL-6 e IL-12 propiciam o

desenvolvimento de linfócitos Treg, produtores de altos níveis de TGF- $\beta$ . Esta citocina, por sua vez, leva a diferenciação de células produtoras de IL-17.

Também acreditamos que a sinalização via C3aR seja necessária para produção de IL-12, induzida pela ligação de TLRs. Esse *cross-talk* entre receptores de complemento e TLRs será tema de investigações futuras.

Quanto à sinalização pelo C5L2, nossos dados mostram que esta pode estar relacionada com a expressão de CD80. Ao contrário de Chen et al. (2007a), que investigaram o papel deste receptor em neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, não observamos nenhum impacto deste receptor na expressão de CD86, CD40 e na produção de IL-6, indicando que este receptor desempenha papéis distintos nos diferentes tipos celulares.

De modo geral, este trabalho sugere uma participação do sistema complemento na regulação da resposta imune adquirida. Esta regulação se deve à participação do componente C3 e/ou seus derivados na diferenciação e maturação de células dendríticas humanas e murinas e conseqüente modulação da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



**Fig. 31. Proposta de modelo de diferenciação de linfócitos Th induzida por células dendríticas  $C5aR^{+/+}$  (A) ou  $C5aR^{-/-}$  (B).** A sinalização via C3aR e/ou C5aR, juntamente com a sinalização via TLR, é necessária para a expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CD40 e também para a produção de IL-6 e IL-12. Esta produção de IL-6 e IL-12 deve ser responsável pela inibição da diferenciação de linfócitos Treg e ao contrário, pela estimulação do desenvolvimento de linfócitos Th1, secretores de IFN- $\gamma$  (A). Na ausência da sinalização pelo C5aR, os menores níveis de MHC-II, moléculas coestimuladoras, IL-6 e IL-12 propiciam o desenvolvimento de linfócitos Treg, produtores de altos níveis de TGF- $\beta$ . Esta citocina, por sua vez, induz a diferenciação de células produtoras de IL-17.

## 7 CONCLUSÕES

1. Células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos humanos expressam RNAm para C3, C5, C9, FI, FH, FB, FD, properdina e CR1.
2. LPS induz aumento na expressão de RNAm para C3 e FI e diminuição na expressão de C5 e CR1.
3. A expressão de RNAm de diversas proteínas do complemento é regulada de modo estímulo-específico e não depende do estado de maturação da célula.
4. Células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos secretam C3, FI, FB, C1q, C4BP, C7 e C8 e expressam CR1 e CD18 na membrana celular.
5. A molécula nativa ou fragmentos de C3 depositam-se na superfície de células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos.
6. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas causa redução nos níveis de expressão de DC-SIGN, MHC-II, CD80 e CD86 por estas células.
7. Células dendríticas diferenciadas na presença de soro deficiente de C3 apresentam menores níveis de CD1a.
8. Ausência de C3 durante a diferenciação de células dendríticas humanas afeta a produção de IL-6 e IL-12p40.
9. Células dendríticas diferenciadas na ausência de C3 e ativadas com LPS produzem níveis reduzidos de IL-12p70 e níveis aumentados de TNF- $\alpha$ .
10. Células dendríticas esplênicas murinas C3aR<sup>-/-</sup>, ativadas via TLR2, produzem níveis reduzidos de IL-12p40 e IL-12p70 e níveis aumentados de IL-10.
11. Células dendríticas esplênicas murinas C5R<sup>-/-</sup> expressam níveis reduzidos de MHC-II.
12. Células dendríticas C5R<sup>-/-</sup>, ativadas com LPS ou Pam3Cys, expressam níveis reduzidos de CD80, CD86, CD40 e produzem níveis reduzidos de IL-12p40, IL-12p70 e IL-6.
13. Células dendríticas esplênicas murinas C5L2<sup>-/-</sup>, ativadas com LPS ou Pam3Cys, expressam níveis reduzidos de CD80.
14. A menor expressão de MHC-II encontrada em APCs C5aR<sup>-/-</sup> está relacionada com a menor expressão de CIITA por estas células.

- 15.** Células dendríticas C3R<sup>-/-</sup>, cultivadas na presença de OVA e ativadas ou não com Pam3Cys, induzem menor produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para OVA.
- 16.** Células dendríticas C5R<sup>-/-</sup>, cultivadas na presença de OVA e ativadas ou não com Pam3Cys, induzem menor proliferação, menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-4 e IL-17 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> transgênicos para OVA.

## REFERÊNCIAS\*

- Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol.* 2001;2:725-31.
- Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway e inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002;8:1024-32.
- Alper CA, Johnson AM, Birtch AG, Moore FD. Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* 1969;163:286-88.
- Augener W, Grey HM, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ. The reaction of monomeric e aggregated immunoglobulins with C1. *Immunochemistry* 1971;8:1011-20.
- Bajtay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol.* 2004;173:4775-78.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells e the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- Barnum SR, Ishii Y, Agrawal A, Volanakis JE. Production e interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 e factors B e D by the astrogloma cell line U105-MG. *Biochem J.* 1992;287:595-601.
- Berge V, Johnson E, Berge KE. Interleukin-1 alpha, interleukin 6 e tumor necrosis factor alpha increase the synthesis e expression of the functional alternative e terminal complement pathways by human umbilical vein endothelial cells in vitro. *APMIS.* 1996;104:213-19.
- Berger M, Wetzler EM, Wallis RS. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood* 1988;71:151-58.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity e autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8:345-50.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40:845-59.
- Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:253-57.
- Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation e characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest.* 1970;49:2427-36.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A. Macrophages e Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce IL-10 in Response to MyD88- e TRIF-Dependent TLR Signals, e TLR-Independent Signals. *J Immunol.* 2006;177:7551-58.
- Botto M. *in* Morley BJ, Walport MJ. The complement facts book. Academic Press. London. 2000;228p.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).



- Botto M, Lissandrini D, Sorio C, Walport MJ. Biosynthesis e secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1992;149:1348-55.
- Braun MC, Lahey E, Kelsall BL. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol.* 2000;164:3009-17.
- Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, Fujiwara H, Plebani A, Notarangelo LD, Dahlback B, Tsitsikov E, Geha RS. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* 2003;18:837-48.
- Buatois V, Baillet M, Becart S, Mooney N, Leserman L, Machy P. MHC class II-peptide complexes in dendritic cell lipid microdomains initiate the CD4 Th1 phenotype. *J Immunol.* 2003;171:5812-19.
- Cain SA, Monk PN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a e C5a des-Arg(74). *J Biol Chem.* 2002;277:7165-69.
- Carney DF, Haviland DL, Noack D, Wetsel RA, Vik DP, Tack BF. Structural aspects of the human C5 gene. Intron/exon organization, 5'-flanking region features, e characterization of two truncated cDNA clones. *J Biol Chem.* 1991;266:18786-91.
- Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5:981-86.
- Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol.* 2006;7:1074-81.
- Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, Roos A, Trouw LA, Seelen MA, Schena FP, Daha MR, van KC. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo e in vitro. *Blood* 2004;103:3813-20.
- Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, Xu W, Schena FP, Daha MR, van KC. Immune modulation of human dendritic cells by complement. *Eur J Immunol.* 2007;37:2803-11.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458-70.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, zutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med.* 1996;184:695-706.
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation e antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:10-16.
- Chen NJ, Mirsos C, Suh D, Lu YC, Lin WJ, McKerlie C, Lee T, Baribault H, Tian H, Yeh WC. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a e C3a. *Nature* 2007a;446:203-7.
- Chen Y, Yang C, Jin N, Xie Z, Tang Y, Fei L, Jia Z, Wu Y. Terminal complement complex C5b-9-treated human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation e induce Th1 polarization. *Eur J Immunol.* 2007b;37:167-76.

- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;8:5294-99.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-59.
- Colten HR. Biosynthesis of the fifth component of complement (C5) by human fetal tissues. *Clin Immunol Immunopathol*. 1973;1:346-352.
- Colten HR, Ooi YM, Edelson PJ. Synthesis e secretion of complement proteins by macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. 1979;332:482-90.
- Crass T, Raffetseder U, Martin U, Grove M, Klos A, Köhl J, Bautsch W. Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur J Immunol*. 1996;26:1944-50.
- Dahlback B, Hildebrand B. Degradation of human complement component C4b in the presence of the C4b-binding protein-protein S complex. *Biochem J*. 1983;209:857-63.
- Dankert JR, Shiver JW, Esser AF. Ninth component of complement: self-aggregation e interaction with lipids. *Biochemistry*. 1985;24:2754-62.
- Dauchel H, Julien N, Lemercier C, Daveau M, Ozanne D, Fontaine M, Ripoche J. Expression of complement alternative pathway proteins by endothelial cells. Differential regulation by interleukin 1 e glucocorticoids. *Eur J Immunol*. 1990;20:1669-75.
- de Bruijn MH, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence e derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:708-12.
- de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26:289-307.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate e acquired immunity. *Science*. 1996;271:348-50.
- Diao J, Winter E, Cantin C, Chen W, Xu L, Kelvin D, Phillips J, Catral MS. In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. *J Immunol*. 2006;176:7196-206.
- Dillon S, Agrawal A, Van DT, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase e c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*. 2004;172:4733-43.
- Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol*. 2003;170:4457-64.
- Einstein LP, Hansen PJ, Ballow M, Davis AE, III, Davis JS, Alper CA, Rosen FS, Colten HR. Biosynthesis of the third component of complement (C3) in vitro by monocytes from both normal e homozygous C3-deficient humans. *J Clin Invest*. 1977;60:963-69.
- Ember JA, Jagels MA, Hugli TE. Characterization of complement anaphylatoxins e their biological responses. In: Volanakis JE, Frank MM, editors. *The human complement system in health e disease*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1998. p 241-284.

- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van LE, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van KY. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 2002;168:2118-126.
- Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postschismic acute renal failure. *FASEB J.* 2006;20:217-26.
- Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a e C3a(desArg). *J Immunol.* 1999;162:453-59.
- Fong KY, Botto M, Walport MJ, So AK. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics.* 1990;7:579-86.
- Fujita T, Takiuchi M, Iida K, Nagaki K, Inai S. The activation mechanism of the alternative pathway of the human complement system by the immune precipitate formed with F(ab')<sub>2</sub> of rabbit IgG antibody: the generation of C3- e C5-cleaving enzymes on the immune precipitate. *Immunochemistry.* 1977;14:25-30.
- Gao H, Neff TA, Guo RF, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, Man Y, Riedemann NC, Hoesel LM, Younkin E, Zetoune FS, Ward PA. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J.* 2005;19:1003-5.
- Garred P, Hetland G, Mollnes TE, Stoervold G. Synthesis of C3, C5, C6, C7, C8, e C9 by human fibroblasts. *Scand J Immunol.* 1990;32:555-60.
- Gatto D, Pfister T, Jegerlehner A, Martin SW, Kopf M, Bachmann MF. Complement receptors regulate differentiation of bone marrow plasma cell precursors expressing transcription factors Blimp-1 e XBP-1. *J Exp Med.* 2005;201:993-1005.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van KY, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000;100:575-85.
- Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, van KY. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003;197:7-17.
- Geng L, Iwabuchi K, Sakai S, Ogasawara M, Fujita M, Noguchi M, Good RA, Morikawa K, Onoe K. A study on location of synthetic site which mainly synthesizes e delivers fifth component of complement system in vivo. *Microbiol Immunol.* 1986;30:1281-90.
- Gerard C, Gerard NP. C5A anaphylatoxin e its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:775-808.
- Gerard NP, Gerard C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature.* 1991;349:614-17.
- Gerard NP, Lu B, Liu P, Craig S, Fujiwara Y, Okinaga S, Gerard C. An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a binding protein, C5L2. *J Biol Chem.* 2005;280:39677-80.
- Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med.* 2000;192:1797-808.
- Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein e C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:6596-600.

- Golan MD, Burger R, Loos M. Conformational changes in C1q after binding to immune complexes: detection of neoantigens with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1982;129:445-47.
- Gray P, Dunne A, Brikos C, Jefferies CA, Doyle SL, O'Neill LA. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 e TLR4 signal transduction. *J Biol Chem.* 2006;281:10489-195.
- Gutzmer R, Lisewski M, Zwirner J, Mommert S, Diesel C, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology.* 2004;11:435-43.
- Hawlich H, Belkaid Y, Baelder R, Hildeman D, Gerard C, Köhl J. C5a negatively regulates Toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity.* 2005;22:415-26.
- Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, Xu Y, Medof ME. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med.* 2005;201:1523-30.
- Heller T, Hennecke M, Baumann U, Gessner JE, zu Vilsendorf AM, Baensch M, Boulay F, Kola A, Klos A, Bautsch W, Köhl J. Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease e ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 1999;163:985-94.
- Hetland G, Johnson E, Falk RJ, Eskeland T. Synthesis of complement components C5, C6, C7, C8 e C9 in vitro by human monocytes e assembly of the terminal complement complex. *Scand J Immunol.* 1986;24:421-28.
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, e IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2001;166:5448-55.
- Hogasen AK, Wurznner R, Abrahamsen TG, Dierich MP. Human polymorphonuclear leukocytes store large amounts of terminal complement components C7 e C6, which may be released on stimulation. *J Immunol.* 1995;154:4734-40.
- Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, Taya C, Taniguchi T. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature.* 2005;434:1035-40.
- Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002;420:329-33.
- Humbles AA, Lu B, Nilsson CA, Lilly C, Israel E, Fujiwara Y, Gerard NP, Gerard C. A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature.* 2000;406:998-1001.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1992;176:1693-702.
- Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions e inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:355-83.
- Izenman DE, Kells DI, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ, Pangburn MK. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry.* 1981;20:4458-67.
- Ishizaka T, Ishizaka K, Borsos T, Rapp H. C'-1 fixation by human isoagglutinins: fixation of C'-1 by gamma-G e gamma-M but not by gamma-A antibody. *J Immunol.* 1966;97:716-26.

- Jackson SH, Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Egwuagu CE. Dendritic cell maturation requires STAT1 e is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J Immunol.* 2004;172:2307-15.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells e thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995;375:151-55.
- Johswich K, Martin M, Thalmann J, Rheinheimer C, Monk PN, Klos A. Ligand specificity of the anaphylatoxin C5L2 receptor e its regulation on myeloid e epithelial cell lines. *J Biol Chem.* 2006;281:39088-95.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets e their interrelations. *J Immunol.* 2003;171:6323-27.
- Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2006;125:943-55.
- Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem.* 2003;278:11123-29.
- Kalant D, Maclaren R, Cui W, Samanta R, Monk PN, Laporte SA, Cianflone K. C5L2 is a functional receptor for acylation stimulating protein. *J Biol Chem.* 2005;280:23936-44.
- Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K. The development, maturation, e turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol.* 2000;165:6762-70.
- Karp CL, Grupe A, Schadt E, Ewart SL, Keane-Moore M, Cuomo PJ, Köhl J, Wahl L, Kuperman D, Germer S, Aud D, Peltz G, Wills-Karp M. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol.* 2000;1:221-26.
- Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, Griffin DE. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.* 1996;273:228-31.
- Katz Y, Revel M, Strunk RC. Interleukin 6 stimulates synthesis of complement proteins factor B e C3 in human skin fibroblasts. *Eur J Immunol.* 1989;19:983-88.
- Katz Y, Strunk RC. Enhanced synthesis of factor B induced by tumor necrosis factor in human skin fibroblasts is decreased by IL-4. *J Immunol.* 1990;144:4675-80.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007;13:460-69.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 e TRAF6. *Nat Immunol.* 2004;5:1061-68.
- Kawamoto S, Yalcindag A, Laouini D, Brodeur S, Bryce P, Lu B, Humbles AA, Oettgen H, Gerard C, Geha RS. The anaphylatoxin C3a downregulates the Th2 response to epicutaneously introduced antigen. *J Clin Invest.* 2004;114:399-407.
- Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:9-18.

- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 e CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*. 2003;421:388-92.
- Kirchhoff K, Weinmann O, Zwirner J, Begemann G, Gotze O, Kapp A, Werfel T. Detection of anaphylatoxin receptors on CD83+ dendritic cells derived from human skin. *Immunology*. 2001;103:210-17.
- Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, e receptors. *Immunopharmacology*. 2000;49:159-70.
- Klco JM, Lassere TB, Baranski TJ. C5a Receptor Oligomerization: I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2003;278:35345-53.
- Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*. 1997;7:345-55.
- Klint C, Truedsson L, Sturfelt G. Binding to erythrocyte complement receptor type 1 of BSA/anti-BSA complexes opsonized by C4A3 or C4B1 in the presence of serum. *Scand J Immunol*. 1995;42:425-32.
- Köhl J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol*. 2001;38:175-87.
- Köhl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res*. 2006;34:157-76.
- Köhl J, Baelder R, Lewkowich IP, Pandey MK, Hawlisch H, Wang L, Best J, Herman NS, Sproles AA, Zwirner J, Whitsett JA, Gerard C, Sfyroera G, Lambris JD, Wills-Karp M. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *J Clin Invest*. 2006;116:783-96.
- Köhl J, Wills-Karp M. Complement regulates inhalation tolerance at the dendritic cell/T cell interface. *Mol Immunol*. 2007;44:44-56.
- Kohler PF, Müller-Eberhard HJ. Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol*. 1967;99:1211-16.
- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med*. 2002;8:373-78.
- Kusada-Funakoshi M, Sasaki J, Takada Y, Soji T, Arakawa K. Evidence that C4b-binding protein (proline-rich protein) is synthesized by hepatocytes. *Biochem Med Metab Biol*. 1991;45:350-54.
- Lachance G, Levasseur S, Naccache PH. Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. Implication of phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem*. 2002;277:21537-41.
- Lahoud MH, Proietto AI, Gartlan KH, Kitsoulis S, Curtis J, Wettenhall J, Sofi M, Daunt C, O'keeffe M, Caminschi I, Satterley K, Rizzitelli A, Schnorrer P, Hinohara A, Yamaguchi Y, Wu L, Smyth G, Handman E, Shortman K, Wright MD. Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177:372-82.
- Lalli PN, Strainic MG, Lin F, Medof ME, Heeger PS. Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN-gamma-producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production. *J Immunol*. 2007;179:5793-802.

- Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*. 1988;9:387-93.
- Landmann S, Muhlethaler-Mottet A, Bernasconi L, Suter T, Waldburger JM, Masternak K, Arrighi JF, Hauser C, Fontana A, Reith W. Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med*. 2001;194:379-91.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201:233-40.
- Lappin DF, Birnie GD, Whaley K. Interferon-mediated transcriptional and post-transcriptional modulation of complement gene expression in human monocytes. *Eur J Biochem*. 1990;194:177-84.
- Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K. Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. *Biochem J*. 1992;281:437-42.
- Lappin DF, Whaley K. Interferon-induced transcriptional and post-transcriptional modulation of factor H and C4 binding-protein synthesis in human monocytes. *Biochem J*. 1990;271:767-72.
- Law SK, Levine RP. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:2701-705.
- Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP. Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J Immunol*. 1979;123:1388-94.
- Legoedec J, Gasque P, Jeanne JF, Fontaine M. Expression of the complement alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I. *Eur J Immunol*. 1995;25:3460-66.
- Li L, Masucci MG, Levitsky V. Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. *Scand J Immunol*. 2000;51:361-71.
- Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD, Song WC. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med*. 2005;201:567-77.
- Lo RK, Cheung H, Wong YH. Constitutively active G(alpha)16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK-and ERK-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278:52154-65.
- Luft T, Jefford M, Luetjens P, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol*. 2002;168:713-22.
- Luo X, Liu L, Tang N, Lu KQ, McCormick TS, Kang K, Cooper KD. Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Exp Dermatol*. 2005;14:303-10.
- Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol*. 1993;150:3755-65.
- Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol*. 2002;3:659-66.

- Marth T, Kelsall BL. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med.* 1997;185:1987-95.
- Martin BK. Transcriptional control of complement receptor gene expression. *Immunol Res.* 2007;39:146-59.
- 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;176:1497-502.
- Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002;296:298-300.
- Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med.* 1998;188:2313-20.
- Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 2006;442:39-44.
- Milligan G. G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol.* 2004;66:1-7.
- Mitchell TJ, Naughton M, Norsworthy P, Davies KA, Walport MJ, Morley BJ. IFN-gamma up-regulates expression of the complement components C3 and C4 by stabilization of mRNA. *J Immunol.* 1996;156:4429-34.
- Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappegard KT, Köhl J, Lambris JD. Essential role of the C5a receptor in and coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood.* 2002;100:1869-77.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Jr., Thomson AW. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood.* 2003;101:611-20.
- Morgan BP. *in* Morley BJ, Walport MJ. The complement facts book. Academic press. London. 2000;228p.
- Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol.* 1997;107:1-7.
- Morley BJ, Walport MJ. The complement facts book. Academic press. London. 2000;228p.
- Morris KM, Aden DP, Knowles BB, Colten HR. Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest.* 1982;70:906-13.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
- Moulton RA, Mashruwala MA, Smith AK, Lindsey DR, Wetsel RA, Haviland DL, Hunter RL, Jagannath C. Complement C5a anaphylatoxin is an innate determinant of dendritic cell-induced Th1 immunity to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *J Leukoc Biol.* 2007;82:956-67.
- Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha$  thymocytes in vivo. *Science.* 1990;250:1720-23.



- Nagasawa S, Stroud RM. Mechanism of action of the C3b inactivator: requirement for a high molecular weight cofactor (C3b-C4bINA cofactor) and production of a new C3b derivative (C3b'). *Immunochemistry*. 1977;14:749-56.
- Naik SH, Metcalf D, van NA, Wicks I, Wu L, O'keeffe M, Shortman K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol*. 2006;7:663-71.
- Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005;6:769-76.
- Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, van KC, Roos A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol*. 2004;173:3044-50.
- Navratil JS, Watkins SC, Wisnieski JJ, Ahearn JM. The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol*. 2001;66:3231-39.
- Ng SC, Sodetz JM. Biosynthesis of C8 by hepatocytes. Differential expression and intracellular association of the alpha-gamma- and beta-subunits. *J Immunol*. 1987;139:3021-27.
- Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, Takahashi TA. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol*. 2000;37:407-12.
- Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, Gerard C. C5L2, a Non-signaling C5A Binding Protein. *Biochemistry*. 2003;42:9406-15.
- Oshiumi H. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2: a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- $\beta$ . *J Biol Chem*. 2003;278:49751-62.
- Otto M, Hawlisch H, Monk PN, Müller M, Klos A, Karp CL, Köhl J. C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2: position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *J Biol Chem*. 2004;279:142-51.
- Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol*. 1984;7:163-92.
- Peng Q, Li K, Anderson K, Farrar CA, Lu B, Smith RA, Sacks SH, Zhou W. Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood*. 2008;111:2452-61.
- Peng Q, Li K, Patel H, Sacks SH, Zhou W. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J Immunol*. 2006;176:3330-41.
- Perry RP, La TJ, Kelley DE, Greenberg JR. On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochim Biophys Acta*. 1972;262:220-26.
- Petry F, Botto M, Holtappels R, Walport MJ, Loos M. Reconstitution of the complement function in C1q-deficient (C1qa<sup>-/-</sup>) mice with wild-type bone marrow cells. *J Immunol*. 2001;167:4033-37.
- Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, Di C, V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999;162:6473-81.

- Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med.* 2002;8:582-87.
- Ratajczak J, Reza R, Kucia M, Majka M, Allendorf DJ, Baran JT, Janowska-Wieczorek A, Wetsel RA, Ross GD, Ratajczak MZ. Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood.* 2004;103:2071-78.
- Reza R, Mastellos D, Majka M, Marquez L, Ratajczak J, Franchini S, Glodek A, Honczarenko M, Spruce LA, Janowska-Wieczorek A, Lambris JD, Ratajczak MZ. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood.* 2003;101:3784-93.
- Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res.* 2006a;55:179-84.
- Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology.* 2007;212:151-57.
- Reis ES, Nudelman V, Isaac L. Nonsense-codon-mediated decay in human hereditary complement C3 deficiency. *Immunogenetics.* 2004;55:667-73.
- Reis S, Falcao DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol.* 2006b;63:155-68.
- Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:793-806.
- Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1265-75.
- Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, Madin C, Moffatt B, Mokoena T, Gordon S, Sim RB. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J Exp Med.* 1988;168:1917-22.
- Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for complement proteins C3 and C4: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal.* 2004;18:1-8.
- Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity.* 2005;22:507-17.
- Rothman BL, Despins AW, Kreutzer DL. Cytokine regulation of C3 and C5 production by the human type II pneumocyte cell line, A549. *J Immunol.* 1990;145:592-98.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-52.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109-18.
- Sayah S, Jauneau AC, Patte C, Tonon MC, Vaudry H, Fontaine M. Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;112:53-60.

- Schmidt NW, Thieu VT, Mann BA, Ahyi AN, Kaplan MH. Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR-Induced IL-10 Production. *J Immunol.* 2006;177:7203-10.
- Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol.* 2002;169:2102-10.
- Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985;161:526-46.
- Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, Reis e Sousa. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000;13:453-62.
- Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol.* 1987;5:21-42.
- Schwartzberg PL, Finkelstein LD, Readinger JA. TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005.5:284-95.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci STKE.* 2005;2005:cm10.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:151-61.
- Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007.7:19-30.
- Sohn JH, Bora PS, Suk HJ, Molina H, Kaplan HJ, Bora NS. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med.* 2003;9:206-12.
- Soruri A, Kiafard Z, Dettmer C, Riggert J, Köhl J, Zwirner J. IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration in vivo. *J Immunol.* 2003a;170:3306-14.
- Soruri A, Riggert J, Schlott T, Kiafard Z, Dettmer C, Zwirner J. Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J Immunol.* 2003b;171:2631-36.
- Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A, Mantovani A. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol.* 1995;155:3292-95.
- Sporri R, Reis e Sousa. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* 2005;6:163-70.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137:1142-62.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-11.
- Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med.* 2003;198:913-23.

- Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD, Sandor M. Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *J Immunol.* 2003;170:788-94.
- Tack BF, Morris SC, Prahl JW. Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure. *Biochemistry.* 1979;18:1490-97.
- Takahara M, Kang K, Liu L, Yoshida Y, McCormick TS, Cooper KD. iC3b arrests monocytic cell differentiation into CD1c-expressing dendritic cell precursors: a mechanism for transiently decreased dendritic cells in vivo after human skin injury by ultraviolet B. *J Invest Dermatol.* 2003;120:802-9.
- Takahashi M, Mori S, Shigeta S, Fujita T. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol.* 2007;598:93-104.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16:3-9.
- Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med.* 1997;185:1619-27.
- Thomas ML, Janatova J, Gray WR, Tack BF. Third component of human complement: localization of the internal thiolester bond. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:1054-58.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:133-46.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003;19:641-44.
- Trouw LA, Nilsson SC, Goncalves I, Landberg G, Blom AM. C4b-binding protein binds to necrotic cells and DNA, limiting DNA release and inhibiting complement activation. *J Exp Med.* 2005;201:1937-48.
- Ulbrich AG, Florido MP, Nudelman V, Reis ES, Baracho GV, Isaac L. Hereditary human complement C3 deficiency owing to reduced levels of C3 mRNA. *Scand J Immunol.* 2001;53:622-26.
- Vegh Z, Goyarts EC, Rozengarten K, Mazumder A, Ghebrehiwet B. Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:345-57.
- Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, Shapira I, Hareuveni M, Ben-Tal O, Kutikov I, Gill O, Mevorach D. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med.* 2002;196:1553-61.
- Vik DP, Munoz-Canoves P, Kozono H, Martin LG, Tack BF, Chaplin DD. Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. *J Biol Chem.* 1990; 265:3193-201.
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 2000;164:2978-86.
- Vyse TJ, Morley BJ, Bartok I, Theodoridis EL, Davies KA, Webster AD, Walport MJ. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest.* 1996;97:925-33.

- Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001<sup>a</sup>;344:1140-44.
- Walport MJ. Review Articles: Advances in Immunology: Complement (First of Two Parts). *N Engl J Med*. 2001<sup>b</sup>;344:1058-66.
- Ward PA. Role of the complement in experimental sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008;83:467-70.
- Warren HB, Pantazis P, Davies PF. The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1987;129:9-13.
- Weijer K, Uittenbogaart CH, Voordouw A, Couwenberg F, Seppen J, Blom B, Vyth-Dreese FA, Spits H. Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood*. 2002;99:2752-59.
- Weinmann O, Gutzmer R, Zwirner J, Wittmann M, Langer K, Lisewski M, Mommert S, Kapp A, Werfel T. Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. *Immunology*. 2003;110:458-65.
- Wetsel RA, Lemons RS, Le Beau MM, Barnum SR, Noack D, Tack BF. Molecular analysis of human complement component C5: localization of the structural gene to chromosome 9. *Biochemistry*. 1988;27:1474-82.
- 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.
- White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM. Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem*. 1992;267:9210-13.
- Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 2007;26:741-50.
- Wulfing C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol*. 2002;3:42-47.
- Wurzner R. Modulation of complement membrane attack by local C7 synthesis. *Clin Exp Immunol*. 2000;121:8-10.
- Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman ME, III, Yi Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol*. 2005;33:564-72.
- Yamada M, Oritani K, Kaisho T, Ishikawa J, Yoshida H, Takahashi I, Kawamoto S, Ishida N, Ujiiie H, Masaie H, Botto M, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2004;34:221-30.
- Yamamoto M. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003a;301:640-43.
- Yamamoto M. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunol*. 2003b;4:1144-50.
- Yao Y, Xu Q, Kwon MJ, Matta R, Liu Y, Hong SC, Chang CH. ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J Immunol*. 2006;177:70-76.

Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science*. 1986;233:184-90.

Young JW, Szabolcs P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1995;182:1111-19.

Zhang X, Kimura Y, Fang C, Zhou L, Sfyroera G, Lambris JD, Wetsel RA, Miwa T, Song WC. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood*. 2007;110:228-36.

Zhou W, Peng Q, Li K, Sacks SH. Role of dendritic cell synthesis of complement in the allospecific T cell response. *Mol Immunol*. 2007;44:57-63.

Zidek Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw*. 1999;10:319-28.

Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G, Walker C. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med*. 2002;8:625-29.

## ANEXOS