Maria Isabel Mesquita Vendramini Delcolli

**Avaliação genética e imunológica de famílias com deficiências
nos componentes C3 ou Fator I do Sistema Complemento e a
influência dessas deficiências na expressão gênica de
fibroblastos de pele humana**

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

São Paulo
2012

Maria Isabel Mesquita Vendramini Delcolli

**Avaliação genética e imunológica de famílias com deficiências
nos componentes C3 ou Fator I do Sistema Complemento e a
influência dessas deficiências na expressão gênica de
fibroblastos de pele humana**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2012

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

Delcolli, Maria Isabel Mesquita Vendramini.

Avaliação genética e imunológica de famílias com deficiências nos componentes C3 ou Fator I do Sistema Complemento e a influência dessas deficiências na expressão gênica de fibroblastos de pele humana / Maria Isabel Mesquita Vendramini Delcolli. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Lourdes Isaac.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências do sistema complemento.

Versão do título para o inglês: Genetic and immunologic avaliation of families with deficiencies on C3 or Factor I components of Complement System and influency of this deficiencies on gene expression of human skin fibroblasts.

1. Sistema complemento 2. C3 3. Fator I 4. Expressão gênica 5. Imunodeficiências 6. Microarranjos de cDNA I. Isaac, Profa. Dra. Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB077/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Isabel Mesquita Vendramini Delcolli.

Título da Tese: Avaliação genética e imunológica de famílias com deficiências nos componentes C3 ou Fator I do Sistema Complemento e a influência dessas deficiências na expressão gênica de fibroblastos de pele humana.

Orientador(a): Profa. Dra. 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) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 07 de março de 2006.

PARECER 690/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quinquagésima nona reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Expressão gênica comparativa dependente do componente C3 ou de fator 1 do sistema complemento em fibroblastos humanos"*.

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.
MARIA ISABEL MESQUITA VENDRAMINI
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

*Aos meus pais Antonio e Maria da Graça,
que sem entender minha opção de trajetória profissional,
me apoiaram incondicionalmente.*

*Ao meu marido Edmur Primo,
Obrigada pela companhia e pela luta.
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Lourdes Isaac** que permitiu a realização de um sonho e minha satisfação acadêmica, apesar de nossas discussões e diferenças. Muito obrigada!

À querida **Marlene Pereira de Carvalho Florido**, sem suas sábias palavras e seu apoio eu não finalizaria este trabalho. Se em todos os laboratórios tivessem uma Má, o dia a dia seria muito mais produtivo e motivador. Nossos cafés da manhã eram momentos especiais!

Às minhas “irmãs” mais velhas **Edimara da Silva Reis**, **Dayseanne de Araújo Falcão** e **Mariane Tami Amano**, que tanto ensinaram àquela professora que queria sair da sala de aula e voltar ao laboratório. Além disso, grandes amigas que quero levar para a vida toda.

Ao meu primeiro orientando, **Renan Antonialli**. Um grande amigo que fará muita falta nos mais diversos momentos. Nossas andanças USP-ABC deixaram muitas saudades. Obrigada por tornar-se meu braço direito quando eu mais precisava. Parte deste trabalho é seu!

Aos pacientes e seus pais, que forneceram o material necessário para a realização deste trabalho. Eu não tenho palavras para demonstrar minha gratidão e respeito por vocês!

Ao meu irmão, **Rodolfo Luiz**, nossa relação me fez forte, corajosa, determinada e guerreira. Muito obrigada por tornar minha vida mais divertida!

Aos demais colegas do Laboratório de Complemento: **Priscilia**, **Caroline**, **Arthur**, **Fabio**, **Aldacilene**, **José Antonio**, **Lorena**, **Juliana**, **Mônica**, **Adriana** e **Tatiana**. Obrigada!

Às pesquisadoras do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan Dra. **Angela Silva Barbosa** e Dra. **Patrícia Antônia Estima de Abreu Aniz**, que sempre mantiveram as portas de seu laboratório abertas para a realização de experimentos e seus valiosos ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelas discussões, aulas e conhecimentos que pudemos compartilhar.

Aos secretários da Pós-Graduação, sempre atenciosos e prontos a socorrer uma pós-graduanda desesperada: **Jotelma**, **Amarildo** (*in memoriam*), **Thiago** e **Maria Eny**. Especialmente à querida **Maria Eny**, prestativa e boa ouvinte. Sempre com uma palavra amiga em um momento de desânimo.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sempre dispostos a auxiliar e socorrer os alunos em seus momentos de desespero e necessidade de materiais.

À amiga, desde a Graduação até a Pós-Graduação, uma das principais responsáveis por eu ter chegado a este departamento, **Clara Maciel Cavalcanti**. Dona Clara, obrigada por tudo!!!

Aos membros da banca do meu Exame de Qualificação: Prof. Dr. **José Alexandre Marzagão Barbuto**, Dr. **Marcelo de Franco** e Dra. **Cristina Miuki Abe Jacob**. Obrigada pelas valiosas sugestões e pela análise crítica que fizeram do meu trabalho.

Às amigadas que foram negligenciadas ao longo de todo o doutorado, mas que mesmo assim torciam por meu sucesso e pela realização de um bom trabalho. Desculpem-me pelos momentos que estive ausente ou distante, vocês não foram esquecidos. Quero especialmente lembrar: **Simone Kohagura**, **Ana Gabriela Mesquita**, **Marcelo Lodi**, **Cristiane Zia Lodi**, **Miguel Lodi Júnior**, **Ana Carolina Vendrasco** e **Patrícia Mustafá Coppio**.

Aos amigos da UFABC, **Marcella Santos de Abreu** e **Allan Moreira Xavier**, nosso encontro não foi por acaso, tinha propósito e intenções. Nascerão uma dissertação e duas teses dessa amizade e do apoio que oferecemos um ao outro. Obrigada, amigãozões!

À CAPES pela bolsa que permitiu minha dedicação exclusiva durante grande parte do projeto. Assim como à FAPESP e ao CNPq pelas verbas destinadas ao Laboratório de Complemento.

A todos que de alguma forma participaram deste processo e que auxiliam em minha caminhada ao longo desse período.

Assim se cria por etapas uma formação que, a partir da singularidade histórica do pensamento (a descoberta) se transforma, justamente em virtude da particularidade das forças coletivas do pensamento, em um conhecimento que se repete inevitavelmente e que, portanto, apresenta-se como objetivo e real.

(Ludwik Fleck, 1935)

RESUMO

Delcolli MIMV. Avaliação genética e imunológica de famílias com deficiências nos componentes C3 ou Fator I do Sistema Complemento e a influência dessas deficiências na expressão gênica de fibroblastos de pele humana. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Avaliamos as causas moleculares da deficiência de C3 ou de FI em 07 pacientes, chegando a caracterizar a causa molecular em cinco deles. As mutações encontradas em cada um dos pacientes foram: C3def3 - C364G troca Arg102Gly; G2481C (Val807); A4956G (Val1632); FIdef2 - G693A, troca Gly162Asp; FIdef3 e -4 - C767T, troca Arg187Stop; FIdef6 e -7 - Inserção 1382ΔAT, códon de parada prematura 13 bases a montante. Além disso, analisamos se a ausência dessas proteínas levava a alterações na expressão gênica em fibroblastos de pele de pacientes deficientes de C3 ou de FI em relação a indivíduos normais e saudáveis através de ensaios com microarranjos de cDNA. Confirmamos uma tendência à alteração da expressão através de PCR em tempo real dos genes CHNRB1, CAV1, PSMB1, PI4K2B e MASP1 nos deficientes de C3; dos genes SPRY2, PSMA5, PGM2L1, GOLPH3 e JAKMIP3 nos deficientes de FI e o gene ETV6 nos dois grupos de pacientes. Dessa forma, podemos sugerir que deficiências das proteínas C3 e FI podem possivelmente influenciar a expressão de outros genes neste tipo de célula.

Palavras-chave: Sistema Complemento. C3. Fator I. Expressão gênica. Imunodeficiências. Microarranjos de cDNA.

ABSTRACT

Delcolli MIMV. Genetic and immunologic evaluation of families with deficiencies on C3 or Factor I components of Complement System and influence of this deficiencies on gene expression of human skin fibroblasts. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

We investigated C3 and Factor I deficiency in 07 patients and could characterize the molecular basis in five of them. The mutations found were: C3def3 - C364G change Arg102Gly; G2481C (Val807); A4956G (Val1632); F1def2 - G693A, change Gly162Asp; F1def3 e -4 - C767T, change Arg187Stop; F1def6 e -7 - insertion 1382 Δ AT, Stop codon generation after 13 bp. Furthermore, we analyzed if the absence of these proteins cause alterations in gene expression profiles in skin fibroblasts from C3 and FI deficient compared to fibroblasts from normal individuals by cDNA microarrays. We confirmed a tendency of altered gene expression by Real Time PCR atCHNRB1, CAV1, PSMB1, PI4K2B and MASP1 genes on C3 deficient, SPRY2, PSMA5, PGM2L1, GOLPH3 and JAKMIP3 on FI deficient and ETV6 gene in both groups. Thus, we concluded that C3 and FI deficiencies could affect gene expression profiles in skin fibroblasts.

Key words: Complement system. C3. Factor I. Gene expression. Immunodeficiency. cDNA microarrays.

LISTA DE ABREVIATURAS

aHUS – Síndrome Hemolítico-Urêmica atípica
B-test – bayesiana empírica
C3def – deficiente de C3
C3bBb – C3 convertase da via alternativa
C4b2a – C3 convertase da via clássica
C4b2a3b – C5 convertase da via clássica
C4BP – proteína ligante de C4b
CR – receptor do complemento
CT – limiar de ciclo
DAF – fator de aceleração do decaimento
DMEM – *“Dulbecco’s modification of eagle’s medium”*
ELISA – *“enzyme-linked immuno sorbent assay”*
FB – Fator B
FD – Fator D
FH – Fator H
FI – Fator I
F1def – deficiente de FI
FITC – isotiocianato de fluoresceína
FP – properdina
HEPES – *“hepes sodium salt”*
LPS – lipopolissacarídeo
MAC – complexo de ataque à membrana
MAD – *“median absolute deviation”*
MASP – serino protease associada à MBL
MBL – lectina ligante de manose
MCP – proteína de membrana com atividade de cofator
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
PBS – salina tamponada de fosfato
PBST – salina tamponada de fosfato com Tween 20
PCR – *“polymerase chain reaction”*

RT-PCR – *“reverse transcriptase – polymerase chain reaction”*

SBFi – soro bovino fetal inativado pelo calor

SC – sistema complemento

SI – sistema imune

SHN – soro humano normal

TA – temperatura ambiente

VBS – solução tamponada de veronal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de ativação do SC através da via alternativa.....	24
Figura 2 – Esquema de ativação do SC através da via clássica.	25
Figura 3 – Esquema de ativação do SC através da via das lectinas.....	26
Figura 4 – Esquema representando as sucessivas clivagens pelas quais a molécula C3 passa ao longo de seu processo de ativação e posteriormente de inativação.	32
Figura 5 – Esquema representando as sucessivas clivagens pelas quais a molécula C4 passa ao longo de seu processo de ativação e de inativação.	33
Figura 6 – Esquema apresentando o gene <i>CFI</i> , seus éxons e íntrons, e correlação de cada éxon com um domínio da proteína.	35
Figura 7 – Presença de C3 no soro do paciente analisada por Western Blotting.	69
Figura 8 – Perfil de C3 após incubação com soro do paciente.....	70
Figura 9 – Produtos de RT-PCR que cobrem todo o cDNA de <i>C3</i> do paciente e do indivíduo normal onde não foram observadas diferenças de tamanho e intensidade.....	71
Figura 10 – Eletroferogramas das reações de sequenciamento do cDNA do paciente <i>C3def3</i> apresentando as regiões que possuem alterações em relação ao indivíduo normal.	72
Figura 11 – Marcação para C3 em fibroblastos de pele evidenciada por microscopia confocal de varredura a laser.....	73
Figura 12 – Produtos de RT-PCR amplificados do cDNA do paciente <i>Fldef2</i> (P) e do indivíduo normal (C).....	77
Figura 13 – Eletroferograma da reação de sequenciamento do cDNA de <i>CFI</i> do paciente <i>Fldef2</i> apresentando a troca G ⁶⁹³ A em vermelho, o que implicaria na substituição do códon para Gly para um códon para Asp. A mesma alteração foi confirmada na fita complementar 3'-5'.	78
Figura 14 – Eletroferogramas das reações de sequenciamento de nucleotídeos do gene <i>CFI</i>	79
Figura 15 – Análise por <i>Western Blot</i> para detecção de FI no soro do paciente <i>Fldef2</i> e de seus pais em condições não redutoras.	80
Figura 16 – Localização intracelular de FI em fibroblastos de pele de <i>Fldef2</i> e de indivíduo normal.	81

Figura 17 – Eletroferograma da reação de sequenciamento do cDNA de <i>CFI</i> da paciente F1def3 apresentando a troca C ⁷⁶⁷ T. O mesmo padrão foi observado para a paciente F1def4.	84
Figura 18 – Western Blot para detecção de FI no soro dos pacientes F1def3 e F1def4.	85
Figura 19 – Western Blot para avaliar a presença de FI no soro do paciente F1def5 em condições não-redutoras.	87
Figura 20 – Trecho da sequência de cDNA de <i>CFI</i> em indivíduos normais e nos pacientes F1def6 e F1def7 onde está presente a inserção encontrada, a numeração dos nucleotídeos se fez de acordo com a sequência NM_000204.3 (GenBank).	90
Figura 21 – Eletroferogramas originados nas reações de sequenciamento do segmento de <i>CFI</i> referente ao éxon 11 e sua adjacência.	90
Figura 22 – Western <i>Blot</i> para avaliar a presença de FI no soro dos pacientes F1def6 e F1def7 em condições não redutoras.	91
Figura 23 – Perfil de genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de C3 em comparação com indivíduos controle. Todos os genes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram aqui representados.	93
Figura 24 – Perfil de genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de FI em comparação com indivíduos controle. Todos os genes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram aqui representados.	95
Figura 25 – Nível de expressão dos produtos gênicos <i>CHNRB1</i> , <i>CAV1</i> , <i>PSMB1</i> e <i>PI4K2B</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 e em indivíduos normais avaliados por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.	100
Figura 26 – Nível de expressão do produto gênico <i>MASP1</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita. .	101
Figura 27 – Nível de expressão do produto gênico <i>ETV6</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 ou de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.	101

Figura 28 – Nível de expressão do produto gênico <i>SPRY2</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita. .	102
Figura 29 – Nível de expressão do produto gênico <i>PSMA5</i> e <i>PGM2L1</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.	103
Figura 30 – Nível de expressão do produto gênico <i>C10orf39 – JAKMIP3</i> em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Códigos e iniciais dos pacientes estudados neste trabalho, alterações encontradas nos genes estudados e bibliografia relacionada aos pacientes.....	44
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e RT-PCR.	51
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....	59
Tabela 4 – Concentração das proteínas do complemento nos soros da família de C3def3 por Mancini e ELISA.....	66
Tabela 5 – Atividade hemolítica em soros dos membros da família de C3def3 pelo método realizado em placas de agarose.	68
Tabela 6 – Concentração das proteínas do complemento nos soros da família de F1def2 por Mancini e ELISA.	74
Tabela 7 – Atividade hemolítica em soros dos membros da família de F1def2 pelo método de CH50 e AP50.	76
Tabela 8 – Atividade hemolítica dependente de complemento e concentração sérica de FI no soro das pacientes F1def3 e F1def4.	82
Tabela 9 – Concentração de algumas proteínas do SC no soro do paciente F1def5 por Mancini e ensaio hemolítico em tubos.....	86
Tabela 10 – Concentração de diferentes proteínas do SC no soro dos pacientes F1def6 e F1def7 por Mancini e ensaio hemolítico realizado em tubos.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Quadro com os genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de C3 em comparação com indivíduos controle.....	94
Quadro 2 – Quadro com os genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de FI em comparação com indivíduos controle normais.....	96
Quadro 3 – Genes diferentemente expressos nas células dos pacientes deficientes de C3 ou FI que foram utilizados nos experimentos de validação de resultados.....	98
Quadro 4 – Quadro com as alterações moleculares encontradas nos pacientes-alvo deste estudo.....	118

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Ativação do SC.....	23
1.2 Funções biológicas do SC	27
1.2.1 <i>Lise celular</i>	28
1.2.2 <i>Opsonização</i>	28
1.2.3 <i>Geração de fatores quimiotáticos e anafilatoxinas</i>	28
1.2.4 <i>Solubilização e remoção de imunocomplexos</i>	29
1.2.5 <i>Ativação de linfócitos B</i>	29
1.2.6 <i>Remoção de células apoptóticas</i>	30
1.3 A proteína central do SC: C3	30
1.4 Regulação da ativação do SC	31
1.5 A proteína reguladora Fator I	34
1.6 Deficiências de componentes do SC	36
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Coleta de amostras dos pacientes e de indivíduos normais.....	43
3.2 Casuística.....	43
3.2.1 <i>C3def1</i>	44
3.2.2 <i>C3def2</i>	45
3.2.3 <i>C3def3</i>	45
3.2.4 <i>F1def1</i>	46
3.2.5 <i>F1def2</i>	46
3.2.6 <i>F1def3 e F1def4</i>	46
3.2.7 <i>F1def5</i>	47
3.2.8 <i>F1def6 e F1def7</i>	47
3.2.9 <i>Indivíduos normais</i>	48
3.3 Cultura celular	48
3.4 Extração de RNA a partir de células em cultura	49
3.5 Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase [<i>Reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i> (RT-PCR)]	49
3.6 Extração de DNA	52
3.7 Reação em cadeia da polimerase [<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)]	52

3.8 Purificação de Produtos de PCR e RT-PCR.....	53
3.9 Sequenciamento de nucleotídeos	53
3.10 Análise de fibroblastos por microscopia confocal de varredura a laser	53
3.11 Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i>	54
3.12 Preparo dos microarranjos de cDNA	55
3.12.1 Linhagens celulares para obtenção de RNA de referência	55
3.12.2 Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose sob condições desnaturantes	55
3.12.3 Clones da biblioteca de cDNA humana (IMAGE).....	56
3.12.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR) a partir de material obtido de colônias de <i>bactérias</i>	56
3.12.5 Purificação dos produtos de PCR	57
3.12.6 Preparação dos cDNA microarranjos em lâminas de vidro	57
3.12.7 Análise de Dados.....	57
3.13 Anticorpos utilizados.....	58
3.14 PCR em tempo real.....	58
3.15 Atividade hemolítica mediada pelo SC	59
3.15.1 Ensaio hemolítico para via clássica (CH50)	60
3.15.2 Ensaio hemolítico para via alternativa (AP50)	60
3.15.3 Atividade hemolítica mediada pela via clássica em placa de agarose.....	61
3.15.4 Atividade hemolítica mediada pela via alternativa em placa de agarose	62
3.16 Imunodifusão radial	62
3.17 ELISA (<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>) para FI.....	63
3.18 ELISA para C3	63
3.19 Obtenção e concentração das amostras de sobrenadante de cultura e de lisados celulares ...	64
4 RESULTADOS	65
4.1 Avaliação da Imunodeficiência de C3 no paciente C3def3.....	66
4.1.1 Paciente C3def3	66
4.2 Avaliação da Imunodeficiência de FI nos pacientes F1def2, F1def3, F1def4, F1def5, F1def6 e F1def7	74
4.2.1 Paciente F1def2	74
4.2.2 Pacientes F1def3 e F1def4	82
4.2.3 Paciente F1def5	85
4.2.4 Pacientes F1def6 e F1def7	88
4.3 Análise da expressão gênica dependente de C3 ou FI em fibroblastos de pele utilizando material dos pacientes deficientes de C3 ou de CFI.....	92

4.3.1 Microarranjos de cDNA	92
5 DISCUSSÃO	105
6 CONCLUSÕES	118
6.1 Paciente C3def3	118
6.2 Avaliação da Imunodeficiência de FI nos pacientes F1def2, F1def3, F1def4, F1def5, F1def6 e F1def7	118
6.3 Análise da expressão gênica dependente de C3 ou FI em fibroblastos de pele utilizando material dos pacientes deficientes de C3 ou de CFI.....	119
REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Complemento (SC) foi primeiramente descrito por George Henry Falkiner Nutall, em 1888, como um componente bacteriolítico do sangue (Silverstein, 1989). Em 1899, Buchner identificou um componente do soro que era termo-sensível e que complementava a ação dos anticorpos (Morley e Walport, 2000); neste mesmo ano Ehrlich nomeou este componente de complemento (Silverstein, 1989). O primeiro trabalho descrevendo a fixação do complemento e quantificando sua ação na lise celular foi apresentado por Bordet e Gengou em 1909 e rendeu a Bordet o crédito pelo descobrimento desse sistema (Morley e Walport, 2000; Silverstein, 1989). Esse sistema é constituinte importante tanto da imunidade inata como da imunidade adquirida, sendo responsável pela primeira defesa contra microorganismos patogênicos, assim como pela geração de elementos durante sua ativação que influenciaram a maturação e ativação de linfócitos B e T (Dunkelberger e Song, 2010).

Diferentemente do conhecido, os produtos da ativação do SC não apenas participam da imunidade inata, mas influenciam também a maturação, ativação e manutenção de células da imunidade adquirida. Atualmente não podemos pensar em um sistema biológico que não tenha interação com os demais, no qual não aconteça compartilhamento de moléculas, com as mesmas funções ou com funções distintas. O SC não é importante apenas para a proteção contra infecções, mas também na preservação da homeostase imunológica, com a manutenção de diversos mecanismos, como regulação gênica, percepção de células próprias alteradas e modulação de processos inflamatórios (Skattum et al., 2011).

O SC é constituído por mais de 30 proteínas, tanto solúveis quanto ligadas à membrana de células (Walport, 2001). Há componentes responsáveis pela ativação do sistema sobre superfícies susceptíveis, tais como microorganismos, células próprias alteradas, corpúsculos apoptóticos, etc. Também são encontrados componentes responsáveis pela regulação da ativação, tanto na forma solúvel como sobre superfícies próprias intactas.

O SC é considerado um dos mais antigos participantes do sistema imune (SI) representado por moléculas em organismos dos diferentes filos animais desde Cnidaria. Além disso, é interessante salientar que os primeiros componentes a surgirem foram aqueles comuns a todas as vias do SC, seguidos daqueles que fazem parte da via alternativa,

sendo que os componentes das vias das lectinas e clássica somente são encontrados a partir de Urochordata (Tunicados), ou seja, muito próximo do aparecimento da Imunidade Adaptativa junto com os Chondrichthyes (Endo et al., 2006; Fujita, 2002, 2004a, b; Nonaka e Kimura, 2006).

1.1 Ativação do SC

A ativação do SC ocorre através de 3 vias – alternativa, clássica e das lectinas - que culminam em uma via terminal comum que leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Em todas as vias há geração de anafilatoxinas, C3a e C5a, que são importantes no recrutamento de células do SI e auxiliam na resolução da situação de perigo que levou à ativação do SC.

A via alternativa (Figura 1) foi proposta como uma forma de ativação do SC independente da presença de anticorpos com a ligação e ativação de C3 nas paredes celulares de leveduras (Pillemer et al., 1954). A via alternativa inicia-se com a hidrólise da ligação tiól-éster da molécula de C3, gerando C3(H₂O) que é capaz de ligar-se ao Fator B (FB) que, por ação de Fator D (FD), é clivado em Ba e Bb, sendo que este último permanece ligado a C3(H₂O) gerando a primeira C3-convertase da via alternativa C3(H₂O)Bb, capaz de clivar C3 em C3a e C3b na presença de Mg²⁺. Em seguida a molécula C3 é clivada dando origem a C3a e C3b, esta última com a capacidade para ligar-se a FB o qual novamente por ação de FD é clivado em Ba e Bb, ficando Bb ligado a C3b gerando a segunda C3-convertase da via alternativa, C3bBb, que também depende da presença de Mg²⁺ para clivar C3 em C3a e C3b. Esta etapa também é conhecida como alça de amplificação da ativação da via alternativa.

Alguns fragmentos de C3b podem ligar-se a C3bBb, originando o complexo C3bBb3b com atividade de C5-convertase. Esta enzima clivará C5, gerando os fragmentos C5a e C5b. C5b liga-se a C6, formando um complexo C5b6 estável. C7 liga-se ao complexo C5b6, formando o complexo C5b67. C8 liga-se ao complexo C5b67, formando o complexo C5b678 que já possui atividade de lise celular. Ao complexo C5b678 ligam-se diversas moléculas de

C9, gerando o complexo $C5b6789_n$, também conhecido como MAC (*membrane attack complex*), que apresenta grande capacidade de lise celular (Müller-Eberhard, 1986).

Figura 1 – Esquema de ativação do SC através da via alternativa.

Via Alternativa

Hidrólise da ligação tiol-éster de C3

FONTE: Delcolli, 2012.

Outra forma de ativação do SC é através da via clássica (Figura 2), que recebe este nome por ter sido a primeira via de ativação do SC a ser descrita. A ativação dessa via depende, geralmente, da ligação de C1, na presença de Ca^{2+} , a anticorpos IgM ou IgG ligados especificamente a antígenos.

O complexo C1 é composto pelas subunidades C1q, C1r₂ e C1s₂ e se mantém na presença de Ca^{2+} (Lepow et al., 1963; Gigli et al., 1976). C1q ligado a anticorpos ligados à superfície de patógenos sofre mudanças conformacionais que levam à ativação da proteína C1r, a qual por sua vez ativa C1s. Este último cliva C4 em C4a e C4b. C4b liga-se a C2 que é clivado por C1s em C2a e C2b. O complexo C4b2a é a C3-convertase da via clássica, agindo

sobre C3 gerando C3a e C3b. A C5-convertase da via clássica é o complexo C4b2a3b. Também ocorre a formação de C5a e C5b sendo que este último fará parte do MAC, conforme descrito anteriormente.

Figura 2 – Esquema de ativação do SC através da via clássica.

Via Clássica

Anticorpos ligados à superfície de antígenos

FONTE: Delcolli, 2012.

Outra forma de ativação do SC é através da via das lectinas (Figura 3), que é bastante semelhante à via clássica, pois há participação de proteínas e etapas em comum. Nesta via, MBL (*mannose binding lectin* - lectina ligante de manose), assim como outras lectinas, tais como as ficolinas e glicanas, liga-se a açúcares presentes na superfície de patógenos. Após essa ligação, ocorrem alterações conformacionais em MBL que levam à autólise de MASP-1 (*MBL-associated serine protease-1* - serino protease associada à MBL) e MASP-2 que é a enzima responsável pela ativação da via. O complexo MBL-MASP-2 é capaz de levar à ativação da via, sem a necessidade de MASP-1 (Vorup-Jensen et al., 2000). MASP-2

analogamente a C1s é capaz de clivar C4 em C4a e C4b, C4b liga-se a C2 que é clivado por C1s em C2a e C2b, C4b2a permanecem ligados formando a C3-convertase da via das lectinas. Esta agirá sobre C3 clivando-o em C3a e C3b o qual permanecerá ligado a C4b2a originando a C5-convertase da via das lectinas, C4b2a3b. Esta convertase atuará sobre C5 gerando C5a e C5b que dará continuidade à ativação do SC através do MAC.

Figura 3 – Esquema de ativação do SC através da via das lectinas.

FONTE: Delcolli, 2012.

Apesar das diferenças observadas nas vias de ativação do SC, há muitas similaridades entre as proteínas que fazem parte de cada uma das vias. As proteínas C3 e C4 são bastante semelhantes entre si e possuem um sítio de ativação bastante raro formado pela ligação tiol-éster presente nessas proteínas e em $\alpha 2$ -macroglobulina (de Bruijn e Fey, 1985). Esta região é responsável pela ligação covalente de C3b e C4b na superfície de ativação do sistema.

Além disso, as moléculas C2 e FB são homólogas e também apresentam atividades semelhantes (Bentley e Porter, 1984). Seus respectivos genes encontram-se em uma mesma região do cromossomo 6 na posição p21 no *cluster* do MHC. Também são exemplo de moléculas homólogas C1r e C1s localizadas no cromossomo 12 na posição p13 (Nguyen et al., 1988) e seus produtos proteicos apresentam atividade de esterase.

Durante a ativação do SC são gerados uma gama de pequenos fragmentos peptídicos, como C2b, C3a, C4a, C5a, Ba. Para os fragmentos C3a e C5a são conhecidas uma série de funções biológicas, como anafilatoxinas, como participantes dos processos de maturação/ativação de células B, T e células dendríticas (Li et al., 2012; Reis et al., 2007).

O desenvolvimento de diversas doenças tem sido relacionado com alterações no SC, observadas tanto na concentração das proteínas, como no controle da ativação e na funcionalidade do sistema como um todo. Alguns exemplos de doenças cuja patogênese depende do SC são a síndrome hemolítico-urêmica atípica; a glomerulonefrite membranoproliferativa, pré-eclampsia e lúpus eritematoso sistêmico.

Entre os possíveis biomarcadores para o prognóstico do desenvolvimento de pré-eclampsia estão o aumento na circulação de MBL (Than et al., 2008), proteína C reativa (CRP), C4d, C3a e SC5b9 e diminuição de C3 (Derzsy et al., 2010) em relação a mulheres com gestações normais. Aparentemente há desenvolvimento de um quadro pró-inflamatório em mulheres que apresentarão complicações durante a gravidez relacionada à pré-eclampsia, entretanto, não é um fator determinante de sua ocorrência (Ramma e Ahmed, 2011).

1.2 Funções biológicas do SC

Entre as principais funções biológicas dependentes do SC citamos: capacidade de lise celular, opsonização, geração de fatores quimiotáticos e anafilatoxinas, capacidade de solubilização e remoção de imunocomplexos, ativação de linfócitos B, remoção de células apoptóticas.

1.2.1 Lise celular

A lise celular dependente da ativação do SC depende da formação do complexo C5b6789_n sobre superfícies celulares. Sabe-se que o complexo C5b678 já possui capacidade para formação de pequenos poros na superfície celular (Tamura et al., 1972). No entanto, com a formação do MAC pela agregação de moléculas de C9 são gerados poros transmembrânicos na membrana plasmática das células que levam à sua lise por desequilíbrio osmótico (Young et al., 1986).

Também foi demonstrado que concentrações sublíticas do MAC na superfície celular levam à ativação celular, evidenciada pelo influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular e sua redistribuição para os compartimentos intracelulares (Morgan e Campbell, 1985).

1.2.2 Opsonização

O fragmento C3b e o fragmento C4b gerados através da ativação pelas vias clássica e das lectinas permanecem ligados à superfície dos patógenos e podem ligar-se a CR1, assim como iC3b pode ligar-se a CR3 e CR4. Estas ligações, em conjunto com o reconhecimento de IgG associada à superfície do patógenos pelo receptor Fc, aumentam a taxa de fagocitose (Lambris, 1988). Foi descrito um segundo receptor para C3b, CR1g, em macrófagos humanos e células de Kupffer de camundogongos (Helmy et al., 2006).

Também C1q (Malhotra et al., 1994) e MBL (Kuhlman et al., 1989) podem atuar como opsoninas, sendo reconhecidas pelo receptor C1qR presente na superfície dos fagócitos.

1.2.3 Geração de fatores quimiotáticos e anafilatoxinas

Os fragmentos C3a, C4a e C5a são reconhecidos como anafilatoxinas por sua capacidade de estimular a desgranulação de basófilos (Kretzschmar et al., 1993) e mastócitos (El-Lati et al., 1994), levando à liberação de mediadores inflamatórios, como histamina entre outros.

Além disso, os fragmentos C3a e C5a também induzem a produção de espécies reativas de oxigênio em diversos tipos celulares como macrófagos (Murakami et al., 1993),

eosinófilos e neutrófilos (Elsner et al., 1994a, b). C5a também atua como quimiotático para basófilos (Lett-Brown e Leonard, 1977), macrófagos (Aksamit et al., 1981), neutrófilos (Ehrenguber et al., 1994), linfócitos B ativados (Ottonello et al., 1999) e linfócitos T (Nataf et al., 1999).

1.2.4 Solubilização e remoção de imunocomplexos

Imunocomplexos podem se formar na circulação em função de uma resposta humoral exacerbada e uma vez depositado sobre os tecidos podem ocasionar lesões. Sendo assim, é fundamental sua solubilização ou retirada da corrente sanguínea. Demonstrou-se que C3b é capaz de ligar-se a esses complexos promovendo sua solubilização e prevenindo sua deposição sobre os tecidos (Fujita et al., 1977).

Sabe-se que a retirada dos complexos imunes da circulação é promovida por eritrócitos por meio da ligação de CR1 aos fragmentos C3b depositados sobre os complexos. Então os imunocomplexos são transportados até o fígado e o baço, onde são removidos da superfície dos eritrócitos pela ação de fagócitos residentes (Medof et al., 1983).

1.2.5 Ativação de linfócitos B

Pepys (1974) demonstrou que a presença de C3 era importante para a produção de anticorpos. No ano seguinte, Papamichail et al. (1975) observaram que animais depletados de complemento com a aplicação de fator de veneno de cobra tinham uma resposta de anticorpos a antígenos T-dependentes suprimida, assim como na geração de linfócitos B de memória nos centros germinativos.

Demonstrou-se que a ligação conjunta de antígenos à IgM de membrana dos linfócitos B e de C3d/dg aos seu receptor CR2 e à CD19 é capaz de reduzir o limiar de ativação dessas células, assim como aumentar sua capacidade de apresentação de antígenos a linfócitos T (Carter e Fearon, 1992; Cherukuri et al., 2001; Dempsey et al., 1996). Em contrapartida, Lee et al. (2005) demonstraram que a ação de estímulo ou repressão dos

linfócitos B por parte da molécula C3d é dependente da concentração e natureza do antígeno.

1.2.6 Remoção de células apoptóticas

C1q é capaz de ligar-se a superfície de vesículas de queratinócitos apoptóticos (Korb e Ahearn, 1997), participando da remoção de auto antígenos da circulação. Posteriormente, observou-se que há uma hierarquia entre os componentes da via clássica na remoção de células apoptóticas, sendo que hierarquicamente C1q é a proteína mais importante para esta função seguido por C4 (Taylor et al., 2000).

Além disso, notou-se a participação de C3 na remoção de células apoptóticas, uma vez que o bloqueio dos receptores CR3 e CR4 causava prejuízo da atividade fagocítica de macrófagos sobre os corpúsculos apoptóticos (Mevorach et al., 1998).

1.3 A proteína central do SC: C3

Assim como outras proteínas do SC, observou-se a presença de moléculas semelhantes a C3 em outros grupos animais que não Chordata, em uma análise proteômica com ouriços do mar da espécie *Heliocidaris erythrogramma* observou-se a síntese de C3 48 h após os animais serem desafiados com LPS intraperitonalmente e também observou-se a síntese constitutiva de proteínas *scavenger receptor cysteine rich*, ou seja, proteínas que apresentam semelhança com um dos domínios presente na molécula fator I (FI) (Dheilly et al., 2012).

Apesar do interesse no estudo da evolução do SC nos mais diversos grupos animais, destacamos algumas características da molécula C3 e do gene C3 humanos.

A proteína C3 é aquela para qual convergem todas as vias de ativação do SC, sendo o componente central de ativação do sistema. Está presente em soro de indivíduos normais adultos na concentração de 1,0 a 1,5 mg/ml. C3 é formada por duas cadeias α e β com, respectivamente, 115 e 70 kDa que estão unidas por duas pontes dissulfeto.

O gene C3 está localizado no cromossomo 19 na posição p13.3-13.2 compreendendo 41 kb. Ele possui 41 éxons sendo que os 16 primeiros codificam a cadeia β e os demais codificam a cadeia α (Fong et al., 1990). Esta proteína é sintetizada como uma pro-proteína em uma cadeia com 185 kDa, que após a clivagem libera o peptídeo sinal e também ocorre a separação das duas cadeias presentes na proteína madura (De Bruijn e Fey, 1985). Além disso, ocorre a formação da ligação tiol-éster na cadeia α antes da secreção da proteína (Law et al., 1979).

A ativação proteolítica de C3 pode acontecer por meio de qualquer um das C3-convertases originadas durante a ativação do SC com a geração de C3a e C3b (Figura 4). C3b é capaz de ligar-se a outros componentes do SC como C5, fator D (FD), properdina, fator H (FH), FB, FI, CR1 e proteína cofatora de membrana (MCP) (Lambris, 1988). A ligação com estas diferentes proteínas é importante para o desempenho de diferentes funções por parte de C3b, como amplificação da via alternativa – pela ligação com FB, FP e FD, formação do MAC – pela ligação a C5, e sua inativação – pela ligação com FI na presença de seus cofatores FH, CR1 e MCP.

Durante a inativação de C3 são gerados iC3b, C3dg e C3d que atuam como opsoninas, favorecendo a ação de fagócitos sobre as superfícies por elas recobertas.

1.4 Regulação da ativação do SC

A ativação do SC é finamente controlada de maneira que não ocorra ativação e lesão sobre células do próprio organismo e também para que não haja ativação exacerbada e com isso consumo exagerado de suas proteínas. Os diversos reguladores da ativação do SC atuam em diferentes pontos para que seja possível um controle efetivo da mesma em pontos diversos e cruciais para a atividade do mesmo.

O principal regulador da ativação é FI que apresenta atividade de serino-protease agindo sobre C3b e C4b, inativando-os. FI é responsável pela fragmentação de C3b e C4b inativando as C3- e C5-convertases e assim inibindo a continuação da ativação do SC. FI desempenha sua atividade de serino-protease na presença de cofatores, tais como, FH, MCP, CR1, C4BP (*C4b binding protein*) e DAF (*decay accelerating factor*).

A ação de FI sobre C3b ou C4b é determinada pelo tipo de cofator que atua conjuntamente com ele. FH somente é capaz de atuar como cofator na primeira clivagem que FI promove em C3b gerando os fragmentos iC3b e C3f (Figura 4). C4BP somente é capaz de atuar como cofator na clivagem que FI promove em C4b gerando os fragmentos C4c e C4d (Figura 5). MCP atua como cofator tanto na clivagem de C4b como também na primeira clivagem de C3b (Figura 4 e Figura 5). CR1 é cofator em todas as clivagens promovidas por FI nas moléculas C3 e C4, sendo o único cofator na segunda clivagem da molécula C3 gerando os fragmentos C3c e C3dg a partir de iC3b (Figura 4 e Figura 5) (Morley, 2000).

Figura 4 – Esquema representando as sucessivas clivagens pelas quais a molécula C3 passa ao longo de seu processo de ativação e posteriormente de inativação.

Primeiramente ocorre a quebra de C3 em C3a e C3b por ação das C3-convertases; posteriormente o fragmento C3b é quebrado por ação de FI e seus cofatores em iC3b e C3f; novamente iC3b é clivado pela ação de FI tendo CR1 como cofator em C3c e C3dg.

FONTE: Botto, 2000.

Figura 5 – Esquema representando as sucessivas clivagens pelas quais a molécula C4 passa ao longo de seu processo de ativação e de inativação.

Primeiramente ocorre a quebra de C4 em C4a e C4b pela ação de C1s/MASP-2; posteriormente a molécula C4b é quebrada pela ação de FI e seus cofatores em C4c e C4d.

FONTE: Isenman, 2000.

Também há regulação das vias clássica e das lectinas, pelo inibidor de C1 que atua tanto sobre o complexo C1 como quanto ao complexo MBL/MASP, inativando C1r, C1s, MASP-1 e MASP-2 (Cooper, 1985; Matsushita et al., 2000).

Outro momento da ativação do SC que merece atenção é a formação do MAC, que deve ser controlada para que não ocorram lesões sobre tecidos próprios. Isso acontece pela ação de reguladores associados à membrana plasmática como CD59, que se liga à C8 no MAC em formação impedindo a incorporação de C9 para finalizar esse complexo proteico (Meri et al., 1990). Também atuam neste ponto, a vitronectina e a clusterina que se ligam ao complexo C5b-7 impedindo tanto a ligação a C8 e C9 como a inserção na membrana celular (Choi et al., 1990).

Contrapondo-se a todos os reguladores negativos da ativação do SC que foram apresentados está a Properdina (FP). Ela é responsável por ligar-se a C3b inibindo a clivagem por FI, também estabiliza a ligação C3bB favorecendo a ação de FD clivando FB e gerando a

C3-convertase da via alternativa. A ligação de FP realiza-se com maior afinidade a C3b se associado a alguma superfície, sendo pouco expressiva a sua ligação a C3b solúvel (Farries et al., 1988).

1.5 A proteína reguladora Fator I

A proteína FI é a principal reguladora da ativação do SC por inativar as C3-convertases, ao clivar C3b e C4b em seus subprodutos de ativação, C3c, C3dg e C3f, C4c e C4d, respectivamente. A concentração dessa proteína em indivíduos adultos normais está entre 39-100 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003).

O gene CFI humano está localizado no cromossomo 4 na posição q25, compreendendo 65 kb e contendo 13 éxons (Figura 6). A região promotora do gene não foi bem caracterizada até hoje, uma das poucas informações conhecidas é que esse gene não apresenta uma região TATAbox clássica, mas sim uma região TATA like (-57AATA-54) e um elemento iniciador Inr (TCAGCCA) entre -148 e -154 antes do ATG +1 (Paramaswara e Minta, 1999). O precursor de FI é sintetizado na forma de uma única cadeia peptídica com 583 resíduos de aminoácidos que é processada em duas cadeias peptídicas de 50 e 38 kDa. O peptídeo sinal é clivado proteoliticamente, gerando a proteína madura (Volanakis e Arlaud, 1998¹ apud Terado et al., 2002). A cadeia não catalítica de 50 kDa contém os domínios FIMAC (FI membrane attack complex domain), CD5 – também conhecido com domínio SRCR (scavenger receptor cysteine rich domain), LDLRA 1 e 2 (low density lipoprotein receptor domains) e um domínio sem função conhecida. A cadeia catalítica de 38 kDa contém o domínio de serino protease.

Embora FI esteja presente na circulação em sua forma ativa, ainda assim necessita de cofatores para agir sobre seu substrato. Roversi et al. (2011) propuseram um mecanismo em que a cadeia pesada de FI atuaria como inibidor do domínio serino protease. Durante a interação com seus substratos e/ou com seus cofatores ocorreriam alterações na

¹ Volanakis JE, Arlaud GJ. Complement enzymes. In: Frank MM, Volanakis JE. The human complement system in health and disease. New York: Marcel Dekker; 1998. P. 49-82.

conformação geral de FI liberando o domínio de serino protease, que por sua vez atuaria sobre o substrato, clivando-o.

Diversos trabalhos sugerem que há alterações conformacionais na molécula FI durante sua interação tanto com o substrato bem como com seus cofatores (Ekdahl et al., 1990; Roversi et al., 2011). Além disso, também há evidências que o domínio de serino protease que foi proteoliticamente separado da cadeia pesada de FI possui atividade sobre pequenos substratos sintéticos, com atividade semelhante à observada com a proteína intacta entretanto essa atividade não é mantida sobre seu substrato natural, C3b (Tsiftoglou et al., 2005).

Figura 6 – Esquema apresentando o gene *CFI*, seus éxons e íntrons, e correlação de cada éxon com um domínio da proteína.

FIMAC – domínio presente nas proteínas FI, C6 e C7 do SC; CD5 – domínio conservado da molécula CD5; LDLRA – domínio de receptor de LDL.

FONTE: Delcolli, 2012.

As deficiências de FI foram relacionadas com casos de infecções recidivantes e, em poucos casos, desenvolvimento de autoimunidade. Foram descritos diversos trabalhos em

que deficiências de FI estão relacionadas com meningites recidivantes (Bonnin et al., 1993; Leitão et al., 1997; Ponce-Castro et al., 2008). Também foram descritos diversos trabalhos mostrando que deficiências ou polimorfismos em *CFI* estão relacionados com o desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica atípica (Fremaux-Bacchi et al., 2004; Kavanagh et al., 2005, 2008; Nilsson et al., 2007, 2010a). Também foram apresentados casos onde pacientes deficientes de FI desenvolvem autoimunidade, além de maior susceptibilidade às infecções (Baracho et al., 2003; Genel et al., 2005). Foi descrito um caso em que alterações hormonais estavam relacionadas com episódios de meningite recorrentes próximos ao período menstrual em pacientes deficientes de FI (González-Rubio et al., 2001).

Recentemente foram reavaliados casos de deficiências completas e parciais de FI, analisando-se os quadros clínicos relacionados a cada tipo de deficiência. Constatou-se que os pacientes que apresentavam deficiências parciais geralmente apresentavam episódios de autoimunidade, com o possível entendimento de que menor quantidade de FI há uma menor regulação da ativação do SC, entretanto não há consumo completo das proteínas de ativação do SC como C3 e FB; ou seja, ainda é possível que em um caso de injúria tecidual ocorra ativação do SC sobre células próprias. Já no caso das deficiências completas de FI observa-se a ocorrência de infecções piogênicas recidivantes, possivelmente explicadas pelo excessivo consumo de C3 e FB que impossibilita a ativação do SC sobre patógenos (Kavanagh et al., 2008; Nilsson et al., 2011).

1.6 Deficiências de componentes do SC

Foram descritas deficiências em, praticamente, todos os componentes do SC sendo possível agrupá-las de acordo com as características clínicas e a via de ativação (Botto et al., 2009). Deficiências das proteínas participantes da via clássica estão relacionadas com o desenvolvimento de autoimunidade e aumento da susceptibilidade a infecções por microorganismos encapsulados. Deficiências das proteínas relacionadas com a via alternativa estão relacionadas com aumento da susceptibilidade a infecções causadas por *Meningococcus* sp, assim como deficiências nas proteínas da via terminal comum. Deficiências de proteínas da via das lectinas estão relacionadas com aumento da

susceptibilidade a infecções bacterianas em geral. Deficiências nas proteínas reguladoras da ativação do SC são aquelas que apresentam um quadro mais amplo quanto ao tipo de enfermidade que é causada, já que podem estar relacionadas tanto com o aumento de susceptibilidade a infecções como também com o desenvolvimento de doenças autoimunes como glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II (Pettigrew et al., 2009). A deficiência de C3 está relacionada com quadro de infecções recorrentes, especialmente otite média, meningite e pneumonia (Botto et al., 2009; Reis, et al., 2006).

Outro grupo de pesquisadores (Skattum et al., 2011) também reavaliou casos de deficiências no SC e apontaram as ocorrências clínicas mais comuns associadas com defeitos em cada uma das vias de ativação e a via terminal comum. Deficiências nas via alternativa e terminal comum levam ao quadro de infecções por sorotipos raros de *Neisseria meningitidis* podendo evoluir para septicemia. Nos casos de deficiências na via das lectinas observa-se maior susceptibilidade a infecções do trato respiratório e também o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sintomas inflamatórios/de autoimunidade e trombocitopenia. Já as deficiências na via clássica estão relacionadas com infecções causadas por bactérias encapsuladas e desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico ou doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico. Já deficiências na proteína central C3 ou nos reguladores da ativação do SC estão relacionadas com quadros de maior susceptibilidade a infecções, desenvolvimento de doenças relacionadas com o depósito de imunocomplexos e doenças renais, especialmente nas deficiências de proteínas da família de FH.

Entretanto, nos últimos anos têm sido descritas uma série de outras alterações que estão relacionadas com modificações nos níveis de ativação do SC em diferentes sub-compartimentos do organismo – como lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II (Pettigrew et al., 2009; Sjöholm et al., 2006). Um maior conjunto de dados sobre as alterações de saúde relacionadas às deficiências do SC é fundamental para uma compreensão ampla do mesmo e também para reconhecer situações de intercâmbio entre os diferentes componentes do SI e do organismo como um todo.

Outro grupo analisou as deficiências no SC com base nas doenças e/ou quadro clínico que os pacientes podem apresentar (Sarma e Ward, 2011).

Destaca-se que a síndrome hemolítico-urêmica atípica está relacionada com polimorfismos no gene *CFH* que diminuiria a inativação de C3b, mas essa doença também foi relacionada com polimorfismos de FI, FB e CD46 (Botto et al., 2009; Pettigrew et al., 2009).

O angioedema hereditário está relacionado com a deficiência no inibidor de C1 (C1INH) do SC mas também com o fator XIIa da coagulação. Ambas as deficiências levam ao aumento da produção de bradicinina que leva à maior permeabilidade vascular (Sarma e Ward, 2011).

A hemoglobinúria noturna paroximal está relacionada com mutações no gene *PIG-A* que leva à diminuição da expressão de proteínas ligadas à GPI, entre as quais encontramos os reguladores do SC CD59 e DAF. Dessa forma ocorre uma intensa lise de eritrócitos mediada pela ativação do SC que provoca a anemia no paciente (Sarma e Ward, 2011).

Ao lúpus eritematoso sistêmico podemos relacionar as deficiências em proteínas da via clássica do complemento, em especial aquelas que compõem o complexo C1, mas também de C2 e C4. Destaca-se a deficiência de C1q pelo fato dessa proteína auxiliar no processo de remoção de corpúsculo apoptóticos e sua ausência levaria à possibilidade de geração de autoimunidade pela não remoção dos corpúsculos (Botto et al., 2009; Pettigrew et al., 2009).

Já as deficiências de C2, C3 e C4 estão relacionadas com maior susceptibilidade a infecções por *Haemophilus influenzae* e *Neisseria* (Botto et al., 2009; Pettigrew et al., 2009). Deficiência de properdina está relacionada com elevada mortalidade a infecções por *Neisseria meningitidis*. Deficiências de FI e MBL estão relacionadas com aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas recidivantes. Finalmente, deficiências de C5, C6, C7, C8 e C9 estão associadas a maior susceptibilidade a *Neisseria meningitidis*, entretanto com baixa mortalidade (Sarma e Ward, 2011).

Como podemos observar o estudo de imunodeficiências é fundamental para melhor compreensão do SI e também da interação de nosso organismo com microorganismos patogênicos. Dessa forma, vemos que nosso trabalho é de grande valia para o entendimento do SI e, especialmente, do SC.

Neste trabalho incluímos 10 casos de imunodeficiências do SC, sendo 3 deficiências de C3 (C3def1; C3def2; C3def3) e 7 deficiências de FI (FIdef1; FIdef2; FIdef3; FIdef4; FIdef5;

FIdef6; FIdef7). Na Parte I descrevemos as bases moleculares da deficiência de C3def3. Na Parte II descreveremos as bases moleculares das deficiências de FIdef2; FIdef3; FIdef4; FIdef5; FIdef6 e FIdef7. Na parte III avaliamos a influência de C3 e FI na expressão gênica de fibroblastos humanos de pele em mantidos em cultura, utilizando material dos indivíduos C3def1; C3def2; C3def3; FIdef1; FIdef2; FIdef3 e FIdef4.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é determinar as bases moleculares das deficiências nas proteínas C3 e FI, assim como, analisar a interferência da deficiência de C3 ou FI na expressão gênica em fibroblastos de pele humana.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização imunológica de pacientes deficientes em C3 e FI e identificação de mutações responsáveis pelas respectivas deficiências.
- Avaliação da expressão gênica diferencial em fibroblastos de indivíduos deficientes de C3 e de FI, quando comparados com fibroblastos de indivíduos normais.
- Validação dos resultados de expressão gênica diferencial pela técnica de PCR em Tempo Real.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras dos pacientes e de indivíduos normais

Para a coleta de amostras de sangue utilizou-se tubo de coleta seco para posterior separação do soro. O soro foi aliquotado e mantido a -80°C até o momento do uso. As amostras de soro destinadas à avaliação funcional do SC foram congeladas e descongeladas uma única vez.

Além disso, também foram realizadas biópsias de pele para obtenção de fibroblastos, de acordo com Vyse et al. (1996) e Reis et al. (2002). Resumidamente, retirou-se um fragmento de pele do antebraço dos indivíduos com prévia assepsia utilizando-se álcool etílico a 70% e o mesmo foi utilizado para a cultura celular conforme descrito no item 3.3.

Tanto as amostras de sangue como de pele foram obtidas após consentimento livre e esclarecido dos indivíduos assim como segundo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do ICB-USP. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do ICB-USP no parecer nº 690 de 07/03/2006.

3.2 Casuística

Na realização deste trabalho foram utilizados materiais de 13 indivíduos, sendo: 3 deficientes em C3 (C3def), 7 deficientes em FI (FIdef) e 3 indivíduos normais. Na Tabela 1 apresentamos sucintamente as alterações moleculares encontradas nos pacientes previamente estudados e destacamos os pacientes que são objeto de estudo desse trabalho. Além disso, no texto a seguir apresentamos algumas características clínicas desses pacientes.

Tabela 1 – Códigos e iniciais dos pacientes estudados neste trabalho, alterações encontradas nos genes estudados e bibliografia relacionada aos pacientes.

Pacientes	Iniciais	Modificações	Bibliografia
C3def 1	LAS	T ¹⁰⁰¹ C troca Leu ³¹⁴ Pro; mutação silenciosa T ¹⁷⁹¹ C (Pro ⁵⁷⁷); mutação silenciosa C ²⁴⁵⁴ T (Ser ⁷⁹⁸); mutação silenciosa C ⁴³⁷¹ T (Ala ¹⁴³⁷); C ²⁶⁰² T troca Arg ⁸⁴⁸ Stop.	Ulbrich et al., 2001, Reis et al., 2004
C3def 2	CA	Mutação silenciosa G ⁹⁷² A (Ala ³⁰⁴); substituição T ¹⁰⁰¹ C troca Leu ³¹⁴ Pro; substituição G ¹⁷¹⁶ A troca Lys ⁵⁵² Stop.	Reis et al., 2002
C3def 3	PIC		Descrito nesse trabalho
Fldef 1	LS	inserção de 2 pb 1205 Δ AT – Stop códon 13 pb a montante	Baracho et al., 2003
Fldef 2	EIT		Descrito nesse trabalho
Fldef 3	Vi		Descrito nesse trabalho
Fldef 4	Va		Descrito nesse trabalho
Fldef 5	AF		Descrito nesse trabalho
Fldef 6	EC		Descrito nesse trabalho
Fldef 7	IRC		Descrito nesse trabalho

FONTE: Delcolli, 2012.**3.2.1 C3def1**

O paciente C3def1 trata-se de indivíduo do sexo masculino com 8 anos de idade, cujos pais são consanguíneos (tio e sobrinha) e tiveram quatro filhos que morreram em decorrência de infecções agudas inespecíficas e cardiopatia antes do 6 meses de idade. O paciente apresentou adenite, sinusite maxilar, tonsilites purulentas, broncopneumonia e infecção por *Giardia lamblia*. Após as infecções, ele desenvolveu púrpura nas pernas e nádegas. Ele foi previamente estudado em nosso

laboratório, quando foram determinados os níveis séricos de C3 (1,15 µg/ml; normal: 1,0-1,6 mg/ml). Além disso, foram encontradas as seguintes alterações no gene C3:

- a) substituição T¹⁰⁰¹C, levando à troca Leu³¹⁴Pro (polimorfismo anteriormente descrito por Botto et al., 1990);
- b) troca T¹⁷⁹¹C, mutação silenciosa (Pro⁵⁷⁷);
- c) mutação silenciosa C²⁴⁵⁴T (Ser⁷⁹⁸);
- d) mutação silenciosa C⁴³⁷¹T (Ala¹⁴³⁷);
- e) substituição C²⁶⁰²T levando à troca Arg⁸⁴⁸Stop (Reis et al., 2004; Ulbrich et al., 2001).

3.2.2 C3def2

O paciente C3def2 é um indivíduo de 19 anos de idade, do sexo masculino, que apresentava quadro de infecções recidivantes incluindo: broncopneumonia, meningite meningocócica, otite média, osteomielite, piodermite, infecção do trato urinário, artrite e febre de origem desconhecida. Ele foi previamente estudado e a concentração de C3 foi indetectável em seu soro e FI estava presente em concentrações normais (Grumach et al., 1988). Além disso, em nosso laboratório foi realizada a caracterização molecular da deficiência, onde se observaram as seguintes alterações no gene C3:

- a) mutação silenciosa G⁹⁷²A (Ala³⁰⁴);
- b) substituição T¹⁰⁰¹C, levando à troca Leu³¹⁴Pro (polimorfismo anteriormente descrito por Botto et al., 1990);
- c) substituição G¹⁷¹⁶A, levando à troca Lys⁵⁵²Stop (Reis et al., 2002).

3.2.3 C3def3

O paciente C3def3 é objeto da determinação das bases moleculares responsáveis pela deficiência neste trabalho. Trata-se de indivíduo do sexo masculino, encaminhado ao nosso laboratório aos 9 anos de idade com quadro de meningococemia. Ele já havia apresentado anteriormente 4 episódios de tonsilite e diversos episódios de sinusite. Ele

possui um irmão saudável e uma irmã com microcefalia que faleceu com 8 meses de idade. Os pais apresentam histórico de consanguinidade (primos distantes).

3.2.4 *Fldef1*

A paciente *Fldef1* trata-se de indivíduo do sexo feminino com 3 anos de idade cujos pais são primos de primeiro grau, ela foi assintomática até os 3 anos de idade quando apresentou quadro grave de infecção intestinal que evoluiu para sepse, responsável pelo seu falecimento. Ela apresentava níveis de FI indetectáveis no soro e em outro trabalho desenvolvido também em nosso laboratório, observou-se a inserção de 2 pb no códon 374 (1205 Δ AT) de FI, levando à geração de um códon de parada prematura 13 pb a montante da inserção (Baracho et al., 2003).

3.2.5 *Fldef2*

O paciente *Fldef2* é objeto de estudo molecular de sua deficiência neste projeto. Trata-se de indivíduo do sexo masculino que foi encaminhado ao nosso laboratório aos 9 anos de idade, tendo apresentado púrpura desde os 4 anos de idade, 5 episódios de otite média e quadro de vasculite com infiltrado linfocitário. Este paciente é acompanhado pelo Dr. Victor Nudelmann, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP.

3.2.6 *Fldef3* e *Fldef4*

As pacientes *Fldef3* e *Fldef4* são irmãs e já foram previamente estudadas por Leitão et al. (1997), quando foram determinados os níveis de proteínas do SC no soro das pacientes, seus pais e seus irmãos. Grumach et al. (2006) deram continuidade ao estudo, passando a analisar o soro de todos os indivíduos de 3 gerações desta família e dessa forma puderam determinar que indivíduos heterozigotos para a deficiência de FI apresentavam maior propensão ao desenvolvimento de infecções que os

indivíduos normais da família. Estes dois trabalhos tornaram possível a correlação entre as concentrações de proteínas do SC no soro dos pacientes com a situação de presença ou ausência de mutação no gene em estudo. Em nosso estudo foram determinadas as bases moleculares dessa deficiência. Estas pacientes são acompanhadas pela Dra. Monica de Freitas Leitão no Ambulatório de Pediatria do Hospital Universitário da UNICAMP, Campinas, SP e vêm sendo estudadas em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Condino Neto, Departamento de Imunologia, ICB-USP, São Paulo, SP.

3.2.7 *Fdef5*

O paciente *Fdef5*, indivíduo de 21 anos do sexo masculino com quadro de púrpura recorrente nos membros inferiores e artrite episódica nos tornozelos e tarsos. Este paciente já apresentou vasculite pulmonar com hemorragia pulmonar por três vezes e em um episódio seu pulmão foi biopsiado, revelando um quadro de vasculite leucocitoclástica, sem depósito de imunoglobulinas ou de proteínas do SC. O paciente possui uma irmã com quadro clínico semelhante, porém com níveis normais de C3. Os pais do paciente são primos de primeiro grau. Em nosso estudo foram determinadas as bases moleculares dessa deficiência. Este paciente é acompanhado pela Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Hospital de Base, Brasília, DF.

3.2.8 *Fdef6* e *Fdef7*

Os pacientes *Fdef6*, 15 anos sexo feminino, e *Fdef7*, 10 anos sexo masculino, são irmãos, cujos pais são primos de primeiro grau. Ambos apresentaram quadro de púrpura recorrente nos membros inferiores e artrite episódica nos tornozelos e tarsos, quadro sugestivo de púrpura de Henoch Schönlein. Análise histopatológica revelou quadro de vasculite leucocitoclástica. A paciente *Fdef6* foi submetida a duas laparotomias de urgência, apresentando líquido serosanguinolento com crescimento positivo de pneumococo. Há três anos desenvolveu osteomielite no fêmur direito por pneumococo. A paciente *Fdef6* também apresentou sinais de insuficiência vascular nas pernas e pés com comprometimento

da pele. O paciente Fldef7 até o momento não desenvolveu quadro de infecções recidivantes. Em nosso estudo foram determinadas as bases moleculares dessa deficiência. Estes pacientes também são acompanhados pela Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Hospital de Base, Brasília, DF.

3.2.9 Indivíduos normais

Foi utilizado o material genético de três indivíduos considerados saudáveis para comparação dos resultados de análise da expressão gênica obtidos com os pacientes, sendo dois indivíduos do sexo masculino com 20 e 23 anos de idade e outro indivíduo do sexo feminino com 25 anos de idade.

3.3 Cultura celular

Os fibroblastos foram cultivados a partir de biópsias de pele de aproximadamente 3 mm² retiradas de indivíduos normais e dos pacientes. O cultivo foi realizado em nosso laboratório, em DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*), pH 7,2, contendo 25 mM de HEPES (*hepes sodium salt*), 24 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina e 25 mM de glicose, complementado com 10% de soro bovino fetal inativado a 56 °C por 30 minutos (SBFi) e 1% de L-glutamina (100 mM), acrescido de 0,1 g de sulfato de estreptomicina e 0,06 g de penicilina a cada litro de meio de cultura, segundo Vyse et al. (1996) e Reis et al. (2002).

As culturas de células foram mantidas a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após alguns dias, quando se apresentavam com aproximadamente 80% de confluência, as células foram empregadas para:

- a) extração do DNA genômico e RNA total;
- b) análise de proteínas por Western Blotting;
- c) análise de fibroblastos por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser.

3.4 Extração de RNA a partir de células em cultura

Para a extração do RNA total, as células foram lavadas com PBS (solução salina tamponada de fosfato – pH 7,2, contendo fosfato de potássio dibásico a 5 mM, fosfato de potássio monobásico a 1,2 mM e cloreto de sódio a 150 mM), seguindo-se a adição de 500 µl da solução de desnaturação (Promega), para a lise das células. Então, as células foram destacadas do fundo da garrafa de cultura, transferindo-se a suspensão para um microtubo, onde foram adicionados 50 µl de acetato de amônio 2 M e 500 µl de fenol. Depois de 15 min no gelo, as células foram centrifugadas por 20 min a 12000 *g*, a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, onde o mesmo volume de isopropanol foi empregado para a precipitação do RNA, incubando-se a -20 °C por, no mínimo, 18 h. Após esse processo, o conteúdo foi centrifugado por 40 min a 12000 *g*, a 4 °C. Na sequência, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 75%, sob centrifugação por 20 min a 12000 *g*, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo RNA total foi ressuspenso em 10 µl de água estéril, livre de DNases e RNases.

3.5 Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase [*Reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)*]

Uma vez extraído, o RNA total foi quantificado após leitura da absorbância em espectrofotômetro (260 nm), aceitando-se a pureza relativa (D.O. 260 nm/D.O. 280 nm) entre 1,7 e 2,0. Após quantificação do RNA total, procedeu-se com RT-PCR em duas etapas, a partir de RNAm total para amplificação de segmentos específicos de cDNA, utilizando-se os ‘*primers*’ descritos na Tabela 2. O cDNA foi obtido em duas etapas, primeiramente 1 µl de RNA total (200 ng/µl) foi incubado com 1 µl de oligo dT (1µg/µl) por 5 min a 72 °C e 5 min no gelo. Após isso, adicionamos 5 µl de tampão M-MLV 5X (fornecido pelo fabricante, Promega), 1 µl de inibidor de RNase (29700 U/ml - Pharmacia), 2 µl de dNTP (10 mM), 14,3 µl de água e 0,7 µl da enzima transcriptase reversa M-MLV (200 U/µl - Promega), e incubação a 42 °C por 1 h. Na etapa final, foram utilizados reagentes nos seguintes volumes

finais: 2,5 µl de tampão mix 10X (tampão contendo 0,4 mM de cada dNTP e MgSO₄ a 2,4 mM), 1 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl de *primers* específicos (20 pmoles/µl), 18,8 µl de água, 2 µl de cDNA e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA polimerase (5000 U/ml – GE Healthcare). As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 1 min a 94 °C para desnaturação, 30 s à temperatura adequada para o anelamento de cada par de *primers* (Tabela 02) e 2 min a 72 °C de extensão; seguidos por mais 7 min de extensão a 72 °C.

Os resultados foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (pH 8,0, ácido bórico a 89 mM, Tris a 89 mM e 0,4% de EDTA 0,5 M); a coloração do gel foi feita em solução de brometo de etídio (1 µg/ml) por 10 min. Em seguida, o gel foi observado sob luz ultravioleta para evidenciar as bandas dos produtos amplificados e fotografado para análise posterior.

Tabela 2 – Primers utilizados nas reações de PCR e RT-PCR.

Gene	Tipo de material	Nome	Sequência 5'→3'	Tm (°C)	Direção
C3	cDNA	C3OL1-21	CTCCTCCCCATCCTCTCCCTC	70	F
C3	cDNA	C3 582	GGTCAAGCAGGACTCCTTGTC	66	F
C3	cDNA	C3OL1000	GGTTCTGCACCCCGTCCAGCA	70	R
C3	cDNA	C3 1553	CCCTTGTTTCATGATCAGGTAGG	66	R
C3	cDNA	RH74	GAAGAAGCAGGAGCTCTCGG	64	F
C3	cDNA	Ex21	AAGGCTGCCGTCTACCATCATT	66	F
C3	cDNA	C3OL2887	CCACAGTTTTGTTGATTCTGATTC	66	R
C3	cDNA	C3OL3839	GATACTACGGTGGTGGCTATG	62	F
C3	cDNA	C3OL3960	CAGTTGGAGGGACACATCAAG	66	R
C3	cDNA	C3 5067	GGAATGGGGGTGTGGTCAGTT	66	R
CFI	cDNA	96F	CATCTCAAGAGGATCTGGTG	64	F
CFI	cDNA	4F699	GATGACTTCTTTCAGTGT	50	F
CFI	cDNA	5R753	CACAGGCTTTCATCTGAG	54	R
CFI	cDNA	11F1233	CCCACCTTAAACGTATAG	56	F
CFI	cDNA	11R1443	AGCCAGAAACGATGCATG	54	R
CFI	cDNA DNAg	13F1564	GTACATATGATGGTTCCATCG	55	F
CFI	cDNA	13R1929	TGGCATAAACTCTGTGGAG	56	R
CFI	DNAg	FI35218440F	CTCAGCTCTTTAATGGGAAGG	58	F
CFI	DNAg	FI35217970R	TGTTTCAGTTCAATGCCTCTGC	61	R
CFI	DNAg	FI35183280F	CAGATGGTTGTAGATATGCGG	58	F
CFI	DNAg	FI35182686R	ATTCTGGCAACCCCTGATTTG	63	R
CFI	DNAg	FI35156881R	CTGGGATTTGAACCCAACCTT	62	R
CFI	DNAg	FI exon 3F	GAATAGCACTGCCGCTGACAC	58	F
CFI	DNAg	FI exon 3R	GTGTTTGTGACTCTCAGAATC	51	R
CFI	DNAg	FI exon 4F	TGAAGGTACTGACCATCAGAG	56	F
CFI	DNAg	FI exon 4R	AGGGGAGTCAGGCAACTTTGC	60	R
CFI	DNAg	FI exons 5-6F	CAGAGATAATAGAAGAGCCTC	50	F
CFI	DNAg	FI exons 5-6R	CAAGTAGATATTTAGCGGATG	49	R
CFI	DNAg	FI exon 7 F	AATAAGGTGCAATGGTTTTCA	57	F
CFI	DNAg	FI exon 7 R	AAACTAATGTTTCAGGCTGGGC	60	R
CFI	DNAg	FI exon 8 F	TGCATCTTGAGCCTTTACAA	57	F
CFI	DNAg	FI exon 8 R	CTAAACCACTGAGCCACCA	57	R
CFI	DNAg	FI exons 9-10 F	GGCTGTGACTCTCCTGTTTT	57	F
CFI	DNAg	FI exons 9-10 R	GTCGCGAATACCAGAGGATA	58	R
CFI	DNAg	FI exon 11 F	ACAAAATTCTGGGGAAATGA	57	F
CFI	DNAg	FI exon11 R	CCATGGCTGGATGTTTACTT	58	R
CFI	DNAg	FI exon 12 F	ACACCCTTTCATAATCCCAA	57	F
CFI	DNAg	FI exon 12 R	TTTGAGAGTGCTACAGCCAG	57	R
CFI	DNAg	FI exon 13 F	AGCCAAAGTTGTTAAATGCC	57	F
CFI	DNAg	FI exon 13 R	TCCAGGGCATAGTAGGTGAT	57	R

F = Forward (5' → 3'); R = reverso (3' → 5')

FONTE: Delcolli, 2012.

3.6 Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido de fibroblastos dos pacientes e de indivíduos normais utilizando-se o reagente DNAzol (Invitrogen). As células foram tratadas com tripsina e centrifugadas a 2000 *g* por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 0,5 ml de DNAzol e homogeneizado com auxílio de pipeta. Então 0,3 ml de etanol 100% foi adicionado e a mistura centrifugada por 10 min a 1000 *g*. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 95%. O precipitado foi seco a TA e dissolvido em 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,9, 1 mM EDTA pH 8,0).

Posteriormente, a concentração do DNA foi estimada por absorbância no comprimento de onda 260 nm, onde D.O. = 1 equivale 50 µg de DNA.

3.7 Reação em cadeia da polimerase [*Polymerase chain reaction* (PCR)]

Foram utilizados reagentes nos seguintes volumes finais: 5 µl de tampão mix 10X (tampão contendo 0,4 mM de cada dNTP e MgSO₄ a 2,4 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de cada *primer* específico (Tabela 2) (50 ng/µl), 40,6 µl de água, 1 µl de DNA genômico (100 ng/µl) e 0,4 µl da enzima *Taq* DNA polimerase (5000 U/ml). As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 2 min a 95 °C; 40 ciclos de 1 min a 95 °C para desnaturação, 30 s a 50 °C para anelamento e 2 min a 72 °C de extensão; seguidos por mais 7 min de extensão a 72 °C.

Os resultados foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (pH 8,0, ácido bórico a 89 mM, Tris a 89 mM e 0,4% de EDTA 0,5 M). Seguida pela coloração do gel em solução de brometo de etídio (1 µg/ml) por 10 min. O gel foi observado sob luz ultravioleta para evidenciar as bandas dos produtos amplificados e fotografado para análise.

3.8 Purificação de Produtos de PCR e RT-PCR

Os produtos de PCR e de RT-PCR foram purificados utilizando-se o *kit RT-PCR GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e o mesmo foi corado com brometo de etídeo. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e as bandas de interesse foram cortadas do gel e dissolvidas em tampão de captura na proporção 10 µl de tampão de captura contendo acetato para cada 10 mg de gel a 60 °C por, aproximadamente, 15 min. A solução resultante foi transferida para uma coluna *MicroSpin* (fibra de vidro) em um tubo de coleta e submetida à centrifugação por 30 s a 16000 *g*. Desprezou-se o eluato e, em seguida, 500 µl de tampão de lavagem foram aplicados na coluna que foi submetida à centrifugação por 30 s a 16000 *g*. A coluna foi acoplada a um tubo novo e 20 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) foram então aplicados, incubando-a por 1 min a TA e submetendo-a a centrifugação por 1 min a 16000 *g*.

Alternativamente, realizou-se a purificação dos produtos de PCR sem a necessidade de separar as amostras em gel de agarose. Misturaram-se 90-100 µl de produto de PCR com 500 µl de tampão de captura contendo acetato e este volume foi aplicado em uma coluna *MicroSpin* e seguiu-se o protocolo conforme descrito acima.

3.9 Sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos de DNA foram sequenciados utilizando-se o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq DNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências foram comparadas com RNAm humano normal de *CFI* (NM_000204.3) e RNAm humano normal de *C3* (NM_000064.2). Além disso, também foram consideradas as sequências de DNA genômico relativas a estas proteínas que estão depositadas na página www.ncbi.nlm.nih.gov

3.10 Análise de fibroblastos por microscopia confocal de varredura a laser

Este protocolo foi adaptado de Fishelson et al. (1999). Fibroblastos foram cultivados sobre lamínulas por 24 h em DMEM completo e em seguida estimulados por 20 h com LPS 1 µg/ml de meio. Após este período, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 3,7% de formaldeído em PBS por 15 min. Então as células foram lavadas com glicina 0,1M em PBS e, em seguida, com PBS apenas. As células foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 2 min. Em seguida, as células foram lavadas 2 X e incubadas com PBS contendo 10% de SBFi por 10 min. O tampão foi aspirado e as células incubadas com anticorpo primário contra a proteína de interesse diluído 1:200 em 0,1 M glicina em PBS por 16 h, no mínimo, a 4 °C. Após este período, as células foram lavadas 3X com PBS contendo 10% de SBFi e incubadas com soro normal de coelho diluído 1:200 em PBS contendo 10% de SBFi por 30 min a TA (esta etapa foi necessária apenas quando o anticorpo conjugado foi produzido em coelho). Em seguida, o material foi lavado 5X com PBS contendo 10% de SBFi e incubado com anticorpo secundário adequado conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 1 h a TA no escuro. Em seguida, o material foi lavado 5X com PBS contendo 10% de SBFi e incubado com RNase 10mg/ml em PBS por 30 min à TA no escuro. Finalmente, o material foi lavado 2X com PBS contendo 10% de SBFi e 3X com PBS, incubado com iodeto de propídeo 10 mg/ml por 30 min à temperatura ambiente no escuro. As lâminas foram montadas com *Vectashield Mounting Media for Fluorescence* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) e mantidas sob o abrigo da luz a -20 °C. Este material foi analisado no dia seguinte à montagem em microscópio confocal de varredura, Zeiss modelo LSM 510 no Laboratório de Microscopia Confocal, sob responsabilidade da professora doutora Glaucia M. Machado Santelli, no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP, São Paulo, SP.

3.11 Análise de proteínas por *Western Blotting*

Após separação das proteínas presentes nas amostras, sob condições ou não de redução em gel de poliacrilamida a 12%, as mesmas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Primeiramente as membranas foram incubadas a 4 °C por, pelo menos, 16 h com PBST (NaCl 1,3M; KCl 0,02M; Na₂HPO₄ 0,1M; KH₂PO₄ 0,01M; Tween 20 0,05%) contendo 10% de leite em pó desnatado. Após lavagens com PBST, as membranas foram incubadas

com o anticorpo primário de interesse na diluição 1:2000 em PBST contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 h a TA, sob agitação constante. Novamente, após lavagens com PBST as membranas foram incubadas por 1 h a TA sob agitação constante com o anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase de raiz forte diluído 1:5000 em PBST. Após novas lavagens com PBST as bandas de interesse foram reveladas utilizando-se *ECL Plus Western Blot Detection Kit* (GE Healthcare) e as bandas foram evidenciadas em filme de autorradiografia (*Amersham Hyperfilm ECL High performance chemiluminescence film* - GE Healthcare).

3.12 Preparo dos microarranjos de cDNA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Imunogenética Molecular (FMRP-USP) em colaboração com o Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior conforme descrito a seguir:

3.12.1 Linhagens celulares para obtenção de RNA de referência

Nestes experimentos de análise de microarranjos, utilizamos um padrão de RNA tido como “RNA de referência”, o qual foi preparado misturando-se amostras de RNA de células de origens diferentes. Neste projeto, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares humanas das quais extraímos RNA total: linhagem tumoral de cérebro humano (astrocitoma) U343 MG-a, a linhagem tumoral de carcinoma de colo de útero HeLa e a linhagem linfocítica e a linhagem tumoral de laringe Hep2.

3.12.2 Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose sob condições desnaturantes

Após quantificação, analisamos a integridade do RNAm em gel, sob condições desnaturantes. Um volume total de 70 mL de agarose fundida foi misturado a 20 mL de formaldeído 37% e 22 mL de tampão de migração MOPS 5X (20,6g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0; volume final ajustado para 1000 mL). Durante o tempo de solidificação

do gel, as amostras de RNA foram desnaturadas em tubos *Eppendorf* contendo 4,5 μL de solução de RNA (cerca de 3 μg de RNA); 2,0 μL de tampão MOPS 5X; 3,5 μL de formaldeído 37% e 10,0 μL de formamida, reação esta incubada por 15 min a 65 °C. Após esse tempo, o tubo foi colocado imediatamente no gelo, adicionando-se a esta solução 1,0 μL de brometo de etídeo diluído 3:1 (solução estoque 10 mg/mL) e 2,0 μL de tampão de amostra (1/10 do volume). Após eletroforese a 80V durante 90 min, as bandas de RNA foram visualizadas sobre transiluminador UV e fotografadas.

3.12.3 Clones da biblioteca de cDNA humana (IMAGE)

Os microarranjos deste projeto foram preparados pelo grupo do Laboratório de Imunogenética Molecular (FMRP-USP) com base na biblioteca IMAGE. Esta biblioteca é composta de clones com insertos de cDNA de comprimentos que variam de 0,5 a 1,5 kb clonados em três vetores diferentes, Lafmid, Bluescript e pT7T3, com sequências provenientes de diferentes tecidos humanos.

3.12.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR) a partir de material obtido de colônias de bactérias

Os clones de bactérias repicados em placas de 96 poços contendo meio de cultura 2X LB foram incubados durante 16 h. A seguir uma alíquota de 10 μL da cultura foi transferida para outra placa com fundo em “U” de 96 poços, contendo 90 μL de água deionizada estéril por poço e esta placa incubada a 95 °C por 10 min para lise das células. Após centrifugação em uma centrífuga de placas *Eppendorf* a 4000 *g* por 5 min foram retirados 10 μL do sobrenadante e adicionados a 40 μL de um mix para PCR contendo tampão da reação de PCR (10X), solução de dNTP (2mM), *primers* que utilizaram como molde as sequências consenso aos 3 vetores presentes na biblioteca (10 μM), *primer* LBP 1S (5'TGTGGATTGTGAGCGGATAA3') e *primer* 1AS (5'GGGTTGAATTAGCGGAACG3'), *Taq* DNA polimerase (5U/ μL) e água deionizada estéril q.s.p. 50 μL . O programa para amplificação dos insertos tem como base aquele descrito por Menossi *et al* (2000): 30 ciclos a 94 °C por 30 s,

55 °C por 30 s e 72 °C por 2 min, seguida por uma extensão final de 7 min a 72 °C e foi realizada em aparelho Master Cycler Gradient (Eppendorf) em placas de PCR seladas com adesivo para evitar evaporação. Para avaliar a qualidade da amplificação dos insertos foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) a 80V, durante 30 min. A visualização das bandas foi realizada utilizando transluminador U.V. e fotografadas.

3.12.5 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR (50µl) foram transferidos para placas de cultivo com fundo em “U”, quando receberam 5 µl de acetato de sódio 3 M, pH 4,8, e 125 µl de etanol absoluto. As placas foram incubadas por 16 h a -20 °C e centrifugadas a 4000 *g* por 60 min. O sobrenadante foi recolhido por aspiração com pipeta multicanal e o precipitado ressuspensão em 175 µl de etanol 70%, as placas foram centrifugadas novamente a 4000 *g* por 30 min. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado seco à temperatura ambiente por 20 min e dissolvido em 12 µl de água deionizada autoclavada. Uma alíquota de 2 µl desta solução foi analisada por eletroforese em gel de agarose convencional.

3.12.6 Preparação dos cDNA microarranjos em lâminas de vidro

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Imunogenética Molecular (FMRP-USP), em linhas gerais: sobre as lâminas especiais para microarranjos foram aplicadas as amostras de referência e de estudo já marcadas com os marcadores Cy3 e Cy5. Após isso foram realizadas as hibridações e foram adquiridas as imagens para posterior análise dos dados.

3.12.7 Análise de Dados

A quantificação das imagens dos microarranjos foi obtida com o programa *Array Vision* (Amersham Biosciences).

A filtragem, normalização e análise dos dados foram realizadas no ambiente estatístico R (Ihaka e Gentleman, 1996), com o auxílio dos pacotes *Limma* (Smyth, 2004), *Bioconductor* (Ihaka e Gentleman, 1996), *Aroma* (Bergtsson, 2004) e *KTH*.

Foram aplicados métodos de normalização “*Printtip*” Lowes (*Lowess* por agulhas) e re-escalonamento dos valores M pelo valor de MAD (“*Median Absolute Deviation*”) (Yang et al., 2002).

O método de estatística Bayesiana Empírica (B-test) foi utilizado para a detecção dos genes diferencialmente expressos (Smyth, 2004).

3.13 Anticorpos utilizados

Os anticorpos utilizados nos diferentes experimentos foram: anti-FI humano monoclonal (clone OX-21) feito em camundongo (Serotec) na diluição 1:150, anti-FI humano policlonal feito em cabra (Advanced Technology) na diluição 1:200 para preparo das lâminas empregadas em microscopia e 1:1000 para Western Blotting e para ELISA, anti-C3, -C4, -FI, -FH ou -FB humano policlonal feito em cabra (Calbiochem - Novachem), anti-C3 humano policlonal feito em cabra (Advanced Technology) na diluição 1:200 para o preparo de lâminas empregadas em microscopia e 1:1000 para Western Blotting, anti-C3 humano feito em coelho no próprio laboratório na diluição 1:5000, anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (Sigma) na diluição 1:5000, anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma) na diluição 1:200, anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina (Calbiochem - Novachem) na diluição 1:2000.

3.14 PCR em tempo real

Para os ensaios de PCR em tempo real foram utilizados: 6,25 µl de 2X SyBr Green Mix (Invitrogen), primers Forward e Reverso de acordo com o apresentado na Tabela 3, cDNA obtido a partir de RNAm de fibroblastos dos indivíduos em estudo na diluição 1:20 e água

livre de nucleases q.s.p. para 12,5 µl de volume final. As temperaturas específicas de cada par de primers estão apresentadas na mesma tabela. Iniciou-se a reação com uma etapa de 2 min a 50 °C para degradação de eventuais resíduos de RNA presentes no meio por ação da enzima uracil-DNA glicosilase, seguida de outra incubação por 15 min a 95 °C para desnaturação das duplas fitas de cDNA, e passou-se para 45 ciclos de 15 s a 95 °C para desnaturação das duplas fitas de cDNA, 20 s na temperatura de anelamento de cada par de primers (Tabela 3) por 30 s a 72 °C para extensão das novas fitas de DNA. Ao final dos 45 ciclos, houve incubação final com aumento gradativo da temperatura de 55 °C até 95 °C para elaboração de uma curva de dissociação das duplas fitas formadas.

Tabela 3 – Primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

Produto gênico	Sequência 5'→3'	Sequência 3'→5'	Temp. de hibridação
<i>MASP1</i>	AGTGTCTGATCCTGTTCCA	CTTCAGCACTTTGTAGCCTG	60°C
<i>ETV6</i>	TGTAGCATTAAGCAGGAACG	ATTCATTTCAAACGTGTTGC	60°C
<i>PI4K2B</i>	TGGCTTCCTCAAGCAAAAGT	CTCTTCCCGTCTCTCAATGC	56°C
<i>C10orf39-JAKMIP3</i>	GTTTCATCAGCGGTCACTCTGT	CTGCACAATTTTCAGCATCAA	58°C
<i>PSMA5</i>	AAGCCAGAGTGGAGACACAGA	ATATGAAACAGCTGGGGTCTCT	56°C
<i>PSMB1</i>	TTCAATTCATACGCGGGATAG	GGAAAGAAGCGCCTTGAATAC	56°C
<i>CNTNAP2</i>	GGATGCTCTACAGCGACACA	CTCCATTCCAATCCAGAGG	54°C
<i>CHRNA1</i>	CCTGACGTGGTGCTACTGAA	TAGTGCAATTCTGCCAGTCG	56°C
<i>CAV1</i>	TCTCTACACCGTTCCCATCC	CAGGTCGATCTCCTTGGTGT	54°C
<i>BMP1</i>	TCGGCAAGAACTGTGACAAG	CTGGATGTTCTCACGAACGA	57°C
<i>GOLPH3</i>	TCCAACAGGGGATGTTCTTC	CCCTTTTCCACCAGGTTTTT	55°C
<i>PGM2L1</i>	TCCTGATGCAGACAGACTGG	TTCCAGCAATCAAACATCCA	57°C
<i>SLC19A3</i>	GCCTTTGCACTGGGTTATGT	GCATAGCACGCCAGATATT	55°C
<i>SPRY2</i>	CCCCTCTGTCCAGATCCATA	CCCAAATCTTCTTGCTCAG	55°C
<i>C3 RT 1</i>	ATGGTCAACATTGAGAACC	TAGTAGGCTCGGATCTTCCA	50°C
<i>C3 RT 2</i>	ACGTCACCTTACGATCC	ACCACCTTCTCCACCACTT	52°C
<i>CFI RT 1</i>	CCACTTAAGGTTTTGCAAGG	GGCTGGCAGAAGACTTTATC	50°C
<i>CFI RT 2</i>	GTGTTGTAAAGCATGCCAAG	GAGTCACAGATGCAAAGCCT	52°C

FONTE: Delcolli, 2012.

3.15 Atividade hemolítica mediada pelo SC

Foram utilizados dois métodos distintos para a determinação da atividade hemolítica. Ressaltamos que os métodos para determinação do número de unidades de CH50 e AP50

são mais precisos que aqueles desenvolvidos em placa de agarose, onde se avalia apenas a porcentagem de lise.

3.15.1 Ensaio hemolítico para via clássica (CH50)

Para avaliação da via clássica, empregamos hemácias de carneiro colhidas em Alsever/BRK estéril. Após uma lavagem em VBS (4,85mM barbiturato de sódio; 12,48 mM 5,5'-ácido dietil barbitúrico; 0,53 M NaCl e pH 7.4) e 3 lavagens em VBS⁺⁺ (0,83 mM MgCl₂; 0,25 mM CaCl₂, em VBS), as hemácias foram incubadas por 30 min a 37 °C com anticorpos policlonais de coelho anti-hemácias de carneiro.

O ensaio foi feito em tubos de 1,5 ml, empregando-se diferentes volumes de soro humano tanto padrão como do indivíduo testado 1 µl; 1,25 µl; 1,5 µl; 1,75 µl; 2 µl. Em seguida, adicionamos 1,1 ml da suspensão de hemácias na diluição 1:160 (v/v) em tampão VBS⁺⁺. Os tubos foram incubados por 30 min a 37 °C. Os tubos foram centrifugados, a densidade óptica do sobrenadante foi lida a 420 nm para inferirmos a quantidade de hemácias lisadas. Comparamos os valores obtidos com o esperado para 100% de hemólise, descontando-se os valores obtidos com controle negativo (branco):

$$y = \% \text{ de Lise} = \left[\frac{(D.O.amostra - D.O.branco)}{(D.O.100\% - D.O.branco)} \right] * 100$$

Dessa forma calculamos o volume necessário de soro para hemolisar 50% das hemácias. Uma unidade CH50 corresponde ao volume de soro necessário para lisar 50% das hemácias. Também é possível representar este dado na forma de Unidades de Lise presentes em 1 ml de soro.

3.15.2 Ensaio hemolítico para via alternativa (AP50)

Para avaliação da via alternativa, empregamos hemácias de coelho em Alsever/BRK estéril. As hemácias foram lavadas uma vez em VBS EDTA (VBS ; EDTA 0,02 M e pH 7,2), seguido por 3 lavagens em tampão AP-CFTD (VBS; 0,7mM MgCl₂; EGTA 0,01M e pH 7,2). Os tubos contendo os volumes: 25 µl; 12,5 µl; 10 µl; 6,25 µl e 3,125 µl de soro humano, tanto padrão como do indivíduo testado, receberam 1,1 ml da suspensão de hemácias na diluição

1:160 (v/v) em tampão AP-CFTD. A reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C e, em seguida, comparamos os valores obtidos com o esperado para 100% de hemólise, descontando-se o controle negativo (branco):

$$\% \text{ de Lise} = \left[\frac{(D.O.amostra - D.O.branco)}{(D.O.100\% - D.O.branco)} \right] * 100$$

Dessa forma calculamos o volume necessário de soro, para hemolisar 50% das hemácias. Uma unidade AP50 corresponde ao volume de soro necessário para lisar 50% das hemácias. Também é possível representar este dado na forma de Unidades de Lise presentes em 1 ml de soro.

3.15.3 Atividade hemolítica mediada pela via clássica em placa de agarose

O volume de 4 ml de suspensão de hemácias de carneiro foi lavado 3x com 10 ml de tampão *Complement Fixation Buffer* (CFD) 1x (barbiturato sódico a 4 mM, NaCl a 0,145 M, MgCl₂ a 0,83 mM e CaCl₂ a 0,25 mM), centrifugando-se a 600 g. As hemácias foram ressuspensas a 10% em tampão CFD e sensibilizadas a 4 °C por 30 min com soro de coelho anti-eritrócitos de carneiro em dose sub-aglutinante. Após este período, a suspensão contendo os conjugados de hemácias e anticorpos foi lavada 1x com tampão CFD.

As placas (8x8 cm) foram preparadas com 10 ml de agarose em tampão CFD a 1,2% contendo 500 µl de EA. Poços de, aproximadamente, 3 mm de diâmetro foram preparados e preenchidos com 7,5 µl de uma mistura não diluída de soros de 130 indivíduos adultos saudáveis ou diluída em tampão CFA para a formação da curva padrão (100%, 75%, 50% e 25%), assim como 7,5 µl de cada soro de interesse (100% e 50%) mantidos a -70 °C até o momento de uso. A placa foi então incubada por 18 h a 4 °C para a difusão das proteínas do soro e por mais 2 h a 37 °C para propiciar a lise mediada pela via clássica do complemento.

Para construção da curva-padrão, consideramos a porcentagem de diluição do soro como 'x' e o diâmetro do halo de lise foi medido em mm ('y') e com a média destes dados construímos a equação da reta $y=ax+b$. As determinações sempre foram feitas em duplicatas e consideradas válidas quando o valor de R² era maior ou igual a 0,95.

3.15.4 Atividade hemolítica mediada pela via alternativa em placa de agarose

O volume de 5 ml do tampão GVB-EGTA-Mg²⁺ pH 7,4 (2,5 ml de MgCl₂ a 0,2 M, 5 ml de EGTA a 0,2 M e 92,5 ml de GVB 1x) foi aquecido e misturado a 4 ml de agarose 2% no mesmo tampão a 56 °C em banho-maria. A preparação foi transferida para outro banho-maria mantido a 45 °C, quando foram adicionados 512 µl de suspensão de hemácias de cobaia a 10% no mesmo tampão, tendo sido previamente lavada por três vezes. A mistura foi despejada sobre a placa de vidro (8x8 cm), aguardando-se a solidificação do gel. Para a construção da curva-padrão, aplicamos 7,5 µl de uma mistura de soros de 130 indivíduos adultos saudáveis pura (100%) e em diluições feitas no mesmo tampão (75%, 50% e 25%) dentro de poços de 3 mm de diâmetro feitos sobre a placa, assim como 7,5 µl dos soros de interesse. A placa foi então mantida em câmara úmida a 4 °C para difusão das proteínas do soro por 18 h e por 2 h a 37 °C para que ocorresse a lise mediada pelas proteínas da via alternativa do complemento.

Para construção da curva-padrão, consideramos a porcentagem de diluição do soro como 'x' e o diâmetro do halo de lise foi medido em mm ('y') e com a média destes dados construímos a equação da reta $y = ax + b$. As determinações sempre foram feitas em duplicatas e consideradas válidas quando o valor de R² era maior ou igual a 0,95.

3.16 Imunodifusão radial

Para quantificação de algumas proteínas do SC no soro dos pacientes, empregamos o método de imunodifusão radial proposto por Mancini et al. (1965). Lâminas de vidro (8x8 cm) foram revestidas com 6 ml de agarose a 1% em solução PBS, contendo 0,5% de soro de cabra contendo anticorpos específicos contra a proteína a ser investigada (ou seja, anti-C3, -C4, -FI, -FH ou -FB). As placas foram incubadas por 24 - 48 h em câmara úmida a 4 °C e posteriormente lavadas com NaCl (150 mM) por 24 h. Foram então secas e coradas com *Coomassie blue*, conforme padronizado em nosso laboratório.

3.17 ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) para FI

Neste ensaio os poços da placa foram cobertos com 100 µl anticorpo anti-FI humano feito em camundongo monoclonal (*Serotec*) na diluição 1:150 em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, incubando-se a 4 °C por, pelo menos, 16 h. Em seguida, lavou-se a placa com PBST por imersão e, em seguida, foram adicionados, por poço, 200 µl da solução de bloqueio (PBST contendo 10% de leite em pó desnatado), incubando-se por 2 h a 37 °C. Após novas lavagens, aplicaram-se 100 µl das amostras na placa diluídas a 1:50, 1:75 e 1:100 em PBST em duplicata, incubando-se por 1 h a 37 °C. Em seguida, lavou-se a placa novamente e, em seguida, foram aplicados 100 µl do anticorpo secundário anti-FI humano feito em cabra policlonal (*Advanced Technology*) na diluição 1:1000 em PBST e incubou-se por 1 h a 37 °C. Em seguida, lavou-se novamente a placa e 100 µl do anticorpo terciário anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (*Sigma*) foram aplicados na diluição 1:2000 em PBST. Em seguida, lavou-se novamente a placa e foram aplicados, 100 µl da solução de revelação TMB (*BD Biosciences*) incubando-a por 30 min a TA no escuro. Após este intervalo de tempo, a reação de revelação foi interrompida com a aplicação de 50 µl de ácido fosfórico 1 M. A absorbância foi medida a 450 nm.

3.18 ELISA para C3

Neste ensaio os poços da placa foram cobertos com 100 µl de anticorpo policlonal anti-C3 humano feito em coelho (feito no próprio laboratório – 4 µg/ml) em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, incubando-se a 4 °C por, pelo menos, 16 h. Em seguida, lavou-se a placa com PBST por imersão 5 vezes e depois 200 µl da solução de bloqueio (PBST contendo 5% de leite em pó desnatado) incubando-se por 20 min a 37 °C. Após novas lavagens, foram aplicados, 100 µl das amostras na placa diluídas em PBST em duplicata e incubou-se por 1 h a 37 °C. Em seguida, lavou-se a placa novamente foram empregados 100 µl do anticorpo secundário anti-C3 humano feito em cabra (*Calbiochem - Novachem*) na diluição 1:5000 em PBST, seguido por incubação por 1 h a 37 °C. Em seguida, lavou-se novamente a placa e aplicaram-se 100 µl do anticorpo terciário anti-IgG de cabra

feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) foram utilizados na diluição 1:5000 em PBST. Em seguida, lavou-se novamente a placa e 100 µl da solução de para-nitrofenilfosfato (p-NPP) a 1 mg/ml em tampão de revelação (0,1 M dietanolamina, 0,5 mM MgCl₂, 0,02% NaN₃) foram adicionados, e a placa foi incubada por 1 h a TA no escuro. A absorbância foi lida a 420 nm.

3.19 Obtenção e concentração das amostras de sobrenadante de cultura e de lisados celulares

Células foram cultivadas conforme indicado previamente. As mesmas foram estimuladas por, ao menos, 16 h com LPS 1µg/ml. Após o estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas em cultura pelos intervalos de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e as células foram lisadas com o tampão de lise sem SDS (PBS, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM e Iodoacetamida 1 mM) . Os sobrenadantes foram mantidos a -80 °C até o momento em que as amostras foram concentradas em SpeedVac a 65 °C por 140 minutos. Os lisados celulares também foram mantidos a -80 °C até o momento em que as amostras foram concentradas em SpeedVac a 65 °C por 40 minutos.

Após a etapa de concentração, as amostras foram mantidas a -80 °C até o momento do uso.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Imunodeficiência de C3 no paciente C3def3

4.1.1 Paciente C3def3

Este paciente chegou ao nosso laboratório com suspeitas de baixos níveis de C3 em seu soro. Avaliamos a concentração de diversas proteínas do SC em seu soro, assim como também nos soros de seus pais e irmão (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração das proteínas do complemento nos soros da família de C3def3 por Mancini e ELISA.

Proteínas	Concentração das proteínas (µg/ml)					Valores de referência (µg/ml)	
	C3def3	Irmão	Mãe	Pai	SHN	6-13 anos	Adultos
C3 §	47,3	1267,3	1005,0	996,2	1340,2	640-1470*	1000-1500*
C4 ∞	417,9	680,6	309,8	521,7	630	99-338 *	450-600 *
FB ∞	226,5	316,2	198,3	223,5	246,9	185-513 *	200-210 *
FI ∞	56,1	59,9	48,1	50,6	46,6	34-91 #	38-100 #
FH ∞	467,9	538,4	341,6	314,4	444,4	224-1635 #	241-758 #
FP ∞	17,2	nd	nd	nd	nd	11,3-39,7 #	nd

NOTAS: ND – NÃO DETERMINADO; 2003; §- ELISA; ∞ - MANCINI.

FONTE: * Ferriani et al., 1999; # Ferreira de Paula et al., Delcolli, 2012.

Quanto à concentração de C3, observamos que o soro deste paciente apresentou apenas 47,3 µg/ml, ou seja, aproximadamente 5% do valor médio do intervalo de normalidade na faixa de 10 a 14 anos está compreendido entre 640-1470 µg/ml (Ferriani et al., 1999). Já os soros dos demais indivíduos da família do paciente apresentaram valores de concentração de C3 enquadrados dentro do intervalo de normalidade (1000-1500 µg/ml): soro do irmão = 1267,3 µg/ml, da mãe = 1005 µg/ml e do pai = 996,2 µg/ml.

Já quanto à concentração de C4 observamos que o soro da mãe do paciente apresentou valores abaixo do intervalo de normalidade, sendo 309,8 µg/ml na mãe do paciente e o intervalo de normalidade encontra-se entre 450-600 µg/ml (Ferriani et al.,

1999), já o soro do paciente apresentou 417,9 µg/ml, enquanto os soros do pai e do irmão apresentaram respectivamente 521,7 µg/ml e 680,6 µg/ml de C4.

Quanto às concentrações de FB, FI, FH e FP todos os soros dos indivíduos desta família apresentaram valores dentro do intervalo de normalidade. Para FB, os intervalos de normalidade sérica são 200-210 µg/ml para adultos e 185-513 µg/ml para crianças entre 6-13 anos (Ferriani et al., 1999) e o soro do paciente apresentou a concentração de 226,5 µg/ml, de seu irmão 316,2 µg/ml, de sua mãe 198,3 µg/ml e de seu pai 223,5 µg/ml. Para FI, os intervalos de normalidade sérica são entre 34-91 µg/ml para soros de crianças saudáveis entre 6-13 anos e 38-100 µg/ml para soros de adultos saudáveis (Ferreira de Paula et al., 2003) e o soro do paciente apresentou a concentração de 56,1 µg/ml, de seu irmão 59,9 µg/ml, de sua mãe 48,1 µg/ml e de seu pai 50,6 µg/ml. Para FH, os intervalos de normalidade sérica são 224-1635 µg/ml para soros de crianças saudáveis entre 6 e 13 anos e 241-758 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003) para soros de adultos saudáveis e o soro do paciente apresentou a concentração de 467,9 µg/ml, de seu irmão 538,4 µg/ml, de sua mãe 341,6 µg/ml e de seu pai 314,4 µg/ml. Finalmente, o intervalo de normalidade sérica da concentração de FP para crianças entre 6 e 13 anos é 11,3-39,7 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003) e a concentração no soro do paciente foi 17,2 µg/ml.

Neste ponto é interessante destacar que a deficiência de C3 encontrada no soro do paciente não é decorrente da ausência de regulação da ativação do SC por parte dos reguladores FI ou FH, uma vez que os níveis séricos dessas proteínas encontram-se dentro dos intervalos de normalidade para crianças com a mesma idade do paciente. Ou seja, não é uma deficiência secundária em função do consumo excessivo de C3, mas sim uma deficiência em função da baixa produção ou dificuldade na secreção dessa proteína pelas células do paciente.

Além dessas determinações, as atividades hemolíticas dependentes do SC através das vias alternativa e clássica foram avaliadas pelo método de lise em placas de agarose (Tabela 5). Foi possível observar que o soro do paciente não apresentou atividade hemolítica por nenhuma das duas vias, enquanto os soros do restante de sua família apresentaram atividade dentro da normalidade. O intervalo de normalidade para a atividade hemolítica dependente da via alternativa está entre 71-171% e para a atividade hemolítica dependente

da via clássica está entre 56-192%. Respectivamente, os soros do irmão apresentaram 148,4% e 96,6%, da mãe 116,1% e 58% e do pai 173,7% e 89,9%.

Não foi observada a presença de anticorpos anti-FH no soro deste paciente (gentilmente realizado no laboratório da Dra. Margarita López-Trascasa, Hospital de La Paz, Madri).

Tabela 5 – Atividade hemolítica em soros dos membros da família de C3def3 pelo método realizado em placas de agarose.

Via do Complemento	C3def3	Irmão	Mãe	Pai	Valores Normais
CPH (%)	0	96,6	58	89,9	56-192
APH (%)	0	148,4	116,1	173,7	71-171

FONTE: Delcolli, 2012.

Neste ponto, decidimos investigar se a proteína C3 do soro do paciente apresentava tamanho semelhante ao de indivíduos normais e se seria capaz de sofrer fragmentação autolítica, dependente de ligação tiol-éster intacta, gerando dois fragmentos: 47 kDa e 70 kDa a partir da cadeia α de C3. Para isso realizou-se um experimento de *Western Blot* para avaliar a presença dos fragmentos de C3 gerados por autólise, após incubação dos soros a 37 °C por 30 min. A presença das cadeias α (de 115 kDa) e β (75 kDa). A banda de origem autolítica de 47 kDa foi observada no soro de C3def3 (Figura 7). Entretanto, não foi possível visualizar a banda de 70 kDa, pois ela co-migra com a banda de 75 kDa da cadeia β de C3. Isto sugere fortemente que mesmo presente em baixa concentração, a molécula de C3 continha um ligação tiol-éster funcional (experimento realizado pelo aluno de Iniciação Científica Raphael Pigozzo).

Figura 7 – Presença de C3 no soro do paciente analisada por Western Blotting.

Soros diluídos 1:10 exceto do paciente diluído 1:5. Podemos visualizar em todas as pistas a presença dos fragmentos correspondentes às cadeias α e β , assim como do fragmento autolítico de 47 kDa. Todas as amostras foram incubadas previamente a 37 °C para geração do fragmento autolítico, exceto em C3def3*. Anticorpo anti-C3 humano feito em coelho foi empregado na diluição 1:1000 e o anticorpo anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:2000. SHN: mistura de soros humanos normais.

FONTE: Delcolli, 2012.

Interessamo-nos em avaliar se haveria alguma molécula no soro do paciente capaz de clivar espontaneamente C3 e com isso contribuir para a baixa concentração sérica deste componente. Para tanto, adicionamos C3 purificado comercial como também uma mistura de soros humanos de indivíduos normais e saudáveis (SHN). Como controle, igual reposição foi feita com SHN (Figura 8). Cada uma das combinações de amostras foi incubada por 24 h a 37 °C. Não observamos diferenças quando a reposição foi feita com proteína purificada ou com soro total (pistas 2, 3, 10 e 11, respectivamente). Pudemos observar que, após incubação das amostras a 37 °C, somente ocorreu a clivagem de C3 pela própria ativação do SC, evidenciada pela geração das cadeias α' 107 kDa, α' 67 kDa e α' 40 kDa (pistas 3, 6, 8, 11 e 13, respectivamente).

Figura 8 – Perfil de C3 após incubação com soro do paciente.

Pista 1 – C3 purificado não tratado. Pista 2 – Soro do paciente incubado com C3 purificado – 0h. Pista 03 – Soro do paciente mais C3 purificado incubados a 37 °C por 24 h. Pista 4 – C3 purificado incubado a 37 °C por 24 h. Pista 5 – SHN incubado com C3 purificado – 0 h. Pista 6 – SHN mais C3 purificado incubado a 37°C por 24h. Pista 7 – Soro do paciente– 0h. Pista 8 – Soro do paciente incubado a 37 °C por 24 h. Pista 9 – C3 purificado incubado a 37 °C por 24 h. Pista 10 – SHN incubado com soro do paciente – 0h. Pista 11 – SHN mais soro do paciente incubado a 37 °C por 24 h. Pista 12 – SHN – 0h. Pista 13 – SHN incubado a 37 °C por 24 h. Anticorpo anti-C3 humano feito em coelho foi empregado na diluição 1:1000 e o anticorpo anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:2000.

FONTE: Delcolli, 2012.

Com base no resultado encontrado, não observamos a presença de fatores no soro do paciente capazes de degradar C3 diretamente, uma vez que não houve nenhuma diferença entre as pistas que continham o soro do paciente ou SHN contendo C3 purificado, tendo sido ambas as amostras incubadas a 37 °C por 24 h (experimento realizado em colaboração com a então aluna de doutorado Edimara da Silva Reis).

Nosso próximo passo foi investigar a expressão do RNA mensageiro de C3, a fim de identificar alguma alteração que explicasse a deficiência de C3 neste paciente.

Primeiramente diferentes regiões do cDNA de C3 foram amplificadas por RT-PCR e não foram observadas diferenças nem de tamanho e nem de intensidade das bandas, quando comparadas ao controle normal (Figura 9). Além disso, todos estes produtos de RT-PCR foram sequenciados (Figura 10) e não observamos inserções ou deleções de pares de bases neste cDNA. Paralelamente, também não foram observadas diferenças na produção e tamanho do RNAm de C3 do paciente e controle por Northern blot (Figura 9).

Figura 9 – Produtos de RT-PCR que cobrem todo o cDNA de C3 do paciente e do indivíduo normal onde não foram observadas diferenças de tamanho e intensidade.

Primers utilizados em cada reação: 1 – 1F e 1000R; 2 – 582F e 1553R; 3 – 1337F e 2887R; 4 – 2797F e 3960R; 5 – 3839F e 5067R. C = controle; P = paciente.

FONTE: Delcolli, 2012.

Com o sequenciamento do cDNA de C3 do paciente e do controle normal foram localizadas apenas três alterações, todas em heterozigose. A saber: a) substituição C³⁶⁴G (Figura 10A) que leva à substituição de resíduo Arg¹⁰²Gly previamente descrita por Botto et al. (1990) como sendo polimorfismo; b) substituição silenciosa G²⁴⁸¹C (Figura 10B) que leva à manutenção do resíduo Val⁸⁰⁷ e c) substituição silenciosa A⁴⁹⁵⁶G (Figura 10C) que implica na manutenção do resíduo Pro¹⁶³². Sendo assim não foi evidenciada qualquer alteração que pudesse justificar as baixas concentrações de C3 encontradas no soro do paciente.

Figura 10 – Eletroferogramas das reações de sequenciamento do cDNA do paciente C3def3 apresentando as regiões que possuem alterações em relação ao indivíduo normal.

A

B

C

Quadro A – alteração C364G, polimorfismo descrito por Botto et al., 1990. Quadro B – alteração G2481C que implica em uma mutação silenciosa. Quadro C – alteração A4956G que implica em uma mutação silenciosa.

FONTE: Delcolli, 2012.

O passo seguinte foi amplificar e sequenciar a região promotora do gene C3 tanto do paciente como do indivíduo normal. Não foram encontradas modificações que pudessem justificar a ausência dessa proteína no soro do paciente (dados não mostrados).

A seguir, passamos a analisar a possibilidade de haver alguma alteração na secreção de C3 por fibroblastos do paciente. Foram cultivados fibroblastos de pele do paciente e de indivíduo normal que foram submetidas à análise por microscopia confocal de fluorescência (Figura 11). Esta metodologia foi escolhida por permitir comparar qualitativamente a presença e distribuição de C3 no interior das células e organelas do paciente e do indivíduo normal.

Figura 11 – Marcação para C3 em fibroblastos de pele evidenciada por microscopia confocal de varredura a laser.

A e B – indivíduo normal. C e D – C3def3. A e C – controle negativo sem anticorpo primário e núcleo corado com iodeto de propídeo. B e D – marcação com anticorpo anti-C3 feito em cabra e anticorpo secundário anti-IgG de cabra marcado com FITC, núcleo corado com iodeto de propídeo. FONTE: Delcolli, 2012.

Pelo que pode ser observado na Figura 11, aparentemente não há diferenças na intensidade de fluorescência no interior das células e que é um indicativo de que há epítomos de C3 no interior das células do paciente e do indivíduo controle em quantidade

equivalente. Além de indicativo da síntese de C3, podemos grosseiramente observar que esta molécula não é retida no interior dessas células.

Até o presente momento, não foi possível apontar qual a causa para a redução na concentração de C3 no soro do paciente em estudo. A única constatação que chegamos até este momento é que a proteína C3 está presente em concentração muito reduzida no soro do paciente em estudo e que esta proteína é funcional.

Experimentos com maior sensibilidade para avaliar a taxa de secreção desta proteína estão em andamento, mas até o momento não apresentaram resultados conclusivos.

4.2 Avaliação da Imunodeficiência de FI nos pacientes F1def2, F1def3, F1def4, F1def5, F1def6 e F1def7

4.2.1 Paciente F1def2

Indivíduo do sexo masculino que chegou ao nosso laboratório aos 9 anos de idade, apresentando púrpura desde os 4 anos de idade e 5 episódios de otite média. Investigamos as concentrações de proteínas do SC no soro do paciente e de seus familiares (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentração das proteínas do complemento nos soros da família de F1def2 por Mancini e ELISA.

Proteínas	Concentração das proteínas (µg/ml)					Valores de referência (µg/ml)	
	F1def2	Irmã	Mãe	Pai	SHN	6-13 anos	Adultos
C3	651,3	1137,1	1698,4	2299,1	1340,2	640-1470 *	1000-1500 *
C4	1030,1	385,8	1226,5	1177,4	630	99-338 *	450-600 *
FB	32,2	149,4	179	330,2	246,9	185-513 *	200-210 *
FH	229,9	508	570,2	509,3	444,4	224-1635 #	241-758 #
FI	ND	11,9	17,5	39,5	46,6	34-91 #	38-100 #

ND – não detectado.

FONTE: * Ferriani et al., 1999; # Ferreira de Paula et al., 2003, Delcolli, 2012.

Como podemos observar os soros do paciente, sua irmã e seus pais apresentaram concentrações de C3 dentro do intervalo de normalidade, a saber: do paciente 651,3 µg/ml, de sua irmã 1137,1 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para crianças entre 6 e 13 anos de idade entre 640 e 1470 µg/ml (Ferriani et al., 1999); de sua mãe 1698,4 µg/ml e de seu pai 2299,1 e o intervalo de normalidade para adultos entre 1000 e 1500 µg/ml (Ferriani et al., 1999). Já quando analisamos as concentrações de C4 observamos que o paciente assim como seus familiares apresentaram valores desta proteína acima do intervalo de normalidade, sendo assim temos: soro do paciente 1030,1 µg/ml, de sua irmã 385,8 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para indivíduos entre 6 e 13 anos de idade entre 99 e 338 µg/ml (Ferriani et al., 1999), de sua mãe 1266,5 µg/ml e de seu pai 1177,4 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para adultos entre 450 e 600 µg/ml (Ferriani et al., 1999). Quanto às concentrações de FB o soro deste paciente apresentava valores muito mais baixos que aqueles esperados em indivíduos normais, a saber: do paciente 32,2 µg/ml, de sua irmã 149,4 µg/ml sendo o intervalos de normalidade para indivíduos entre 6 e 13 anos de idade entre 185 e 513 µg/ml (Ferriani et al., 1999), de sua mãe 179 µg/ml e de seu pai 330,2 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para adultos entre 200 e 210 µg/ml (Ferriani et al., 1999). Já para a proteína FH todos os soros dos indivíduos da família apresentaram concentrações dentro do esperado em indivíduos normais, a saber: do paciente 229,9 µg/ml, de sua irmã 508 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para crianças entre 6 e 13 anos de idade entre 224 e 1635 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003), de sua mãe 570,2 µg/ml e de seu pai 509,3 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para adultos entre 241 e 758 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003). Já as concentrações da proteína FI encontraram-se alteradas nos soros dos indivíduos da família a exceção do pai, a saber: o paciente apresentou níveis indetectáveis da proteína em seu soro, o soro de sua irmã apresentou a concentração de 11,8 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para crianças entre 6 e 13 anos de idade entre 34 e 91 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003), de sua mãe 17,5 µg/ml e de seu pai 39,5 µg/ml, sendo o intervalo de normalidade para adultos entre 38 e 100 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003). Como é possível observar com base nos valores apresentados, o soro do pai apresentou valores elevados de todas as proteínas do SC, algumas vezes superiores em 50% aos valores superiores dos intervalos de normalidade para indivíduos adultos saudáveis,

é bastante provável que, em função dessa maior produção ou menor degradação dessas proteínas, o pai apresente valores normais de FI em seu soro diferentemente do que foi observado no restante dos indivíduos da família.

De acordo com o quadro acima exposto, fica evidente que o paciente apresenta deficiência de FI e deficiências secundárias de C3 e FB. Essas deficiências secundárias são devidas à ineficiência na regulação da ativação da via alternativa do SC pela falta de controle da alça de amplificação da ativação.

Também analisamos a atividade hemolítica dependente das vias alternativa ou clássica do SC no soro desses indivíduos (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade hemolítica em soros dos membros da família de F1def2 pelo método de CH50 e AP50.

Via do Complemento	F1def2	Irmã	Mãe	Pai	SHN
CH50 (U/ml)	4,1	nd	745	825,3	628,3±130,3
AP50 (U/ml)	0	nd	91,4	141,7	106,1±27,1

nd – não determinado.

FONTE: Delcolli, 2012.

Não foi possível trabalhar com o soro da irmã do paciente que já havia passado por diversos ciclos de descongelamento/congelamento o que não é adequado para a realização desse tipo de ensaio. Em nosso laboratório recentemente estabelecemos os intervalos de normalidade de CH50 (628,3±130,3 unidades de CH50/ml) e de AP50 (106,1±27,1 unidades de AP50/ml) para adultos da população brasileira. Quanto à atividade hemolítica dependente da via clássica do SC, o soro do paciente apresentou valores muito reduzidos 4,1 unidades de CH50/ml em relação ao intervalo de normalidade, embora seja uma criança e não tenha sido estabelecido o intervalo de normalidade na sua faixa etária. Os pais do paciente apresentavam valores dentro do intervalo de normalidade, sendo 745 unidades de CH50/ml no soro de sua mãe e 825,3 unidades de CH50/ml no soro de seu pai. Já quanto à atividade hemolítica dependente da via alternativa do SC, o soro do paciente não apresentou atividade hemolítica, enquanto os soros de seus pais apresentavam valores dentro do intervalo de normalidade, a saber: de sua mãe 91,4 unidades de AP50/ml, de seu pai 141,7 unidades de AP50/ml. Dessa maneira, ficou evidente que as atividades mediadas

por ambas as vias de ativação do SC estão bastante comprometidas no soro deste paciente, entretanto apresentam-se conservadas nos soros de seus pais.

Com base nesses resultados, passamos a analisar a expressão do gene *CFI* em fibroblastos do paciente, em relação à expressão em indivíduo normal (Figura 12). Todo o cDNA de *CFI* do paciente e do controle foram amplificados e não foram encontradas variações quanto ao tamanho das bandas, mas, aparentemente, há maior expressão desses produtos nas células do paciente, mais facilmente observada entre os nucleotídeos 699-1443 e 1233-1929 do cDNA de *CFI*. Observar que não há essa diferença de intensidade de bandas no controle feito com *GAPDH*. Isto sugere que não apenas o gene é expresso em fibroblastos do paciente como também a taxa de expressão é mais elevada quando comparada com indivíduo normal, um indicativo da importância e necessidade da presença do produto desse gene no organismo.

Figura 12 – Produtos de RT-PCR amplificados do cDNA do paciente Fidef2 (P) e do indivíduo normal (C).

As bandas referentes ao paciente mostram-se aparentemente mais intensas. Primers utilizados: FI 96F e 753R; FI 699F e 1443R; FI 1233F e 1929R; GAPDH F e GAPDH R.

FONTE: Delcolli, 2012.

A etapa seguinte foi purificar e sequenciar esses fragmentos de cDNA para analisar a possível existência de alterações não evidenciadas por RT-PCR. Foi encontrada uma alteração em homozigose na posição G⁶⁹³A no éxon 4 (Figura 13) que implica na substituição do resíduo de aminoácido Gly¹⁶²Asp de FI que poderia levar à geração de uma proteína truncada devido a grande diferença existente entre as cadeias laterais desses dois aminoácidos. Esta alteração localiza-se no domínio CD5 da cadeia pesada de FI, região importante para a conformação geral desta proteína reguladora.

Figura 13 – Eletroferograma da reação de sequenciamento do cDNA de *CFI* do paciente F1def2 apresentando a troca G⁶⁹³A em vermelho, o que implicaria na substituição do códon para Gly para um códon para Asp. A mesma alteração foi confirmada na fita complementar 3'-5'.

FONTE: Delcolli, 2012.

Com base nesse resultado, procuramos identificar a presença desta mutação no *CFI*, empregando DNA genômico do paciente e de seus familiares. Confirmamos a condição de homozigose desta mutação no DNA genômico do paciente e de heterozigose nos demais indivíduos de sua família (Figura 14).

Figura 14 – Eletroferogramas das reações de sequenciamento de nucleotídeos do gene *CFI*.

Indivíduo normal - homozigoto para o nucleotídeo A na posição 693; Fidef2 – homozigoto para o nucleotídeo G na posição 693; Pai, mãe e irmã do paciente- heterozigotos quanto aos nucleotídeos G e A na posição 693.

FONTE: Delcolli, 2012.

Em seguida, analisamos a presença/ausência de epítopos de FI no soro do paciente por Western Blotting, após eletroforese em gel não-desnaturante (Figura 15). Como é possível observar, não pudemos detectar a presença desta proteína, nem de possíveis produtos truncados do gene *CFI* no soro do paciente Fidef2. A presença de uma banda de, aproximadamente, 88 kDa foi observada na proteína purificada, nos soros do pai e da mãe do paciente e no SHN utilizado como controle deste experimento.

Figura 15 – Análise por *Western Blot* para detecção de FI no soro do paciente Fldef2 e de seus pais em condições não redutoras.

SHN – mistura de soros humanos normais; FI – proteína purificada 300ng (88 kDa). Todos os soros foram diluídos 1:5. Anticorpo anti- Fator I humano feito em cabra (diluição 1:1000); anticorpo anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (diluição 1:5000). Revelação foi pelo método quimioluminescente ECL.

FONTE: Delcolli, 2012.

Destacam-se na Figura 15 bandas com cerca de 140 kDa presentes em amostras de sangue, mas não em FI purificado. Pelo tamanho não podemos afirmar que sejam dímeros de FI que se formariam no soro - o que seria bastante provável acontecer também com a amostra de proteína purificada - uma vez que dímeros de FI teriam, cerca de, 180 kDa. É mais provável que o anticorpo utilizado na detecção de FI tenha reagido com algum outro componente do soro, mas não foi possível investigar qual seria este componente uma vez que encontramos essa banda também no soro do paciente.

Considerando-se a presença da mutação G693A com alteração de sentido (missense) em CFI e o fato de não ser possível observar FI no soro do paciente, decidimos analisar se a proteína chegaria a ser sintetizada pelos fibroblastos do paciente de maneira semelhante ao observado em fibroblastos de indivíduo normal (Figura 16).

Figura 16 – Localização intracelular de FI em fibroblastos de pele de Fldf2 e de indivíduo normal.

A e B – Indivíduo normal. C e D – Fldf2. A e C – Controle negativo sem anticorpo primário anti-FI feito em cabra e núcleo marcado com iodeto de propídeo. B e D – Anticorpo primário anti-FI feito em cabra e anticorpo secundário anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com FITC e núcleo marcado com iodeto de propídeo. Análise feita por microscopia confocal de varredura a laser.

FONTE: Delcolli, 2012.

Como podemos observar na Figura 16 há um padrão diferente de marcação para FI entre as células do indivíduo normal e as células do paciente. Epítomos de FI são reconhecidos por anticorpos anti-FI semelhantemente nos dois grupos de células, tanto do paciente como do indivíduo normal controle, porém esta marcação mostra-se mais difusa e em menor intensidade nas células do paciente.

O passo seguinte foi analisar se essas células do paciente Fldf2 chegariam a secretar FI de maneira semelhante às células do indivíduo normal. Realizamos um ensaio temporal de secreção em que após estímulo das células com LPS por 20 h as mesmas foram mantidas em cultura por intervalos de tempo de 6, 12, 24 e 48 horas. Após estes tempos os sobrenadantes de cultura foram coletados e as células foram lisadas para posterior análise por *Western Blot* da presença/ausência de FI. Estes resultados não foram promissores, já

que não conseguimos detectar a FI em nenhuma das amostras, porém era possível continuarmos a observar a ligação inespecífica do anticorpo anti-FI com uma proteína de aproximadamente 140 kDa. É provável que a síntese de FI seja muito reduzida nas células analisadas e mesmo com a concentração das amostras a 1/10 do volume inicial não foi possível detectar a proteína de interesse nem nos sobrenadantes de cultura nem nos lisados celulares (dados não mostrados).

4.2.2 Pacientes *Fldef3* e *Fldef4*

Estas duas pacientes são irmãs e estudadas anteriormente por Leitão et al. (1997) e ambas apresentam níveis muito baixos de FI no seu soro.

Tabela 8 – Atividade hemolítica dependente de complemento e concentração sérica de FI no soro das pacientes *Fldef3* e *Fldef4*.

Indivíduo	CH50 (U/ml)	AP50 (U/ml)	FI (µg/ml)
<i>Fldef3</i>	16,4	5,4	7,2
<i>Fldef4</i>	25,0	0	5,8
Normal	628,3±130,3	106,1±27,1	34-91 *

FONTE: * Ferreira de Paula et al., 2003, Delcolli, 2012.

Como podemos observar, todos os parâmetros analisados revelaram-se alterados nas duas pacientes (Tabela 8), detalhadamente: o intervalo de normalidade para a concentração de FI é entre 34 e 91 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003), enquanto no soro das pacientes apresentou concentrações de 7,2 µg/ml para *Fldef3* e 5,8 µg/ml para *Fldef4*. Quanto à atividade hemolítica da via alternativa, observamos que os soros das pacientes apresentaram valores muito abaixo do observado em indivíduos normais sendo, 5,4 unidades de AP50/ml para *Fldef3* e 0 (zero) para *Fldef4*, enquanto que para o intervalo de normalidade para adultos é 106,1±27,1 unidades de AP50/ml. Já quanto à atividade hemolítica dependente da via clássica, obtivemos com os soros das pacientes 16,4 unidades de CH50/ml para *Fldef3* e 25 unidades de CH50/ml para *Fldef4*, ou seja, muito abaixo do intervalo de normalidade para adultos que é de 628,3±130,3 unidades de CH50/ml.

Além das concentrações de proteínas no soro das pacientes determinadas em nosso laboratório também temos disponíveis aquelas estabelecidas por Leitão et al. (1997). O intervalo de normalidade para C4 era 100-500 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores dentro da normalidade 220 µg/ml e 180 µg/ml, respectivamente. O intervalo de normalidade para C1Inh era 200-500 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores dentro da normalidade 380 µg/ml e 300 µg/ml, respectivamente. O intervalo de normalidade para C3 era 550-1100 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores abaixo da normalidade 250 µg/ml e 250 µg/ml, respectivamente. O intervalo de normalidade para C3d era 35-70 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores indetectáveis. O intervalo de normalidade para FB era 100-500 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores abaixo da normalidade 14 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente. O intervalo de normalidade para FH era 360-680 µg/ml e FIdéf3 e FIdéf4 apresentaram valores abaixo da normalidade, sendo para ambas 275 µg/ml. Com base neste quadro podemos afirmar que as pacientes apresentavam concentrações das proteínas séricas envolvidas na via alternativa reduzidas e que o produto da inativação de C3b, C3d, dependente de FI, não foi detectado em seu soro.

Considerando os resultados acima, analisamos o gene *CFI* das pacientes para investigar a causa molecular desta deficiência. Inicialmente tentamos amplificar os mesmos produtos de RT-PCR que foram obtidos com o cDNA do paciente FIdéf2, porém não obtivemos sucesso em nenhuma tentativa talvez porque o RNAm dessas pacientes possa ser mais instável do que de outros pacientes deficientes de FI. Em razão dessas tentativas infrutíferas, partimos para a análise dos éxons de *CFI* amplificando-os a partir de DNA genômico das pacientes (Figura 17). Encontramos a substituição de base na posição C⁷⁶⁷T implicando na geração de um códon de parada prematura Arg¹⁸⁷Stop, ou seja, uma mutação sem sentido localizada no éxon 4 de *CFI*, responsável pela codificação truncada dos aminoácidos do domínio CD5 da proteína FI. A presença de um códon de parada prematura é indício para o RNAm ser rapidamente degradado no interior das células, uma vez que ao gerar um produto proteico truncado este poderia se acumular no interior das células ou nem mesmo ser produzido.

Figura 17 – Eletroferograma da reação de sequenciamento do cDNA de *CFI* da paciente Fldef3 apresentando a troca C⁷⁶⁷T. O mesmo padrão foi observado para a paciente Fldef4.

FONTE: Delcolli, 2012.

O passo seguinte foi avaliar a presença de FI no soro das pacientes pela técnica de Western Blot em condições redutoras (Figura 18). Como podemos ver na Figura 18, não observamos a presença de banda equivalente a 88 kDa correspondente à proteína FI intacta, no soro das pacientes, ao passo que ela foi observada no SHN e onde foi aplicada a proteína purificada. De forma semelhante ao que foi discutido com o soro do Fldef2 e o SHN, observamos novamente uma banda de 140 kDa, quando empregamos os soros dos pacientes Fldef3 e Fldef4.

Figura 18 – Western Blot para detecção de FI no soro dos pacientes F1def3 e F1def4.

SHN – mistura de soros humanos normais; FI – proteína purificada (300 ng), todos os soros foram diluídos 1:5. Empregamos anticorpo anti- FI humano feito em cabra (1:1000); anticorpo anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (1:5000). Eletroforese feita em condições não redutoras.

FONTE: Delcolli, 2012.

4.2.3 Paciente F1def5

Este paciente apresentava valores reduzidos de concentração de C3 no soro, sendo de 210,1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o esperado para indivíduos adultos é entre 1000 e 1500 $\mu\text{g/ml}$ (Ferriani et al., 1999). A concentração de FB deste soro estava abaixo do limite de detecção do ensaio. A concentração de FH também estava reduzida (129,1 $\mu\text{g/ml}$), enquanto o esperado em indivíduos adultos é entre 241 e 758 $\mu\text{g/ml}$ (Ferreira de Paula et al., 2003). Não foi possível detectar FI no soro do paciente. A concentração esperada em indivíduos adultos fica entre 38 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (Ferreira de Paula et al., 2003). Com base neste resultado podemos concluir que o paciente apresenta deficiência primária de FI que implica em baixos valores de C3, FB e FH em seu soro.

Tabela 9 – Concentração de algumas proteínas do SC no soro do paciente F1def5 por Mancini e ensaio hemolítico em tubos.

Indivíduos	C3 ($\mu\text{g/ml}$)	Fator B ($\mu\text{g/ml}$)	Fator H ($\mu\text{g/ml}$)	Fator I ($\mu\text{g/ml}$)	AP50 (U/ml)	CH50 (U/ml)
F1def5	210,1	<28,5	129,1	Indetectável	0	12,9
Normal (Adultos)	1000- 1500 *	228,2 *	241-758 #	38-100 #	106,1 $\pm$ 27,1	628,3 $\pm$ 130,3

FONTE: * Ferriani et al., 1999; # Ferreira de Paula et al., 2003, Delcolli, 2012.

Além disso, avaliamos a atividade hemolítica dependente do SC pelas vias alternativa e clássica (Tabela 9). Como é possível observar, o soro deste paciente não apresenta atividade hemolítica dependente da via alternativa do SC, ao passo que em indivíduo normal espera-se que cada mililitro do seu soro apresente uma atividade de 106,1 $\pm$ 27,1 unidades de AP50, aproximadamente. Já quando nos atentamos à atividade hemolítica dependente da via clássica do SC, constatamos que o soro do paciente apresenta apenas 12,9 unidades CH50, ao passo que o soro do indivíduo normal apresenta 628,3 $\pm$ 130,3 unidades CH50, ou seja, o soro deste paciente apresenta menor atividade dependente da via clássica em função da sua menor concentração sérica de C3.

Em seguida, determinamos as bases moleculares desta deficiência, amplificando e sequenciando os produtos do cDNA de CFI obtidos por RT-PCR e de CFI obtidos por PCR.

Inicialmente tentamos amplificar os fragmentos de cDNA para as mesmas regiões utilizadas para o paciente F1def2, mas não obtivemos sucesso. Neste ponto partimos para a amplificação de fragmentos correspondentes a cada um dos éxons do gene CFI, sequenciando-os em seguida. Não foi encontrada qualquer alteração na região codificadora do gene CFI.

Além disso, resolvemos avaliar a presença de epítomos de FI no soro do paciente por Western Blot em condições não desnaturantes (Figura 19). Como podemos observar não foi encontrada banda de, aproximadamente, 88 kDa equivalente à molécula de FI não reduzida, enquanto a mesma foi observada tanto no SHN quanto com a proteína purificada. Novamente observamos a banda inespecífica de 140 kDa presente no SHN e no soro de F1def5.

Figura 19 – Western Blot para avaliar a presença de FI no soro do paciente Fldéf5 em condições não-redutoras.

SHN na diluição 1:10; Fldéf5 – soro do paciente na diluição 1:5; FI – proteína FI purificada – 300 ng. Foram utilizados o anticorpo anti- Fator I humano feito em cabra na diluição 1:1000; Anticorpo feito em coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase de raiz forte na diluição 1:5000 e a revelação foi pelo método quimioluminescente ECL.

FONTE: Delcolli, 2012.

O passo seguinte foi analisar se essas células do paciente Fldéf5 chegariam a secretar FI de maneira semelhante às células do indivíduo normal, da mesma forma que foi feito com as amostras do paciente Fldéf2. Realizamos um ensaio temporal de secreção em que, após estímulo das células com LPS por 20 h, as mesmas foram mantidas em cultura por intervalos de tempo de 6, 12, 24 e 48 horas. Após estes tempos foram coletados e armazenados a -80°C os sobrenadantes de cultura e as células foram lisadas para posterior análise por *Western Blot* da presença/ausência de FI. Estes resultados não foram promissores, já que não conseguimos detectar FI em nenhuma das amostras, porém era novamente possível observar a ligação inespecífica com uma proteína de 140 kDa. É provável que a síntese de FI seja muito reduzida nas células analisadas e mesmo com a concentração das amostras a 1/10 do volume inicial não foi possível detectar a proteína de interesse nem nos sobrenadantes de cultura nem nos lisados celulares (dados não mostrados), tanto do controle quanto do paciente.

4.2.4 Pacientes Fldef6 e Fldef7

Estes indivíduos são irmãos e apresentam quadro clínico semelhante, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Estes pacientes foram enviados para nosso laboratório com suspeita de deficiência de C3 e, assim que recebemos o material, determinamos as concentrações de diferentes proteínas do SC em seu soro (Tabela 10), assim como avaliamos a atividade hemolítica dependente das vias alternativa e clássica do SC.

Tabela 10 – Concentração de diferentes proteínas do SC no soro dos pacientes Fldef6 e Fldef7 por Mancini e ensaio hemolítico realizado em tubos.

Indivíduos	C3 (µg/ml)	Fator B (µg/ml)	Fator I (µg/ml)	Fator H (µg/ml)	AP50 (U/ml)	CH50 (U/ml)
Fldef6	262,2	<28,5	Indetectável	214	0	0
Fldef7	289,6	<28,5	Indetectável	244,6	0	0
Normal (entre 6-13 anos de idade)	640-1470 *	228,2 *	34-91 #	224-1635 #	106,1±27,1	628,3±130,3

FONTE: * Ferriani et al., 1999; # Ferreira de Paula et al., 2003, Delcolli, 2012.

As concentrações de C3, FB e FI estavam alteradas nos soros dos pacientes Fldef6 e Fldef7, enquanto a concentração de FH apresentava-se com valores dentro da normalidade. A paciente Fldef6 e o paciente Fldef7 apresentavam, respectivamente, a concentração de C3 de 262,2 µg/ml e 289,6 µg/ml, enquanto o esperado em indivíduos com idade entre 06 e 13 anos de idade é de 640 a 1470 µg/ml (Ferriani et al., 1999). Os soros da paciente Fldef6 e do paciente Fldef7 apresentavam a concentração de FB abaixo dos níveis de detecção do ensaio realizado. Os soros da paciente Fldef6 e do paciente Fldef7 apresentavam, respectivamente, a concentração de FH de 214 µg/ml e 244,6 µg/ml enquanto o esperado em indivíduos com idade entre 06 e 13 anos de idade é 224 a 1635 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003). Os soros da paciente Fldef6 e do paciente Fldef7 apresentavam a concentração FI indetectável em seu soro enquanto o esperado para indivíduos entre 06 e 13 anos de idade é 34 a 91 µg/ml (Ferreira de Paula et al., 2003). Com base nestes resultados podemos concluir que os pacientes em estudo apresentam deficiência primária de FI e deficiência secundária de C3 e

FB em função da ausência/redução de regulação da ativação da alça de amplificação da via alternativa do SC.

Além disso, avaliamos a atividade hemolítica dependente do SC pelas vias alternativa e clássica. Em ambas as situações, os soros dos dois pacientes não apresentaram atividade hemolítica. O esperado de atividade hemolítica dependente da via alternativa do SC é $106,1 \pm 27,1$ unidades de AP50 e o esperado de atividade hemolítica dependente da via clássica do SC é $628,3 \pm 130,3$ unidades de CH50, ambos os valores são referência para indivíduos adultos da população brasileira.

O próximo ponto a analisar foi a síntese de RNAm de *CFI* em fibroblastos desses pacientes através de RT-PCR. Observamos que não houve amplificação de nenhuma região do cDNA, então partimos para a amplificação dos éxons do gene *CFI* por PCR que foram então enviados para sequenciamento.

Encontramos uma inserção de dois nucleotídeos TA na posição 1382 que causou alteração do quadro de leitura do RNAm de CFI e consequentemente a geração de um códon de parada prematura 13 bases a montante do ponto da inserção (Figura 20). Na Figura 20 apresentamos inicialmente a sequência conforme depositada no GenBank do NCBI e em seguida apresentamos a sequência encontrada nos pacientes Fldef6 e Fldef7. Essa inserção está localizada no éxon 11 do gene CFI, região codificadora de parte dos aminoácidos do domínio de serino protease da proteína madura.

Figura 20 – Trecho da sequência de cDNA de *CFI* em indivíduos normais e nos pacientes F1def6 e F1def7 onde está presente a inserção encontrada, a numeração dos nucleotídeos se fez de acordo com a sequência NM_000204.3 (GenBank).

Sequência normal

1336 actgctgcacattgtctcagagccagtaaaaactcatcgttacaaatatggacaacagtagactgg 1405

Sequência pacientes F1 def 6 e F1 def 7

1336 actgctgcacattgtctcagagccagtaaaaactcatcgttacaaatatggacaacagtagactgg 1403

↑
inserção

Códon de parada
prematura

Em destaque apresenta-se a inserção propriamente dita e o ponto onde ocorre a formação do códon de parada prematura. Os códons nas duas sequências formam destacados utilizando-se grifo e não-grifo, alternadamente.

FONTE: Delcolli, 2012.

Na Figura 21, o eletroferograma obtido confirma a inserção de TA na posição 1382, criando um códon de parada prematura. Além disso, podemos comprovar a inserção de duas bases TA, evidenciada na Figura 20. As duas sequências apresentadas – do indivíduo normal (A) e do paciente F1def 7 (B) estão no sentido reverso (3' → 5').

Figura 21 – Eletroferogramas originados nas reações de sequenciamento do segmento de *CFI* referente ao éxon 11 e sua adjacência.

A – Sequência obtida com material de indivíduo normal, idêntica àquela depositada como NM_000204.3 no GenBank. B – Sequência obtida com material do indivíduo F1def7 (idêntica a do indivíduo F1def6). Observa-se nitidamente a inserção de duas bases TA nesta região.

FONTE: Delcolli, 2012.

A geração de códon de parada prematura gera RNAm instável e produtos proteicos truncados no interior das células que geralmente são degradados ainda no interior das mesmas. Para avaliar se isso estava acontecendo com esses pacientes analisamos as amostras de soro por *Western Blot* (Figura 22).

Figura 22 – Western *Blot* para avaliar a presença de FI no soro dos pacientes Fldéf6 e Fldéf7 em condições não redutoras.

SHN na diluição 1:10; Fldéf6 e Fldéf7 – soro dos pacientes na diluição 1:5; FI – proteína FI purificada – 300 ng.

FONTE: Delcolli, 2012.

Podemos observar na Figura 22 que não há banda correspondente à FI com 88 kDa no soro dos pacientes, enquanto a mesma é encontrada no SHN e também no poço apenas com a proteína purificada. Novamente observamos a banda inespecífica de 140 kDa em todas as amostras de soro bruto. Com base nessas figuras pudemos concluir que os pacientes Fldéf6 e Fldéf7 não secretam a proteína FI em função da presença de um códon de parada prematura em seu RNAm. Embora plausível, não encontramos produtos truncados com tamanho menor que o esperado.

4.3 Análise da expressão gênica dependente de C3 ou FI em fibroblastos de pele utilizando material dos pacientes deficientes de C3 ou de CFI

4.3.1 Microarranjos de cDNA

Para a realização deste experimento foram cultivadas células dos seguintes pacientes deficientes de C3: C3def1, C3def2, C3def3 e deficientes de FI: FIdef1, FIdef2, FIdef3, FIdef4 e também dos indivíduos controle, N1 a N3.

Após a extração de RNA total, foram preparados os cDNAs marcados dos pacientes e dos indivíduos controle para posterior hibridação com as lâminas do arranjo. Em seguida, procedeu-se com análise estatística, onde foram considerados os genes diferentemente expressos e de maneira significativa nos pacientes deficientes de C3 os apresentados na Figura 23 e no Quadro 1.

Figura 23 – Perfil de genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de C3 em comparação com indivíduos controle. Todos os genes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram aqui representados.

Pistas: 1 e 2 – Controle 1; 3 e 4 – Controle 2; 5 e 6 – Controle 3; 9 e 12 – C3def1; 8 e 11 – C3def2; 7 e 10 – C3def3.

FONTE: Delcolli, 2012.

Quadro 1 – Quadro com os genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de C3 em comparação com indivíduos controle.

Genes alterados nos pacientes deficientes de C3	Situação de expressão do gene
Proteína hipotética FLJ37078	Estimulado
Proteína semelhante àquela associada à contactina 2	Estimulado
Receptor colinérgico, nicotínico, beta 1 (músculo)	Estimulado
Caveolina 1, proteína da cavéola, 22 kDa	Estimulado
Subunidade beta tipo 1 do proteassoma	Estimulado
2,3-bisfosfoglicerato mutase	Estimulado
Fidgetin	Estimulado
Proteína de membrana associada ao sistema Límbico	Estimulado
Membro A da família 78 com similaridade de sequência	Estimulado
Fosfatidilinositol 4 quinase, tipo 2 beta	Estimulado
Pirofosfatase/fosfodiesterase de ectonucleotídeo 2 (autotoxina)	Reprimido
Proteína ligante de domínio EH 1	Reprimido
Locus hipotético LOC401237	Reprimido
Componente de fusão de Lipoma HMGIC	Reprimido
Variante do gene ETS 6 (TEL oncogene)	Reprimido
Proteína hipotética FLJ20097	Reprimido
Serino protease ligante de manana 1 (MASP-1)	Reprimido
Proteína semelhante à angiotina 1	Reprimido

FONTE: Delcolli, 2012.

Seguiu-se uma análise estatística que considerou como genes diferentemente expressos e de maneira significativa nos pacientes deficientes de FI os apresentados na Figura 24 e no Quadro 2.

Figura 24 – Perfil de genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de FI em comparação com indivíduos controle. Todos os genes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram aqui representados.

Pistas: 1 e 2 – Controle 1; 3 e 4 – Controle 2; 5 e 6 – Controle 3; 7 e 10 – Fidef1; 8 e 11 – Fidef2; 8 e 11 – Fidef4.

FONTE: Delcolli, 2012.

Quadro 2 – Quadro com os genes estimulados e reprimidos em fibroblastos dos pacientes deficientes de FI em comparação com indivíduos controle normais.

Genes alterados nos pacientes deficientes de FI	Situação de expressão do gene
Janus quinase e proteína de interação com microtúbulo 3 - Quadro de leitura 39 do cromossomo 10	Estimulado
Proteína morfogenética de ossos 1	Estimulado
Fosfoproteína 3 do Complexo de Golgi (proteína de cobertura)	Estimulado
Proteína 149 tipo em anel	Estimulado
Fosfofrutoquinase, plaquetas	Estimulado
Proteína semelhante ao ligante de RNA associado a grânulos citotóxicos TIA1 – 1	Reprimido
Glutathione S-transferase pi	Reprimido
Proteína hipotética FLJ10357	Reprimido
Proteína semelhante à fosfoglicomutase 2 – 1	Reprimido
Membro 3 da família 19 de transportadores de soluto	Reprimido
Proteína semelhante à Sprouty 2 (<i>Drosophila</i>)	Reprimido
Geranilgeranil difosfato sintase 1	Reprimido
Subunidade alfa tipo 5 do proteassoma	Reprimido
Proteína 170 tipo dedo de anel	Reprimido
Fator 11B de biogênese peroximal	Reprimido
Variante 6 do gene ETS (TEL oncogene)	Reprimido
UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipeptídeo N-acetilaminiltransferase 10 (GalNAc-10)	Reprimido
Sintaxina 7	Reprimido

FONTE: Delcolli, 2012.

O próximo passo foi analisar os produtos dos seguintes genes para avaliar se efetivamente encontram-se no grau de expressão que foi evidenciado pelos ensaios de *microarranjos*; os genes são: *ETV6*, *MASP1*, *PI4K2B*, *PSMA5*, *PSMB1*, *JAKMIP3*, *BMP1*, *GOLPH3*, *CHRNA1*, *CAV1*, *CNTNAP2*, *PGM2L1*, *SPRY2* e *SLC19A3*. Além destes, também foram avaliadas as expressões dos genes *C3* e *CFI*. Em todas as situações, o gene constitutivamente expresso utilizado foi o *GAPDH*.

Para facilitar, apresentamos no Quadro 3 os níveis de expressão de cada um destes genes que foram selecionados para a validação dos resultados, conforme os resultados obtidos com os experimentos de *microarranjos*, comparando-se pacientes deficientes de C3

ou de FI com os indivíduos controle. Também está presente neste Quadro 3 em qual grupo de pacientes estes genes mostraram-se diferentemente expressos e, sucintamente, as funções dos produtos de cada um destes genes.

Quadro 3 – Genes diferentemente expressos nas células dos pacientes deficientes de C3 ou FI que foram utilizados nos experimentos de validação de resultados.

(continua)

Gene	Função do gene	Situação de expressão	Grupo de pacientes
Proteína semelhante àquela associada à contactina 2 (CNTNAP2)	Provavelmente tem participação na diferenciação de axônios, auxiliam na separação de subdomínios funcionais.	Estimulado	Deficientes de C3
Receptor colinérgico, nicotínico, beta 1 (músculo) (CHRN1)	Subunidade beta do receptor de acetilcolina de músculo.	Estimulado	Deficientes de C3
Caveolina 1, proteína da cavéola, 22 kDa (CAV1)	Formação da cavéola, participação no processo de endocitose.	Estimulado	Deficientes de C3
Subunidade beta tipo 1 do proteassoma (PSMB1)	Subunidade beta do proteassoma, estrutura responsável pela clivagem de peptídeos no interior da célula de maneira dependente de ATP e Ubiquitina em uma via não lisossômica.	Estimulado	Deficientes de C3
Fosfatidilinositol 4 quinase, tipo 2 beta (PI4K2B)	Responsável pela geração de Fosfatidilinositol 4-fosfato, importante precursor de moléculas de sinalização e de sustentação.	Estimulado	Deficientes de C3
Variante 6 do gene ETS (TEL oncogene) (ETV6)	Membro da família ETS de fatores de transcrição, provavelmente relacionada à hematopoiese e à manutenção da rede vascular em desenvolvimento.	Reprimido	Deficientes de C3 e FI
Serino protease ligante de manana 1 (MASP1)	Participante da via da Lectinas de ativação do SC.	Reprimido	Deficientes de C3
Janus quinase e proteína de interação com microtúbulo 3 (JAKMIP3)	Proteína de interação entre quinase Janus e microtúbulos.	Estimulado	Deficientes de FI

Quadro 3 – Genes diferentemente expressos nas células dos pacientes deficientes de C3 ou FI que foram utilizados nos experimentos de validação de resultados.

(conclusão)

Gene	Função do gene	Situação de expressão	Grupo de pacientes
Proteína morfogenética de ossos 1 (BMP1)	Protéina capaz de induzir a produção de colágeno <i>in vivo</i> .	Estimulado	Deficientes de FI
Fosfoproteína 3 do Complexo de Golgi (proteína de cobertura) (GOLPH3)	Membro da membrana periférica do Complexo de Golgi, provavelmente regulando o tráfego através desta organela.	Estimulado	Deficientes de FI
Proteína semelhante à fosfoglicomutase 2 – 1 (PGM2L1)	Atividade análoga a da glicose 1,6-bifosfato sintase.	Reprimido	Deficientes de FI
Membro 3 da família 19 de transportadores de soluto (SLC19A3)	É membro da família de folato de transportadores de micronutrientes.	Reprimido	Deficientes de FI
Proteína semelhante à <i>Sprouty 2</i> (<i>Drosophila</i>) (SPRY2)	Proteína que atua como inibidor da sinalização de receptor dependente de tirosina quinase e também necessário para a translocação de fatores de transcrição para as cristas de membranas.	Reprimido	Deficientes de FI
Subunidade alfa tipo 5 do proteassoma (PSMA5)	Subunidade alfa do proteassoma, estrutura responsável pela clivagem de peptídeos no interior da célula de maneira dependente de ATP e Ubiquitina em uma via não lisossômica.	Reprimido	Deficientes de FI

FONTE: Delcolli, 2012.

Na sequência apresentaremos os resultados obtidos em PCR em tempo real, realizados para re-avaliar os resultados previamente obtidos.

Primeiramente, observa-se uma tendência de maior expressão dos genes *CHNRB1*, *CAV1*, *PSMB1* e *PI4K2B* (Figura 25) nas células dos indivíduos deficientes em C3.

Figura 25 – Nível de expressão dos produtos gênicos *CHNRB1*, *CAV1*, *PSMB1* e *PI4K2B* em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 e em indivíduos normais avaliados por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Quando o gene *MASP1*, único gene estudado neste projeto cujo produto faz parte do SC e apresentou-se diferencialmente expresso entre o grupo de pacientes C3def e o grupo normal, com uma tendência a maior expressão nas células dos indivíduos normais (Figura 26).

Figura 26 – Nível de expressão do produto gênico *MASP1* em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Quando ao gene *ETV6*, o único gene que se mostrou alterado tanto nos indivíduos deficientes de C3 como de FI, observou-se uma tendência à supressão da sua expressão em ambos os grupos de indivíduos deficientes. Entretanto essa supressão parece ocorrer de maneira distinta em cada grupo em relação aos indivíduos controle, sendo mais evidente nos deficientes de FI (Figura 27).

Figura 27 – Nível de expressão do produto gênico *ETV6* em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de C3 ou de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Já em relação ao gene *SPRY2* observa-se uma tendência à supressão da sua expressão em células dos indivíduos deficientes de FI (Figura 28).

Figura 28 – Nível de expressão do produto gênico *SPRY2* em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Já a expressão dos genes *PSMA5* e *PGM2L1* (Figura 29) mostrou-se diferente em relação ao resultado obtido com os microarranjos, ou seja, mostrava-se suprimido em células dos pacientes por aquele experimento e, por este mostra uma tendência de estímulo à expressão em relação aos indivíduos normais.

Figura 29 – Nível de expressão do produto gênico PSMA5 e PGM2L1 em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Também os genes *GOLPH3* e *C10orf39-JAKMIP3* (Figura 30) apresentam um quadro de expressão divergente daquele observado pelo ensaio de microarranjos, ou seja, mostravam-se estimulados em células dos pacientes deficientes de FI por aquele experimento e observa-se uma tendência contrária pelo PCR em tempo real.

Figura 30 – Nível de expressão do produto gênico C10orf39 – JAKMIP3 em fibroblastos de pele de indivíduos deficientes de FI e em indivíduos normais avaliado por meio de ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se a técnica de fluoróforos intercalantes de DNA dupla-fita.

FONTE: Delcolli, 2012.

Quanto aos genes *CNTNAP2*, *BMP1* e *SLC19A3* não foi possível realizar a confirmação dos resultados por PCR em tempo real, pois não conseguimos estabelecer uma condição adequada para a realização destes experimentos.

Quanto à confirmação dos resultados obtidos a partir dos microarranjos de cDNA, ainda é necessária uma melhor compreensão da importância e significância de cada um destes genes no processo de sinalização celular. Entretanto, esses resultados são importantes para melhor compreensão das imunodeficiências de complemento e a maneira como elas podem afetar a vida do indivíduo.

É provável que o nosso reduzido grupo amostral não permita conclusões amplas a cerca dos níveis de expressão gênica para cada um destes produtos, porém permite comparar grupos e fazer algumas suposições preliminares sobre o que deve acontecer com os pacientes imunodeficientes de complemento. Uma forma de confirmar se as alterações na expressão gênica evidenciados por esse ensaio são pertinentes às imunodeficiências ou ao baixo número amostral é simular uma situação de deficiência dessas proteínas C3 e FI em células de indivíduos normais através da interferência com siRNA's. Entretanto, não houve tempo hábil durante este trabalho para a realização destes experimentos, mas seria um ótimo tema de estudos e investigação.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados 7 casos de imunodeficiências de proteínas do sistema complemento, entretanto só foi possível determinar as bases moleculares de 5 delas. Quando estudamos casos de deficiências de moléculas isoladamente é preciso ter em mente que o quadro inicial que avaliamos pode ser apenas um efeito secundário da deficiência de fato. É fundamental não afastar a possibilidade de que ainda não conhecemos (e provavelmente nunca conheceremos) todas as interações existentes entre as moléculas que compõem nosso organismo e também o organismo de outros seres vivos. Cada vez mais compreendemos que o conhecimento sobre o indivíduo deve ser analisado de maneira conjunta, não sendo possível avaliar isoladamente um quadro de deficiência. É necessário abordarmos o maior número possível de aspectos quanto à ontogênese e desenvolvimento do indivíduo. Entretanto, não podemos desmerecer a importância de avaliar e determinar as bases moleculares das imunodeficiências, já que este conhecimento é de grande valia para a compreensão tanto do funcionamento do sistema imunológico. Como quando FI foi descoberto paralelamente no soro de porquinho da Índia (Nelson et al., 1966² apud Morgan e Harris, 1999; Tamura e Nelson, 1967³ apud Morgan e Harris, 1999) e de humanos (Lachmann e Muller-Eberhard, 1968⁴ apud Morgan e Harris, 1999), chegou-se à conclusão de que eram a mesma proteína entre 1969 e 1972 (Ruddy e Austen, 1969⁵ apud Morgan e Harris, 1999; Ruddy et al., 1972⁶ apud Morgan e Harris, 1999).

É provável que existam interações entre componentes do SI e componentes de outros sistemas séricos que ainda não são conhecidas e que poderão ser identificadas com o estudo dos deficientes. Isso é evidenciado pelas relações já identificadas entre o SC e o sistema de coagulação como destacado por Amara et al.s (2008). Também podemos

² Nelson RA, Jensen J, Gigli I, Tamura N. Methods for the separation, Purification and measurement of nine componentes of hemolytic complement in guinea pig serum. *Immunochemistry*. 1966;3:111.

³ Tamura N, Nelson RA. Three naturally occurring inhibitors of componentes of complement in guinea pig and rabbit serum. *J Immunol*. 1967;99:582.

⁴ Lachmann PJ, Müller-Eberhard HJ. The demonstration in human serum of 'conglutinogen-activating factor' and its effect on the third component. *J Immunol*. 1968;100:691.

⁵ Ruddy S, Austen KF. C3 inactivator fo man. I. Hemolytic measurement by the inactivation of cell-bound C3. *J Immunol*. 1969;102:533.

⁶ Ruddy S, Hunsicker LG, Austen KF. C3b inactivator of man. 3. Further purification and production of antibody to C3b INA. *J Immunol*. 1972;108:657.

destacar um exemplo que é a geração de fragmentos de C5 por ação da trombina na ausência de C3 em camundongos (Huber-Lang et al., 2006)

É interessante destacar que essas possíveis interações entre diferentes sistemas que compõem nosso organismo são bastante factíveis quando pensamos evolutivamente e não de maneira fechada e restrita sobre o indivíduo. Frequentemente observamos que moléculas com funções semelhantes têm origem em ancestrais comuns e que muitas vezes são responsáveis pelas funções que em organismos superiores são exercidas por mais de uma molécula. Um exemplo interessante é o das proteínas que apresentam ligação tiól-éster, C3, C4 e α 2-macroglobulina em humanos, cujos genes provavelmente foram originados de um mesmo ancestral comum já presente em Cnidaria (Kimura et al., 2009), mas também em outros grupos de invertebrados como do Echinodermata (Fujita, 2002, Fujita et al., 2004). Outro exemplo de provável duplicação de um gene ancestral levando à geração de dois outros genes é o caso da evolução do gene C2/Bf desde Cnidaria também até o surgimento dos genes C2 e Bf em mamíferos (Nonaka e Kimura, 2006).

O estudo dos casos de imunodeficiências permite um melhor entendimento do funcionamento do sistema imunológico, além de trazer indícios do caminho percorrido ao longo do processo evolutivo. O estudo do material genético de deficientes de algumas proteínas do sistema imunológico, entre elas proteínas do SC, revela que mutações em regiões promotoras podem afetar a expressão de dois genes localizados próximos e que compartilham sequências de regulação de início de transcrição. Em outras situações, a alteração ocorre em um único gene que apresenta mais que um produto com funções semelhantes, como FH e FH-like 1 (Zipfel et al., 1999).

Nos três casos de pacientes C3def avaliados neste trabalho foram encontradas apenas concentrações residuais de C3 em seu soro, enquanto que os valores de outras proteínas do SC analisadas, especialmente FB, FI e FH, encontravam-se dentro dos intervalos de normalidade, sendo este um indicativo de que a deficiência era exclusivamente deste componente do soro e não de outros (Grumach et al., 1988; Reis et al., 2002; Ulbrich et al., 2001). Se fosse uma alteração nos reguladores da ativação do SC encontraríamos baixas concentrações das proteínas também.

Nos casos dos pacientes C3def1 e C3def2 foram encontradas mutações no gene *C3* que justificam a ausência da proteína em seu soro. Em ambos os pacientes, a deficiência foi causada pela geração de códons de parada prematura no cDNA. Em C3def1 foi identificada a substituição $C \rightarrow T^{2602}$, que implicava na geração do códon de parada prematura na posição $Arg \rightarrow Stop^{848}$ (Reis et al., 2004). Já em C3def2 foi identificada a substituição $G \rightarrow A^{1716}$ que implicava na geração do códon de parada prematura na posição $Lys \rightarrow Stop^{552}$ (Reis et al., 2002).

No caso do paciente C3def3 não conseguimos estabelecer a causa da ausência da proteína C3 em seu soro. Mas é sabido que deficiências em outras proteínas do SC também levam a baixos níveis séricos dessa proteína pelo excesso de consumo sem regulação de ativação ou então por maior tempo de estabilização das convertases formadas. Talvez ainda não tenhamos avaliado todas as possibilidades de mutação que poderiam ter acontecido em proteína do SC desse paciente. Talvez seja o momento de avaliar outros componentes do SC, e um indicativo seriam as proteínas Properdina e FB conforme discutidas abaixo.

Vale destacar que além do sequenciamento de toda a região codificadora da proteína, também foi realizado o sequenciamento da região até 1000 bp a jusante do ponto de início da transcrição. Não foram encontradas alterações na região anterior ao ponto de início da transcrição, mas no gene *C3* do paciente foram encontradas três mutações, todas em heterozigose sendo duas sem acarretar em troca de aminoácidos na cadeia peptídica e a terceira um polimorfismo anteriormente descrito (Botto et al., 1990). Não é possível comparar o paciente em questão com os outros C3def também estudados neste trabalho, nos quais foram encontradas modificações no gene que justificavam a ausência completa da proteína C3 em seu soro.

São conhecidos casos de ganho de função de C3 para estabilização das C3-convertases (Roumenina et al., 2012). Neste trabalho foram apresentados 14 pacientes com episódios esporádicos de aHUS (Síndrome Hemolítico-Urêmica atípica) que apresentavam a mesma mutação com mudança de sentido no cDNA *C3*, $C \rightarrow T^{481}$, que implica na mudança de resíduo de aminoácido $Arg \rightarrow Trp^{139}$ na proteína madura. Este resíduo está parcialmente exposto na superfície do domínio MG2 de C3. Os autores observaram um ganho de função nesta proteína mutada responsável por maior tempo de interação entre C3b e FB,

implicando em maior vida média da C3-convertase da via alternativa. Além disso, foi observada uma diminuição na ligação da proteína mutada com MCP, isso implica em uma diminuição da ação cofatora dessa proteína para a clivagem de C3b por ação de FI.

Também há casos de ausência da redução da ativação do SC pela perda de função das moléculas responsáveis pela ativação ou pela manutenção dela, como os casos de deficiência de properdina (van den Bogaard et al., 2000).

Além disso, são conhecidos os casos em que há excesso de ativação pela estabilização das C3-convertases, mas provocada por mutações em outras proteínas do SC, como no caso de mutações que levam ao ganho de função em FB (Goicoechea de Jorge et al., 2007). Neste trabalho foram descritas duas famílias (BRA e PER) onde foram encontradas mutações com mudança de sentido em heterozigose que implicavam com a mudança de resíduos de aminoácidos no domínio tipo A de von Willebrand da molécula de FB. Na família BRA foi encontrada a substituição C→G⁸⁵⁸, que levava à mudança de resíduo de aminoácido Phe→Leu²⁸⁶. Já na família PER foi encontrada a substituição A→G⁹⁶⁷, que levava à mudança de resíduo de aminoácido Lys→Glu³²³. Ambas as alterações ocorrem próximo ao resíduo 279 que é fundamental para a interação entre C3 e FB. Observou-se que a alteração encontrada na família BRA levava à maior rapidez na formação das C3-convertases pela maior afinidade da ligação do FB mutado à C3, entretanto o tempo para a dissociação da convertase era idêntico ao da proteína selvagem. Já no caso os tempos de formação e dissociação da C3-convertase eram idênticos aos observados nas proteínas selvagens, entretanto observou-se aumento da resistência à ação de DAF na aceleração da inativação das C3-convertases.

De maneira semelhante não foi possível estabelecer a causa molecular de uma das deficiências de FI de paciente estudado neste projeto. Para avaliar os casos de deficiência na regulação da ativação é necessária uma análise mais apurada de qual componente estaria com a função afetada. Podemos observar diversas situações em que não houve controle da ativação da via alternativa do SC levando ao consumo excessivo dos componentes do sistema. Isto foi evidenciado em diversos trabalhos que já descreveram deficiências de FI (Baracho et al., 2003; Nilsson et al., 2007, 2009) e FH (Falcão et al., 2008), ou então trabalhos que os revisaram como Reis et al. (2006).

Antes de discutir os casos de FIdéf estudados neste trabalho é interessante apresentar uma outra forma de classificação e análise das deficiências de FI que é mostrada na literatura. A deficiência do tipo I ou completa é aquela em que a proteína mutada está ausente ou presente em níveis muito baixo no soro dos pacientes, normalmente resultando na ausência da capacidade de regular a ativação do complemento. Já a deficiência do tipo II ou heterozigota é aquela em que a proteína mutada está presente em níveis normais ou parciais, mas apresenta um defeito funcional (Kavanagh et al., 2008; Nilsson et al., 2011).

Geralmente há desenvolvimento de autoimunidade nos pacientes que apresentam a deficiência do tipo II, com comprometimento renal (casos de aHUS). É válido destacar que essas deficiências parciais de FI sempre estão relacionadas com deficiências parciais em outras proteínas reguladoras da ativação do SC, como FH, MCP, C4BP. Já os pacientes com a deficiência do tipo I, apresentam maior susceptibilidade a infecções piogênicas causadas por bactérias encapsuladas. Uma possível justificativa para esse fato é que há consumo excessivo de proteínas de ativação do SC nas deficiências completas de FI, tais como C3, FB, e no caso de uma injúria ou infecção não há quantidade significativa dessas proteínas para que o sistema seja ativado. Já no caso das deficiências do tipo II, a explicação seria que estas quantidades reduzidas, mas funcionais de FI impediriam o consumo excessivo das proteínas de ativação do SC, porém, no caso de injúria haveria ativação suficiente para causar dano tecidual (Nilsson et al., 2011; Roversi et al., 2011).

O paciente FIdéf5 apresenta um quadro sugestivo de deficiência de FI, com baixos valores séricos dessa proteína, assim como de C3 e FB, e baixa atividade hemolítica mediada tanto pela via clássica como pela via alternativa. Novamente devemos ter em mente o que foi discutido em relação ao indivíduo C3def3, pode ser que não tenhamos levado em conta todas as possíveis interações entre as moléculas que interagem em nosso organismo.

Nos outros 5 pacientes deficientes de FI estudados neste trabalho (FIdéf2, FIdéf3, FIdéf4, FIdéf6 e FIdéf7) pudemos identificar alterações em seu material genético que poderiam justificar a ausência de controle da ativação do SC, em especial pela via alternativa.

Em um grupo de 4 pacientes, sendo 2 irmãs (FIdéf3 e FIdéf4) e um casal de irmãos (FIdéf6 e FIdéf7), encontramos mutações que implicavam na formação de códons de parada

prematura que não permitem a síntese ou então, levam às falhas nos processos de empacotamento e/ou secreção da proteína sintetizada. Isso implica na ausência da proteína no soro destes pacientes, entretanto não tivemos condições de determinar o que realmente provocaria esta deficiência. Isso é compatível com trabalhos da literatura que apresentam situações semelhantes (Baracho et al., 2003; Nita et al., 2011). De maneira semelhante ao que fora encontrado no trabalho (Baracho et al., 2003) que descreveu a deficiência do paciente F1def1 utilizado neste trabalho, observamos a presença de um códon de parada prematura após a inserção de dois pares de bases (1205 Δ AT) no gene *CFI* dos pacientes F1def6 e F1def7. Estes pacientes apresentam um quadro semelhante ao apresentado pela paciente F1def1. O quadro clínico da paciente F1def6 é mais grave que o de seu irmão, com infecções recidivantes. Esses pacientes apresentam um quadro pouco usual para os pacientes com deficiência completa de FI, uma vez que apresentaram complicações relacionadas à autoimunidade. Nos 31 casos revisto por Reis et al. (2006), apenas 2 apresentavam quadro clínico com desenvolvimento de autoimunidade.

No caso das pacientes F1def3 e F1def4 também encontramos a formação de um códon de parada prematura, levando à provável geração de proteína truncada e não secretada. Convém destacar que essas pacientes possuíam um irmão mais velho que também era deficiente de FI e que não fez parte desse trabalho por ter ido a óbito em função de um quadro de sepse antes que tivéssemos acesso ao material da família. Anteriormente foi apresentado um trabalho em que três gerações dessa mesma família foram analisadas quanto às concentrações de FI, C3, FH, C3d e à atividade hemolítica dependente da via clássica. Em apenas 3 dos 16 casos de indivíduos heterozigotos com deficiência parcial de FI observou-se o desenvolvimento de autoimunidade (Grumach et al., 2006), o que corrobora com o proposto por Nilsson et al. (2011) e Roversi et al. (2011) quanto às complicações decorrentes de uma deficiência nos reguladores da ativação do SC em heterozigose.

Outro fato não mostrado, mas observado em todos os pacientes que com geração de códon de parada prematura no gene *CFI* foi uma alteração no formato dos fibroblastos de pele. Geralmente estas células são afiladas e alongadas, mas no caso de fibroblastos dos pacientes F1def1, F1def3, F1def4, F1def6 e F1def7 estas células apresentam um formato

quadrado, com muito mais citoplasma que os fibroblastos de indivíduos saudáveis. Proteínas truncadas ou com defeito na secreção celular podem se agregar e precipitar no interior de células e causar estresse do retículo endoplasmático e aumento do tamanho de suas cisternas. Este fato foi observado também em nosso laboratório em fibroblastos de paciente deficiente de FH (Albuquerque, 2011). Em comunicação pessoal com a médica que acompanha as pacientes F1def3 e F1def4, fomos informadas que elas não apresentam alterações de desenvolvimento e que sua pele é normal ao exame clínico a olho nú. Isso não foi observado nos fibroblastos dos pacientes F1def2 e F1def5, nos quais não encontramos alterações genéticas que implicavam com a geração de códon de parada prematura. Essa observação poderia trazer luz a novas abordagens experimentais que poderiam explorar melhor interações entre FI e proteínas de citoesqueleto.

No paciente F1def2 encontramos uma mutação com alteração de sentido, que poderia levar à geração de uma proteína truncada, já que leva à substituição de um resíduo de glicina (aminoácido polar neutro) por outro de ácido aspártico (aminoácido ácido) na posição 162. Esses dois resíduos de aminoácidos possuem cadeias laterais (em negrito nas fórmulas) significativamente diferentes entre si, sendo a cadeia lateral da glicina formada por um único átomo de hidrogênio [**H**-CH(NH₂)-COOH] – enquanto a cadeia lateral do ácido aspártico é muito mais complexa [**HOOC-CH₂-CH**(NH₂)-COOH]. É bastante provável que a mudança na cadeia lateral e, conseqüentemente da polaridade do aminoácido interfira no dobramento da proteína. Trabalhos que buscavam determinar a participação de cada domínio da molécula FI na interação com seus substratos, assim como com seus cofatores investigaram as conseqüências que mutações pontuais e dirigidas teriam na secreção e na funcionalidade da molécula. Nesses trabalhos foram geradas sequências com mutações em regiões relativamente próximas àquela encontrada no paciente e mostrou-se que não ocorre a secreção dessas proteínas por células HEK293 transfectadas com construções mutantes (Kavanagh et al., 2008; Nilsson et al., 2009, 2010b, 2011; Roversi et al., 2011).

Recentemente foram descritos dois casos de deficiência de FI, no primeiro encontrou-se uma deleção de dois pares de bases (133-134delAA) que levava à geração de um códon de parada prematura 11 bp a montante da deleção e no outro havia a substituição de um nucleotídeo que levava à substituição de um resíduo de aminoácido no peptídeo

(Asp²⁸⁹Val). Apenas as células HEK 293 contendo a sequência selvagem eram capazes de sintetizar e secretar FI (Nita et al., 2011). A abordagem apresentada nesse trabalho poderia servir de inspiração para novos experimentos tanto com o gene dos pacientes F1def estudados neste trabalho, especialmente para o paciente F1def2, que apresentou apenas uma troca de par de bases e levou à mudança do resíduo de aminoácido Gly¹⁶²Asp na proteína FI. A realização de experimentos desse tipo seria fundamental para estabelecer se o problema quanto à molécula FI nesse paciente é exclusivamente de secreção ou se a proteína nem chega a ser sintetizada *in vivo*.

De acordo com os resultados obtidos com o material dos pacientes F1def2, F1def3, F1def4, F1def6 e F1def7 é possível avaliar que diferentes mutações com modificações distintas na estrutura da proteína podem implicar em ausência desta molécula nas células dos indivíduos afetados, assim como em seus soros. É possível avaliar que mutações com alteração de sentido terão um efeito mais ou menos drástico de acordo com a região da proteína que for afetada. Se a alteração ocorrer em uma região altamente conservada haverá maiores interferências na produção e secreção da proteína, entretanto alterações em regiões menos conservadas talvez acarretem menor interferência na síntese e secreção de FI. Outro ponto que merece destaque é o tipo de mutação que acontece no gene em estudo, se são trocas de nucleotídeos ou a geração de códons de parada prematura.

Nilsson et al. (2010b) mostraram que mutações pontuais que levam à geração de códons de parada prematura implicam na possibilidade de síntese da proteína FI truncada. Entretanto há pouquíssima (Trp¹²⁷Stop, Trp⁴⁶⁸Stop) ou nenhuma secreção (Leu²⁸⁹Stop, Arg⁴⁵⁶Stop, Thr⁵²⁰Stop, Trp⁵²⁸Stop) de FI para o meio extracelular. Já mutações com troca de resíduo de aminoácido em FI podem implicar tanto na secreção em nível semelhante (Pro³²Ala, His¹⁶⁵Arg, Asp⁵⁰¹Asn) ao produto selvagem, como também à secreção em níveis reduzidos (Cys²⁵Phe, Met¹²⁰Val, Asn¹³³Ser, Ala²²²Gly, Arg²⁹⁹Trp), não é possível observar nenhuma correlação entre a região em que está localizada a mutação e os níveis de secreção da proteína em relação aos domínios que a compõem. A troca Gly¹⁶²Asp encontrada em F1def2 é outro exemplo de mutação pontual que pode implicar em redução na concentração sérica da proteína FI.

Também é importante destacar um ponto que é de extrema importância para os pacientes que estudamos e que foram objeto de estudo deste trabalho, assim como de outros do gênero. Uma abordagem futura possível com esses pacientes é com terapia gênica baseada na substituição de genes defeituosos por outros normais. Dessa forma, os pacientes que já tiveram as bases moleculares de suas deficiências estabelecidas são candidatos a essas novas terapias que poderão trazer um ganho em qualidade de vida para si e seus familiares. É fundamental destacar, que ao estudar imunodeficiências nem sempre trazemos benefícios ou melhores condições de vida para o paciente, apenas estamos satisfazendo nossa curiosidade de entender melhor o funcionamento do organismo humano, de como as interações com o ambiente e com indivíduos de outras espécies podem interferir no nosso desenvolvimento físico e intelectual.

Conforme observado pelos resultados obtidos com os experimentos de avaliação da expressão gênica por microarranjos, as imunodeficiências de C3 e FI implicam não apenas em alterações clínicas nos pacientes, mas também em modificações quanto aos genes que são expressos e na intensidade desta expressão. Isso traz à mente a possibilidade de que, ao menos, alguma das alterações clínicas que observamos nos pacientes é devida a essas diferenças de expressão gênica, não podemos excluir isso apenas pelo fato de que ainda não estudamos um número suficientemente elevado de indivíduos para confirmar esta observação.

Neste trabalho também avaliamos se o fato do indivíduo apresentar imunodeficiência interfere na expressão gênica em fibroblastos de pele humana. Até o presente momento não há nenhum trabalho na literatura que faz esse tipo de correlação e pelo presente trabalho vemos que há uma tendência a haver alteração no nível de expressão de alguns genes nos indivíduos afetados em relação a indivíduo saudáveis. Seria interessante avaliar um número maior de indivíduos do que já visto nesse trabalho, mas não tivemos acesso ao material de outros pacientes, entretanto não podemos deixar de considerar este trabalho válido uma vez que analisamos o material dos pacientes brasileiros. Outra forma de avaliar se a alteração observada é decorrente da ausência das proteínas seria realizar experimentos de RNA de interferência tanto para *C3* como para *CFI* e comparar os resultados com os obtidos com o material dos deficientes. Por duas vezes tentamos realizar

os experimentos com RNA de interferência, entretanto não obtivemos uma quantidade de RNA suficiente para avaliar a efetividade do bloqueio e comparar os resultados com aqueles observados com o RNA dos pacientes.

Este é mais um indício de que não conhecemos todas as interações existentes em nosso organismo e que investigações cada vez mais abrangentes e integradoras. Uma busca detalhada nas bases de dados sobre trabalho científico revelou que não existem trabalhos publicados que mostrem possíveis relações entre imunodeficiências e avaliação da expressão gênica. Desta forma podemos afirmar que este trabalho apresenta um ponto de vista inovador no que diz respeito à forma de avaliar as imunodeficiências e sua influência no funcionamento do organismo.

Um trabalho com abordagem aproximada foi realizado por Sta et al. (2010) onde se comparou a velocidade de regeneração de nervos periféricos após lesão em camundongos suficientes e deficientes de C6, e observou-se que os nervos dos camundongos deficientes regeneravam-se mais rapidamente e que nos sítios de regeneração dos nervos dos animais deficientes havia maior expressão de reguladores da ativação do SC como C4BP, CR2, CFH e CFH-like 1. É provável que este aumento da expressão de reguladores da ativação do SC seja para evitar um acúmulo de anafilatoxinas localmente, o que levaria ao maior recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e poderiam comprometer o processo de regeneração tecidual.

Além disso, foram realizadas abordagens que buscavam utilizar as técnicas de microarranjos de cDNA como exames diagnósticos para imunodeficiências primárias a partir de biomarcadores para essas alterações genéticas (Keerthikumar et al., 2009a, b). Também foram publicados muitos trabalhos que buscavam apresentar diferenças quanto à expressão gênica e perfil proteico entre células contaminadas com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV-1) e células saudáveis (Imbeault et al., 2011; Olivares et al., 2009; Salgado et al., 2011).

Como foi evidenciado nos experimentos de microarranjos de cDNA, a ausência de expressão de um determinado gene pode interferir na expressão de um grande número de outros genes cujos produtos que podem ou não ter relações com o produto do gene com expressão reduzida. Análises metagenômicas poderiam evidenciar possíveis pontos de

interligação entre os genes que se apresentam como diferentemente expressos, ou seja, evidenciaria situações que até o momento não fomos capazes de observar com nossos conhecimentos sistêmicos e baseados em evidências.

Cada vez mais surgem evidências da necessidade de retrabalharmos nossos resultados experimentais por meio de elementos de meta-análise, como geração de rede gênica, proteômica e metabolômicas que incorporem um número cada vez maior de saberes experimentais e observacionais. Não podemos abandonar uma fonte de conhecimento tão valiosa e que já está à nossa disposição em função dos resultados experimentais que já dispomos.

Estudar pacientes imunodeficientes é interessante na medida em que podemos realizar novas inferências quanto a interações entre moléculas do próprio organismo como também podemos propor novos mecanismos de prevenção a doenças e de terapia para os pacientes. Foram propostos um novo esquema de vacinação para os deficientes que apresentem baixos níveis séricos de C3, utilizando a vacina meningocócica conjugada tetravalente A, C, U e W-135 com reforços a cada dois meses; suplementação com as proteínas FH e C1-INH purificada de uma coleção de soros humanos normais para os deficientes dessas proteínas; suplementação com as proteínas C2 e MBL recombinantes produzidas em células humanas para os deficientes dessas proteínas, além de suplementação de proteínas do SC com transfusão de plasma nos deficientes de FH (revisto em Skattum et al., 2011).

Nesse trabalho pudemos observar que há tendência a expressão diferencial de genes nos fibroblastos dos deficientes de C3 e FI em relação aos fibroblastos de indivíduos normais. Gostaria de destacar o gene *ETV6* que se apresentou suprimido nos dois grupos de deficientes, este é um membro da família de fatores de transcrição ETS que participa do processo de hematopoiese e manutenção da rede vascular em desenvolvimento. Outro gene que merece destaque é *MASP1*, único gene cujo produto é membro do SC que se mostrou suprimido no grupo dos pacientes deficientes de C3. Tentamos resgatar uma provável rede gênica da qual participassem os genes diferencialmente expressos, entretanto não encontramos relação entre eles.

6 CONCLUSÕES

Um resumo dos resultados obtidos quanto aos deficientes está apresentado no Quadro 4.

Quadro 4 – Quadro com as alterações moleculares encontradas nos pacientes-alvo deste estudo.

Pacientes	Iniciais	Modificações
C3def 3	PIC	C ³⁶⁴ G troca Arg ¹⁰² Gly; mutação silenciosa G ²⁴⁸¹ C (Val ⁸⁰⁷); mutação silenciosa A ⁴⁹⁵⁶ G (Val ¹⁶³²)
Fldef 2	EIT	G ⁶⁹³ A, troca Gly ¹⁶² Asp
Fldef 3	Vi	C ⁷⁶⁷ T, troca Arg ¹⁸⁷ Stop
Fldef 4	Va	C ⁷⁶⁷ T, troca Arg ¹⁸⁷ Stop
Fldef 5	AF	Sem modificações.
Fldef 6	EC	Inserção 1382ΔAT, códon de parada prematura 13 bases a montante
Fldef 7	IRC	Inserção 1382ΔAT, códon de parada prematura 13 bases a montante

FONTE: Delcolli, 2012.

6.1 Paciente C3def3

O paciente C3def3 apresenta baixa concentração de C3 em seu soro embora não tenha sido evidenciada a base molecular dessa deficiência. As alterações encontradas no gene C3, a) substituição C³⁶⁴G que leva à substituição de resíduo Arg¹⁰²Gly previamente descrita por Botto et al. (1990) como sendo polimorfismo; b) substituição silenciosa G²⁴⁸¹C que leva à manutenção do resíduo Val⁸⁰⁷ e c) substituição silenciosa A⁴⁹⁵⁶G que implica na manutenção do resíduo Pro¹⁶³², não são suficientes para justificar essa deficiência (Quadro 4). Será necessário avaliar os genes CFB, CFP e CFD para concluir se não há outras proteínas interferindo na concentração de C3 no soro do paciente;

6.2 Avaliação da Imunodeficiência de FI nos pacientes Fldef2, Fldef3, Fldef4, Fldef5, Fldef6 e Fldef7

Os pacientes Fldef3, Fldef4, Fldef6 e Fldef7 apresentam valores muito baixos de concentração de FI em seu soro, causados pela formação de códon de parada prematura no

gene *CFI*. Consequentemente, RNAm de *CFI* truncados são rapidamente degradados no interior das células, antes de serem traduzidos;

O paciente F1def2 apresenta concentração sérica de FI indetectável. Observamos uma substituição de G⁶⁹³A que leva à substituição de resíduo Gly¹⁶²Asp no domínio CD5 (Quadro 4) que não deve interferir com o funcionamento da proteína FI. Também observamos menor concentração dessa proteína no interior de fibroblastos do paciente ao empregar microscopia confocal. Até o momento não podemos afirmar qual a causa da ausência de FI no soro do paciente;

O paciente F1def5 apresenta concentração sérica de FI indetectável, mas não identificamos a causa dessa deficiência e não foram observadas alterações no gene *CFI* que justifiquem essa deficiência;

6.3 Análise da expressão gênica dependente de C3 ou FI em fibroblastos de pele utilizando material dos pacientes deficientes de C3 ou de *CFI*

Com base nos resultados obtidos através do microarranjos de cDNA e da validação dos mesmos através de PCR em tempo real podemos concluir que há uma tendência à alteração nos níveis de expressão gênica em fibroblastos de indivíduos deficientes de C3 e de FI quando comparados com indivíduos normais. Porém não podemos afirmar que essa tendência ocorre em função da ausência destas proteínas ou por causa do pequeno número amostral, isso poderia ser esclarecido com ensaios de interferência por siRNA's.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS⁷

- Aksamit RR, Falk W, Leonard EJ. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. *J Immunol.* 1981 Jun;126(6):2194-9.
- Albuquerque JAT. Papel da Arg 127 na conformação estrutural e secreção de Fator H, importante proteína reguladora da via alternativa do sistema complemento. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.
- Amara U, Rittirsch F, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huver-Lang M. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:71-9.
- Baracho GV, Nudelmann V, Isaac L. Molecular characterization of homozygous hereditary factor I deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2003 Feb;131(2):280-6.
- Bengtsson H. Aroma: An R Object-oriented Microarray Analysis environment. *Mathematical Statistics, Centerf for Mathematical Sciences.* Sweden: Lund University; 2004. (Mathematical Sciences, 18).
- Bentley DR, Porter RR. Isolation of cDNA clones for human complement component C4. *PNAS.* 1984 Feb;81(4):1212-5.
- Bonnin AJ, Zeitz HJ, Gewurz A. Complement factor I deficiency with recurrent aseptic meningitis. *Arch Intern Med.* 1993 Jun 14;153(11):1380-3.
- Botto M, Fong KY, So AK, Koch C, Walport, MJ. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J Exp Med.* 1990;172:1011-7.
- Botto M, Fong KY, So AK, Barlow R, Routier R, Morley BJ, Walport MJ. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a partial gene deletion. *PNAS.* 1992 Jun;89(11):4957-61.
- Botto M. C3. In: Morley BJ, Walport MJ. *The complement factsbook.* London: Academic Press; 2000.
- Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Wurzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol.* 2009;46:2774-83.

⁷ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*. 1992;256(5053):105-7.
- Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol*. 2001;167(1):163-72.
- Choi NH, Nakano Y, Tobe T, Mazda T, Tomita M. Incorporation of SP-40,40 into the soluble membrane attack complex (SMAC, SC5b-9) of complement. *Int Immunol*. 1990;2(5):413-7.
- Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*. 1985;37:151-216.
- De Bruijn MH, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *PNAS*. 1985 Feb;82(3):708-12.
- Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon D. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquires immunity. *Science*. 1996;271:348-50.
- Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol*. 2010 Apr;47(7-8):1500-6.
- Dheilly NM, Haynes PA, Raftos DA, Nair SV. Time course proteomic profiling of cellular responses to immunological challenge in the sea urchin, *Heliocidaris erythrogramma*. *Dev Comp Immunol*. 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.006> [2012 Apr 10].
- Dunkelberger D, Song WC. Complement and its role in innate and adaptative immune responses. *Cell Res*. 2010;20:34-50.
- Ehrengruber MU, Geiser T, Deranleau DA. Activation of human neutrophils by C3a and C5a. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion and respiratory burst. *FEBS Lett*. 1994 Jun 13;346(2-3):181-4.
- Ekdahl KN, Nilsson UR, Nilsson B. Inhibition of factor I by diisopropylfluorophosphate. Evidence of conformational changes in factor I induced by C3b and additional studies on the specificity of factor I. *J Immunol*. 1990 Jun 1;144(11):4269-74.
- El-Lati SG, Dahinden CA, Church MK. Complement peptides C3a- and C5a- induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol*. 1994 May;102(5):803-6.
- Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schopf E, Norgauer J, Kapp A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol*. 1994a Mar;24(3):518-22.

- Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood*. 1994b Jun 1;83(11):3324-31.
- Endo Y, Takahashi M, Fujita T. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*. 2006;211(4):283-93.
- Falcão DA, Reis ES, Paixão-Cavalcante D, Amano MT, Delcolli MI, Florido MP, Albuquerque JA, Moraes-Vasconcelos D, Duarte AJ, Grumach AS, Isaac L. Deficiency of the human complement regulatory protein factor H associates with low levels of component C9. *Scand J Immunol*. 2008 Oct;68(4):445-55.
- Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem J*. 1988 May 15;252(1):47-54.
- Ferreira de Paula P, Barbosa JE, Junior PR, Ferriani VPL, Latorre MRDO, Nudelmann V, Isaac L. Ontogeny of complement regulatory proteins - concentrations of factor H, factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and in adults. *Scand J Immunol*. 2003;58:572-7.
- Ferriani VP, Barbosa JE, de Carvalho IF. Complement hemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titers in healthy children. *Acta Paediatr*. 1999 Oct;88(10):1062-6.
- Fishelson Z, Kozer E, Sirhan A, Katz Y. Distinction between processing of normal and mutant C3 within human skin fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1999 Mar 29;29(3):845-55.
- Florido MPC, Ferreira de Paula P, Isaac L. Simple method to distinguish between primary and secondary C3 deficiencies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Mar;10(2):216-20.
- Fong KY, Botto M, Walport MJ, So AK. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics*. 1990;7:579-86.
- Fremaux-Bacchi V, Dragon-Durey M-A, Blouin J, Vigneau C, Kuypers D, Boudailliez B, Loirat C, Rondeau B, Fridman WH. Complement factor I: a susceptibility gene for atypical hemolytic uremic syndrome. *J Med Genet*. 2004;41:e84.
- 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')₂ of rabbits IgG antibody: the generation of C3- and C5-cleaving enzymes on the immune precipitate. *Immunochemistry*. 1977 Jan;14(1):25-30.
- Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):346-53.

- Fujita T, Endo Y, Nonaka M. Primitive complement system – recognition and activation. *Mol Immunol*. 2004a;41:103-11.
- Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*. 2004b;198(1):185-202.
- Genel F, Sjöholm AG, Skattum L, Truedsson L. Complement factor I deficiency associated with recurrent infections, vasculitis and immune complex glomerulonephritis. *Scan J Infect Dis*. 2005;37(8):615-8.
- Gigli I, Porter RR, Sim RB. The unactivated form of the first component of human complement, C1. *Biochem J*. 1976 Sep 1;157(3):541-8.
- Grace HJ, Brereton-Stiles GG, Vos GH, Schonland M. A family with partial and total deficiency of complement C3. *S Afr Med J*. 1976 Jan 31;50(5):139-40.
- Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Godillo J, Carreras L, Arranz EA, Garrido CA, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Morgan BP, Rodríguez de Cordoba S. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PNAS*. 2007 Jan 2;104(1):240-5.
- González-Rubio C, Ferreira-Cerdán A, Ponce IM, Arpa J, Fóntan G, López-Trascasa M. Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol*. 2001 Nov;58(11):1923-8.
- Grumach AS, Vilela MM, Gonzalez CH, Starobinas N, Pereira AB, Dias-da-Silva W, Carneiro-Sampaio MM. Inherited C3 deficiency of the complement system. *Braz J Med Biol Res*. 1988;21(2):247-57.
- Grumach AS, Leitão MF, Arruk VG, Kirschfink M, Condino-Neto A. Recurrent infections in partial complement factor I deficiency: evaluation of three generations in a Brazilian family. *Clin Exp Immunol*. 2006 Feb;143(2):297-304.
- Helmy KY, Katschke KJ Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott M, Diehl L, Scales SS, Ghilardi N, Campagne ML. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 2006 Mar 10;124:915-27.
- Huang JL, Lin CY. A hereditary C3 deficiency due to aberrant splicing of exon 10. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Nov;73(2):267-73.
- Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):682-7.

- Ikaha R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Statist*. 1996;5:299-314.
- Imbeault M, Ouellet M, Giguère K, Bertin J, Bélanger D, Martin G, Tremblay MJ. Acquisition of host-derived CD40L by HIV-1 in vivo and its functional consequences in the B-cell compartment. *J Virol*. 2011 Mar;85(5):2189-200.
- Isenman DE. C4. In: Morley BJ, Walport MJ. *The complement factsbook*. London: Academic Press; 2000.
- Kavanagh D, Kemp EJ, Mayland E, Winney RJ, Duffield JS, Warnick G, Richards A, Ward R, Goodship JA, Goosdhip TH. Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):2150-5.
- Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, Goodship JA, Fremeaux-Bacchi V, Remuzzi G, Goodship TH, Atkinson JP. Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*. 2008 Jan;45(1):95-105.
- Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Hijikata A, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ahmed M, Rani S, Selvan LD, Somanathan DS, Ray D, Bhattacharjee M, Gollapudi S, Ramachandra YL, Bhadra S, Bhattacharyya C, Imai K, Nonoyama S, Kanegane H, Miyawaki T, Pandey A, Ohara O, Mohan S. RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases. *Nucleic Acids Res*. 2009a Jan;37:D863-7.
- Keerthikumar S, Bhadra S, Kandasamy K, Raju R, Ramachandra YL, Bhattacharyya C, Imai K, Ohara O, Mohan S, Pandey A. Prediction of candidate primary immunodeficiency disease genes using a support vector machine learning approach. *DNA Res*. 2009b Dec;16(6):345-51.
- Kimura A, Sakaguchi E, Nonaka M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Immunobiology*. 2009;214(3):165-78.
- Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol*. 1997 May 15;158(10):4525-8.
- Kretzschmar T, Jeromin A, Gietz C, Bautsch W, Dlos A, Kohl J, Rechkemmer G, Bitter-Suermann D. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur J Immunol*. 1993 Feb;23(2):558-61.
- Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1733-45.

- Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*. 1988;9(12):387-93.
- 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.
- Lee Y, Haas KM, Gor DO, Ding Y, Karp DR, Greenspan NS, Poe JC, Tedder TF. Complement component C3d-antigen complexes can either augment or inhibit B lymphocyte activation and humoral immunity in mice depending on the degree of CD21/CD19 complex engagement. *J Immunol*. 2005 Dec 15;172(12):8011-23.
- Leitão MF, Vilela MM, Rutz R, Grumach AS, Kirschfink M, Condino-Neto A. Complement factor I deficiency in a family with recurrent infections. *Immunopharmacology*. 1997 Dec;38(1-2):207-13.
- Lepow IH, Naff GB, Todd EW, Pensky J, Hinz CF. Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. *J Exp Med*. 1963 Jun 1;117:983-1008.
- Lett-Brown MA, Leonard EJ. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J Immunol*. 1977 Mar;118(3):815-8.
- Li K, Fazekasova H, Wang N, Peng Q, Sacks SH, Lombardi G, Zhou W. Functional modulation of human monocytes derived DCs by anaphylatoxins C3a and C5a. *Immunobiology*. 2012 Jan;217(1):65-73.
- Lou XY, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Crew KM, Li MD. Gene-based analysis suggests association of the nicotinic acetylcholine receptor beta-1 subunit (CHRNA1) and M1 muscarinic acetylcholine receptor (CHRM1) with vulnerability for nicotine dependence. *Hum Genet*. 2006 Oct;120(3):381-9.
- Malhotra R, Lu J, Holmskov U, Sim RB. Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97(2):4-9.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965 Sep;2(3):235-54.
- Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Teraï I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*. 2000;165:2637-42.
- Matsuyama W, Nakagawa W, Takashima H, Murunaga F, Sano Y, Osame M. Molecular analysis of hereditary deficiency of the third component of complement (C3) in two sisters. *Intern Med*. 2001a Dec;40(12):1254-8.

- Matsuyama W, Nakagawa W, Takashima H, Murunaga F, Sano Y, Osame M. Identification of a novel mutation (Tyr1081Ter) in sisters with hereditary component C3 deficiency and SLE-like symptoms. *Hum Mutat.* 2001b;17(1):79.
- Medof ME, Lam T, Prince FM, Mold C. Requirement for human red blood cells in inactivation of C3b in immune complexes and enhancement of binding to spleen cells. *J Immunol.* 1983 Mar;130(3):1336-40.
- Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology.* 1990 Sep;71(1):1-9.
- Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med.* 1998 Dec 21;188(12):2313-20.
- Morgan BP, Campbell AK. The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. *Biochem J.* 1985 Oct 1;231(1):205-8.
- Morgan BP, Harris CL. Complement regulatory proteins. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1999. 382 p.
- Morikis D, Lambris JD. The building blocks of the complement system. In: Morikis D, Lambris JD. Structural biology of the complement system. Boca Raton, FL, USA: Taylor e Francis Group; 2005. p. 1-19.
- Morley BJ. Factor I. In: Morley BJ, Walport MJ. The complement factsbook. London: Academic Press; 2000.
- Morley BJ, Walport MJ. The complement factsbook. London: Academic Press; 2000. 228 p.
- Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:503-28.
- Murakami Y, Iminichi T, Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology.* 1993 Aug;79(4):633-8.
- Nataf S, Davoust N, Ames RS, Barnum SR. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):4018-23.
- Nguyen VC, Tosi M, Gross MS, Cohen-Haguenauer O, Jegou-Foubert C, De Tand MF, Meo T, Frezal J. Assignment of the complement serine protease genes C1r and C1s to chromosome 12 region 12p13. *Hum Genet.* 1988 Apr;4(78):363-8.

- Nilsson SC, Karpman D, Vaziri-Sani F, Kristoffersson AC, Salomon R, Provot F, Fremeaux-Bacchi V, Trouw LA, Bloom AM. A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic uremic syndrome does not affect the function of factor I in complement regulation. *Mol Immunol*. 2007 Mar;44(8):1835-44.
- Nilsson SC, Trouw LA, Renault N, Miteva MA, Genel F, Zelazko M, Marquat H, Muller K, Sjöholm AG, Truedsson L, Villoutreix BO, Bloom AM. Genetic, molecular and function analysis of complement factor I deficiencies. *Eur J Immunol*. 2009;39:310-23.
- Nilsson SC, Kalchishkova N, Trouw LA, Fremeaux-Bacchi V, Villoutreix BO, Bloom AM. Mutations in complement factor I as found in atypical hemolytic uremic syndrome lead to either altered secretion or altered function of factor I. *Eur J Immunol*. 2010a Jan;40(1):172-85.
- Nilsson SC, Nita I, Månsson L, Groeneveld TWL, Trouw LA, Villoutreix BO, Bloom AM. Analysis of binding sites on complement factor I that are required for its activity. *J Biol Chem*. 2010b Feb 26;285(9):6235-45.
- Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol*. 2011;48:1611-20.
- Nita IM, Genel F, Nilsson SC, Smart J, Truedsson L, Choo S, Blom AM. Molecular characterization of two novel cases of complete complement inhibitor Factor I deficiency. *Mol Immunol*. 2011;48:1068-72.
- Nonaka M, Kimura A. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics*. 2006;58:701-13.
- Olivares I, Ballester A, Lombardia L, Dominguez O, López-Galíndez C. Human immunodeficiency virus type 1 chronic infection is associated with different gene expression. In MT-4, H9 and U937 cell lines. *Virus Res*. 2009 Jan;139(1):22-31.
- Ottonello K, Corcione A, Tortolina G, Airoidi I, Albesiano E, Favre A, D'Agostino R, Malavasi F, Pistoia V, Dallegri F. rC5a directs the in vitro migration of human memory and naïve tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6510-7.
- Papamichail M, Gutierrez C, Embling P, Johnson P, Holborow EJ, Pepys MB. Complement dependence of localization of aggregated IgG in germinal centers. *Scan J Immunol*. 1975;4(4):343-7.
- Paramaswara B, Minta JO. An initiator element and a proximal cis-acting sequence are essential for transcriptional activation of the complement factor I (CFI) gene. *Gene*. 1999;237:71-80.

Parat MO. The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;273:117-62.

Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med*. 1974 Jul 1;140(1):126-45.

Pettigrew HD, Teuber SS, Gershwin ME. Clinical significance of complement deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:108-23.

Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*. 1954 Aug 20;120(3112):279-85.

Ponce-Castro IM, González-Rubio C, Delgado-Cerviño EM, Abarategui-Garrido C, Fontán G, Sánchez-Corral P, López-Trascasa M. Molecular characterization of complement Factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol*. 2008;45:2764-71.

Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*. 2011 Dec;39(6):1619-27.

Reis ES, Baracho GV, Lima, AS, Farah CS, Isaac L. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a premature stop codon. *J Clin Immunol*. 2002 Nov;22(6):321-30.

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

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

Reis ES, Barbuto JA, Issac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology*. 2007 Jan 3;212(3):151-7.

Roversi P, Johnson S, Caesar JJE, McLean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, Morgan BP, Harris CL, Sim RB, Lea SM. Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *PNAS* 2011 Aug 2;108(31):12839-44.

Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey MA, Bordereau P, Bigot S, Hue C, Satchell SC, Mathieson PW, Mousson C, Noel C, Sautes-Fridman C, Haubwachs-Mecarelli L, Atkinson JP, Lionet A, Fremeaux-Bacchi V. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain-of-function. *Blood*. 2012 Jan 13. Available from: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2012/01/13/blood-2011-10-383281.full.pdf> [2012 Apr 05].

- Salgado M, López-Romero P, Callejas S, López M, Labarga P, Dopazo A, Soriano V, Rodés B. Characterization of host genetic expression. Patterns in HIV-infected individuals with divergent disease progression. *Virology*. 2011 Mar 1;411(1):103-12.
- Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):227-35.
- Sim RB, Sim E. Autolytic fragmentation of complement components C3 and C4 and its relationship to covalent binding activity. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;421:259-76.
- Singer L, Whitehead WT, Akama H, Katz Y, Fishelson Z, Wetsel RA. Inherited human complement C3 deficiency. An aminoacid substitution in the beta-chain (ASP549 to ASN) impairs C3 secretion. *J Biol Chem*. 1994 Nov 11;269(45):28494-9.
- Singer L, Van Hee M, Lokki ML, Kramer J, Borzy MS, Wetsel RA. Inherited complement C3 deficiency: reduced mRNA and protein levels in a Laotian kindred. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Dec;81(3):244-52.
- Silverstein AM. A history of immunology. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1989. 422 p.
- Sjöholm AG, Jönsson G, Braconier JH, Sturfelt G, Truedsson L. Complement deficiency and disease: an update. *Mol Immunol*. 2006;43:78-85.
- Skattum L, van Deuren M, van der Poll T, Truedsson L. Complement deficiency states and associated infections. *Mol Immunol*. 2011;48:1643-55.
- Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3(1). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/sagmb.2004.3.1/sagmb.2004.3.1.1027/sagmb.2004.3.1.1027.xml> [2010 Mar 23]
- Sta M, Fluiter K, Ramaglia V, Wolterman R, Morgan BP, Baas F. Comparison of expression profiles from wildtype and C6 deficient peripheral nerves after crush injury. *Mol Immunol*. 2010 Aug;47(13):2276.
- Tamura N, Shimada A, Chang S. Further evidence for immune cytolysis by antibody and the first eight components of complement in the absence of C9. *Immunology*. 1972 Jan;22(1):131-40.
- Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000 Aug 7;192(3):359-66.

- Terado T, Nonaka MI, Nonaka M, Kimura H. Conservation of the modular structure of complement factor I through vertebrate evolution. *Dev Comp Immunol*. 2002 Jun;26(5):403-13.
- Than NG, Romero R, Erez O, Kusanovic JP, Tarca AL, Edwin SS, Kim JS, Hassan SS, Espiniza J, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Friel L, Gotsch F, Vaisbuch E, Camacho N, Papp Z. A role for mannose-binding lectin, a component of the innate immune system in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Oct;60(4):333-45.
- Totan M. Recurrent pneumococcal meningitis in homozygous C3 deficiency. *Indian J Pediatr*. 2002 Jul;69(7):625-6.
- Trevisan GL, Rassi DM, Baião AMT, Sandrin-Garcia P, Mello SS, Tamia-Ferreira MC, Junta CM, Fachin AL, Marques MMC, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Using cDNA microarrays to identify human CD19⁺ B cell gene products (ESTs) originated from systemic lupus erythematosus susceptibility loci. *Autoimmunity Rev*. 2006;5:319-23.
- Tsiftoglou SA, Willis AC, Li P, Chen X, Mitchell DA, Rao Z, Sim RB. The catalytically active serine protease domain of human complement factor I. *Biochemistry*. 2005 Apr 26;44(16):6239-49.
- Tsukamoto H, Horiuchi T, Kokuda H, Nagae S, Nishizaka H, Sawabe T, Harashima S, Himeji D, Koyama T, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y, Hashimura C, Kitano E, Furue M, Harada M. Molecular analysis of a novel hereditary C3 deficiency with systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 29;330(1):298-304.
- Ulbrich AG, Florido MPC, Nudelman V, Reis ES, Baracho GV, Isaac L. Hereditary human complement C3 deficiency owing to reduced levels of C3 mRNA. *Scand J Immunol*. 2001 Jun;53(6):622-6.
- van den Bogaard R, Fijen CA, Schipper MG, de Galan L, Kuijper EJ, Mannens MM. Molecular characterization of 1- Dutch properdin type I deficient families: mutation analysis and X-inactivation studies. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jul;8(7):513-8.
- Vyse TJ, Späth PJ, Davies KA, Morley BJ, Phillipe P, Athanassiou P, Giles CM, Walport MJ. Hereditary complement factor I deficiency. *QJM* 1994;87:385-01.
- 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 Feb 15;97(4):925-33.
- Vorup-Jensen T, Peterson SV, Hansen AG, Poulsen K, Schwaebler W, Sim RB, Reid KBM, Davis SJ, Thiel S, Jensenius JC. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1- complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol*. 2000 Aug;165(4):2093-100.

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

Wlodarska I, Mecucci C, Baens M, Marynen P, van den Berghe H. ETV6 gene rearrangements in hematopoietic malignant disorders. *Leik Lymphoma*. 1996 Oct;23(3-4):287-95.

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*. 2002 Feb;30(4):e15.

Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the por-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological and functional similarities. *Science*. 1986 Jul 11;233(4760):184-90.

Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Meri S. The factor H protein family. *Immunopharmacology*. 1999 May;42(1-3):53-60.