

**Axel Gustavo Ulbrich**

**Estudo de um caso de deficiência do componente  
C3 do sistema complemento humano**

Dissertação apresentada ao Depto. de Imunologia,  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de mestre em imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

**São Paulo**

**1999**

# Sumário

## *Lista de abreviações*

## **Resumo**

<b>I. Introdução</b>	1
<b>1.1. O sistema complemento</b>	1
1.1.1. Ativação	1
1.1.1.1. Via clássica	1
1.1.1.2. Via alternativa	3
1.1.1.3. Via da lectina	4
1.1.1.4. O complexo de ataque à membrana	5
1.1.2. Proteínas regulatórias	8
1.1.3. Receptores	12
<b>1.2. Funções biológicas dependentes da ativação do sistema complemento</b>	14
1.2.1. A lise osmótica mediada pelo complexo de ataque à membrana	14
1.2.2. Produção de fatores quimiotáticos	15
1.2.3. Produção de anafilatoxinas	16
1.2.4. Solubilização, eliminação e inibição da precipitação de imunecomplexos circulantes	17
1.2.5. Produção de opsoninas	18
1.2.6. Sistema complemento e a produção de anticorpos	19
<b>1.3. O componente C3</b>	20
1.3.1. Estrutura gênica e protéica	20
1.3.2. Biossíntese	21
1.3.3. Polimorfismo	21
<b>1.4. Imunodeficiências</b>	22
1.4.1. Deficiências de proteínas do sistema complemento	23
1.4.1.1. Deficiência de C3	26

1.4.1.1.1. Primária	26
1.4.1.1.2. Secundária	29
1.4.1.1.3. Adquirida	30
<b>II. Objetivos do trabalho</b>	<b>33</b>
<b>III. Probando e métodos</b>	<b>34</b>
3.1. Resumo clínico	34
3.2. Obtenção dos soros humanos	36
3.3. Obtenção de soro de coelho anti-C3 humano	36
3.4. Imunodifusão radial quantitativa	37
3.5. Imunodifusão dupla bi-dimensional	38
3.6. Radioimunoensaio competitivo	38
3.7. Ensaio hemolítico para dosagem de CH <sub>50</sub>	39
3.8. Ensaios hemolíticos comparativos	40
3.8.1. Via clássica	41
3.8.1.1. Ensaio em tubos	41
3.8.1.2. Ensaio em placas	41
3.8.2. Via alternativa	42
3.9. Ensaio quimiotático	42
3.10. Ensaio de fagocitose de <i>Candida albicans</i>	44
3.11. Extração de DNA genômico de leucócitos sangüíneos humanos	45
3.12. Técnica de PCR para análise dos alelos de C3	46
3.13. Cultura de fibroblastos de pele	47
3.14. Estimulação dos fibroblastos e marcação metabólica com metionina- S <sup>35</sup> e cisteína-S <sup>35</sup>	47
3.14.1. Precipitação das proteínas marcadas com TCA	48
3.15. Imunoprecipitação de C3 e fator B	49
3.16. Gel de poliacrilamida com SDS para proteínas	50

3.17. Tratamento estatístico dos dados obtidos	51
3.17.1. Ensaio quimiotáticos	51
3.17.2. Ensaio de fagocitose	51
<b>IV. Resultados</b>	<b>52</b>
4.1. Testes clínicos	52
4.2. Concentrações plasmáticas de proteínas do sistema complemento	56
4.3. Atividades hemolíticas dependentes das vias clássica e alternativa	64
4.3.1. Via clássica	64
4.3.2. Via alternativa	66
4.3.3. Atividade hemolítica do soro do probando, pela via clássica, após adição de C3 purificado	67
4.4. Geração de fatores quimiotáticos derivados da ativação do sistema complemento	69
4.5. Geração de opsoninas pela ativação do sistema complemento	73
4.6. Alotipagem genética de C3	76
4.7. Síntese e secreção de C3 por fibroblastos estimulados	80
<b>V. Discussão</b>	<b>82</b>
<b>VI. Conclusões</b>	<b>95</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>96</b>
<b>Abstract</b>	<b>110</b>
<b>Anexo 1:</b> Números totais de <i>C. albicans</i> vivas ou mortas, em fagócitos normais, após opsonização com soro normal e do probando	112
<b>Anexo 2:</b> Reagentes utilizados	113
<b>Anexo 3:</b> Soluções utilizadas	116

# Lista de Abreviações

aa: aminoácido

Ac: anticorpo

Ag: antígeno

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

C1inh: inibidor de C1 esterase

C3aR: receptor para C3a

C4bp: proteína ligante de C4b

C5a<sub>desArg</sub>: molécula de C5a sem a Arg C-terminal

C5aR: receptor para C5a

C<sub>H</sub>: região constante da cadeia pesada de Ig

CR: receptor de complemento

CVF: fator de veneno de cobra

DAF: fator de aceleração de decaimento

fB: fator B

fD: fator D

fH: fator H

fI: fator I

GNMP: glomerulonefrite membranoproliferativa

LPS: lipopolissacarídeo

MAC: complexo de ataque à membrana

MASP: serino-protease associada a MBL

MBL: lectina ligante de manose

MCP: proteína cofatora de membrana

NeF: fator nefritogênico

RIA: radioimunoensaio

SHN: soros humanos normais

SLE: lúpus eritematoso sistêmico

## Resumo

O objetivo deste estudo foi o de caracterizar a deficiência de C3 numa criança brasileira (L.A.S.) vítima de infecções bacterianas recidivantes e vasculite, cujos pais são consangüíneos em segundo grau. Para tanto, dosamos as proteínas do sistema complemento, avaliamos as funções do sistema imune dependentes da ativação do sistema complemento e investigamos a síntese e secreção de C3 pelos seus fibroblastos.

As concentrações séricas de C3, C4, dos fatores I, H e das classes de Ig foram determinadas por imunodifusão radial. A presença de C5, C6, C7, C8 e C9 foi avaliada por imunodifusão dupla. A migração de leucócitos humanos normais, através de filtros de nitrocelulose, em resposta a vários tratamentos de uma mistura de 46 soros normais (SHN) e soro do probando foi realizada em câmaras de Boyden. A ingestão e morte de *C. albicans* por leucócitos normais foram avaliadas após opsonização com SHN e do probando. A alotipagem genética de C3 envolveu amplificação de DNA genômico com "primers" específicos para os alelos que codificam para as isoformas S ("slow") e F ("fast") de C3 e análise dos produtos após eletroforese em géis de agarose. Culturas de fibroblastos do probando, sua mãe e de um indivíduo normal foram estimuladas com LPS e incubadas com 250  $\mu$ Ci de met-S<sup>35</sup> e cis-S<sup>35</sup>. Após 3 e 24 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e imunoprecipitados com soro de coelho policlonal anti-C3 (ou anti-fB, como controle). Os produtos foram analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e autorradiografia.

As concentrações de C3 no soro da mãe mostraram-se abaixo de 50% do normal (317,3  $\mu$ g/mL), enquanto que em L.A.S. não se detectou C3 por imunodifusão, mas apenas por RIA, revelando 0,15  $\mu$ g/mL. As atividades hemolíticas dependentes das vias clássica e alternativa foram nulas no probando. Todas as outras proteínas do sistema complemento analisadas estavam presentes em concentrações normais, em todos os indivíduos estudados. As concentrações de IgM total estavam elevadas em três determinações no probando e a de IgG4 mostrou-se muito reduzida. Outras classes de Ig e subclasses de IgG estavam normais. Outros parâmetros analisados, como números totais de LT, LB, células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK estavam normais no probando.

A migração de leucócitos, em resposta ao soro do probando ativado com LPS de *E. coli* foi de  $39,1 \pm 4,6$   $\mu\text{m}$ , enquanto que com SHN esta foi de  $53,9 \pm 3,5$   $\mu\text{m}$ . O valor da migração obtida ao se utilizar soro do probando foi comparável à gerada por SHN inativado a  $56^\circ\text{C}$  ( $42,2 \pm 1,7$   $\mu\text{m}$ ).

A ingestão e morte de *C. albicans* por fagócitos normais mostrou-se diminuída quando os fungos foram opsonizados com soro do probando, em comparação com aqueles opsonizados com SHN; em um dos experimentos, a porcentagem de morte foi estatisticamente semelhante à observada após tratamento de *C. albicans* com meio Hank sem soro, enquanto que, no outro experimento, ela foi semelhante a SHN inativado por aquecimento.

A alotipagem dos alelos de C3 revelou a presença de dois alelos C3S no probando, enquanto sua mãe apresentou um alelo C3S e um C3F e seu irmão mais novo, que possui concentrações normais de C3 e é clinicamente normal, também possui dois alelos C3S.

O C3 sintetizado pelos fibroblastos da mãe do probando revelou cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de tamanhos normais, mas de intensidades diferentes das presentes no sobrenadante de indivíduo normal. O produto de 3 h era mais tênue e o de 24 h era mais intenso que o normal. Não foram observados vestígios das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  no sobrenadante de fibroblastos do probando.

Nós concluímos que, em consequência de uma incapacidade de sintetizar C3, o probando não é capaz de exercer as funções imunológicas dependentes do sistema complemento, resultando em uma maior susceptibilidade a infecções. A alotipagem de C3 não foi informativa quanto ao padrão de herança da deficiência. As bases moleculares da deficiência serão, mais tarde, investigadas.

# I. Introdução

## 1.1. O sistema complemento

O sistema complemento é um conjunto de proteínas, tanto plasmáticas quanto presentes em superfícies celulares, que medeiam importantes funções das respostas imune e inflamatória e para a homeostase do organismo. Esse sistema é ativado, por três vias diferentes, por reações que incluem a clivagem proteolítica seqüencial de seus componentes, em que uma proteína, quando ativada, é capaz de catalisar a ativação de outra proteína. Dessa forma, ocorre uma grande amplificação do sinal inicial, com geração, cada vez maior, de produtos derivados da ação proteolítica. Os estímulos que desencadeiam a ativação do sistema são ubíquos e ele está, portanto, em constante atividade. Essa atividade é mantida num nível basal por meio do rigoroso controle exercido por proteínas regulatórias, evitando o dano potencial às células do próprio organismo e o consumo exagerado dos componentes na forma nativa.

### 1.1.1. Ativação

#### 1.1.1.1. Via clássica

A via clássica é iniciada principalmente pela ligação do componente C1 aos domínios C<sub>H</sub>3 da região Fc de IgM ou C<sub>H</sub>2 de algumas subclasses de IgG complexadas com antígenos, o que ativa esse componente. Das subclasses de IgG humana, IgG3 é a que melhor se liga a C1, seguida de IgG1 e IgG2 (IgG4 não se liga a C1) (SCHUMAKER *et al.* 1987).

O C1 é, na verdade, um complexo multimolecular (cuja manutenção é dependente de Ca<sup>+2</sup>) formado por três proteínas diferentes: C1q (uma unidade), C1r e C1s (duas unidades de cada). O C1q é formado por seis subunidades, cada uma composta por três



cadeias polipeptídicas que se combinam formando, na região N-terminal, uma estrutura helicoidal semelhante ao colágeno e na região C-terminal, seis “cabeças” globulares. As seis tríplexes hélices da molécula associam-se entre si apenas na região N-terminal (“cauda”). Essa proteína complexa não possui atividade enzimática, ao contrário de C1r e C1s, que são serino-proteases de cadeia única, capazes de promover a hidrólise de ligações peptídicas.

Para que ocorra a ativação do complexo C1, pelo menos duas das seis cabeças globulares de C1q devem ligar-se às moléculas de anticorpos. Contudo, na ausência de antígenos, é rara a ocorrência de duas moléculas de IgG próximas o bastante para tanto. As regiões Fc de complexos pentaméricos de IgM também não estão disponíveis para a ligação de C1q, quando este anticorpo não se encontra ligado ao Ag (DODDS *et al.* 1978). Com a ligação, o C1q sofre uma mudança conformacional, que induz a auto-ativação de C1r por catálise intramolecular. Este, por sua vez, cliva C1s, que, ao ativar-se, é capaz de clivar C4 e C2. O mecanismo envolvido em todas essas reações proteolíticas é a clivagem de uma ligação Arg-Ile nos substratos (DOBÓ *et al.* 1999).

São gerados, com a clivagem de C4, dois fragmentos: C4a e C4b. O C4b irá ligar-se covalentemente (em questão de milissegundos) a uma membrana celular ou outra superfície próxima, em consequência da exposição de um grupamento tiol-éster intramolecular e altamente reativo (HARRISON *et al.* 1981). Após a clivagem, esse C4b expõe o sítio de ligação para C2, que será agora clivado por C1s, dando origem a dois fragmentos. O maior deles, C2a, permanece ligado ao C4b.

O complexo formado, C4b2a, é a C3 convertase clássica, que é responsável pela clivagem de C3. No fragmento C2a da convertase reside o sítio de ligação para C3 e a atividade catalítica de serino-protease que irá clivar C3 (na presença de  $Mg^{+2}$ ), gerando C3a e C3b. Após essa clivagem, a ligação tiol-éster intramolecular da cadeia  $\alpha$  é quebrada e ocorre a exposição de um grupamento carbonila altamente reativo, com uma vida média de algumas dezenas de milissegundos, capaz de formar ligações covalentes com grupamentos amino ou hidroxila de moléculas presentes em inúmeras superfícies, celulares ou não (SIM *et al.* 1981; VIK *et al.* 1991). Além do C4, essa ligação tiol-éster está presente, também, em  $\alpha_2$ -macroglobulina e os aminoácidos que participam diretamente da

formação dessa ligação são muito conservados nestas proteínas (assim como os aa vizinhos a estes, porém não diretamente envolvidos na ligação) (HARRISON *et al.* 1981). O C3b servirá de ligante para o próximo componente, C5, que também será clivado por C2a. Por essa razão, o complexo C4b2a3b constitui a C5 convertase clássica.

### 1.1.1.2. Via alternativa

Um pequeno grau de ativação pela via alternativa ocorre continuamente, com deposição direta de C3b em células do próprio organismo, na ausência de complexos antígeno-anticorpo ou de outros componentes do complemento. Esse C3b é rapidamente inativado por proteínas regulatórias, perdendo a capacidade de participar das C3 e C5 convertases. Além disso, a constituição molecular dessas membranas desfavorece a ligação dos outros componentes necessários para dar continuidade à ativação. Alguns compostos específicos, assim como a composição química geral, de superfícies de microorganismos patogênicos, no entanto, favorecem a ligação de C3b e o protegem da ação das proteínas regulatórias. Outros compostos ligam eficientemente C3b e permitem a sucessão da via alternativa (na presença de  $Mg^{+2}$ ), como complexos de IgA (que não ativam a via clássica), células infectadas por alguns tipos de vírus, células neoplásicas, células apoptóticas e eritrócitos de certas espécies animais, entre outros (MORGAN 1990). As superfícies que ativam eficientemente a via alternativa são chamadas de superfícies aceptoras (LACHMANN 1991).

A iniciação da ativação da via alternativa ocorre quando a molécula  $C3(H_2O)$ , gerada pela hidrólise espontânea da ligação tiol-éster de C3, liga-se a fator B. Essa molécula pode exercer a função do C3b numa C3 convertase alternativa de fase fluida. Esta convertase,  $C3(H_2O)Bb$ , se forma quando o fB é clivado por fator D. O decaimento dessa enzima, tanto intrínseco como extrínseco (causado por proteínas regulatórias), é muito rápido, de modo que seu funcionamento depende em grande parte da ligação da properdina, uma molécula da família das pentraxinas, que a estabiliza estendendo sua vida média (LACHMANN e HUGHES-JONES 1984).

Com a geração de C3b, este irá fixar-se a uma superfície aceptora e a ele pode ligar-se fB (que será clivado por fD). A C3 convertase ligada a essa superfície (C3bBb) irá gerar mais C3b, que, por sua vez, irá formar mais C3 convertases. Essa regulação positiva é chamada de alça de amplificação da via alternativa. O complexo C3bBb3b<sub>n</sub>, é a C5 convertase alternativa, nesta o C5 liga-se a C3b e é clivado por Bb, numa reação semelhante à mediada por C2a na C3 convertase clássica. De fato a homologia, funcional e de seqüência, entre C2 e fB é muito grande (FARRIES e ATKINSON 1991).

### 1.1.1.3. Via da lectina

Esta via é semelhante à via clássica, porém independe de anticorpos. A lectina ligante de manose, MBL, recentemente isolada de soro humano (KAWASAKI *et al.* 1983), liga-se a resíduos de oligossacarídeos (manose e N-acetil glicosamida) presentes em paredes celulares de várias espécies de microorganismos. Esta lectina associa-se a duas serino-proteases específicas identificadas até o momento, MASP-1 e MASP-2, semelhantes funcional e estruturalmente a C1r e C1s. A clivagem de C2 e C3 é efetuada por MASP-1 (SATO *et al.* 1994), enquanto que a clivagem de C4 é feita pela porção C-terminal de MASP-2, após a mesma ter sido ativada por clivagem (THIEL *et al.* 1997). Como consequência é formada uma C5 convertase funcional.

MASP-1 ligada a MBL é capaz de clivar C3 diretamente, *in vitro*, porém, aparentemente, não fB (MATSUSHITA e FUJITA 1995). Enquanto existe a suspeita de que MBL/MASP-1/2 seja capaz de ativar a via alternativa, não se sabe, ao certo, se esse fato tem importância fisiológica.

Outras lectinas humanas demonstraram ser capazes de ativar o sistema complemento, como proteína C-reativa, que é sintetizada principalmente no fígado e cujos níveis plasmáticos elevam-se em até 1.000 vezes durante a fase aguda. Essa proteína também está implicada no reconhecimento de açúcares presentes na superfície de microorganismos patogênicos (KAPLAN e VOLANAKIS 1974). Foi sugerido que esta e outras lectinas estariam envolvidas em uma via geral de ativação do sistema complemento,

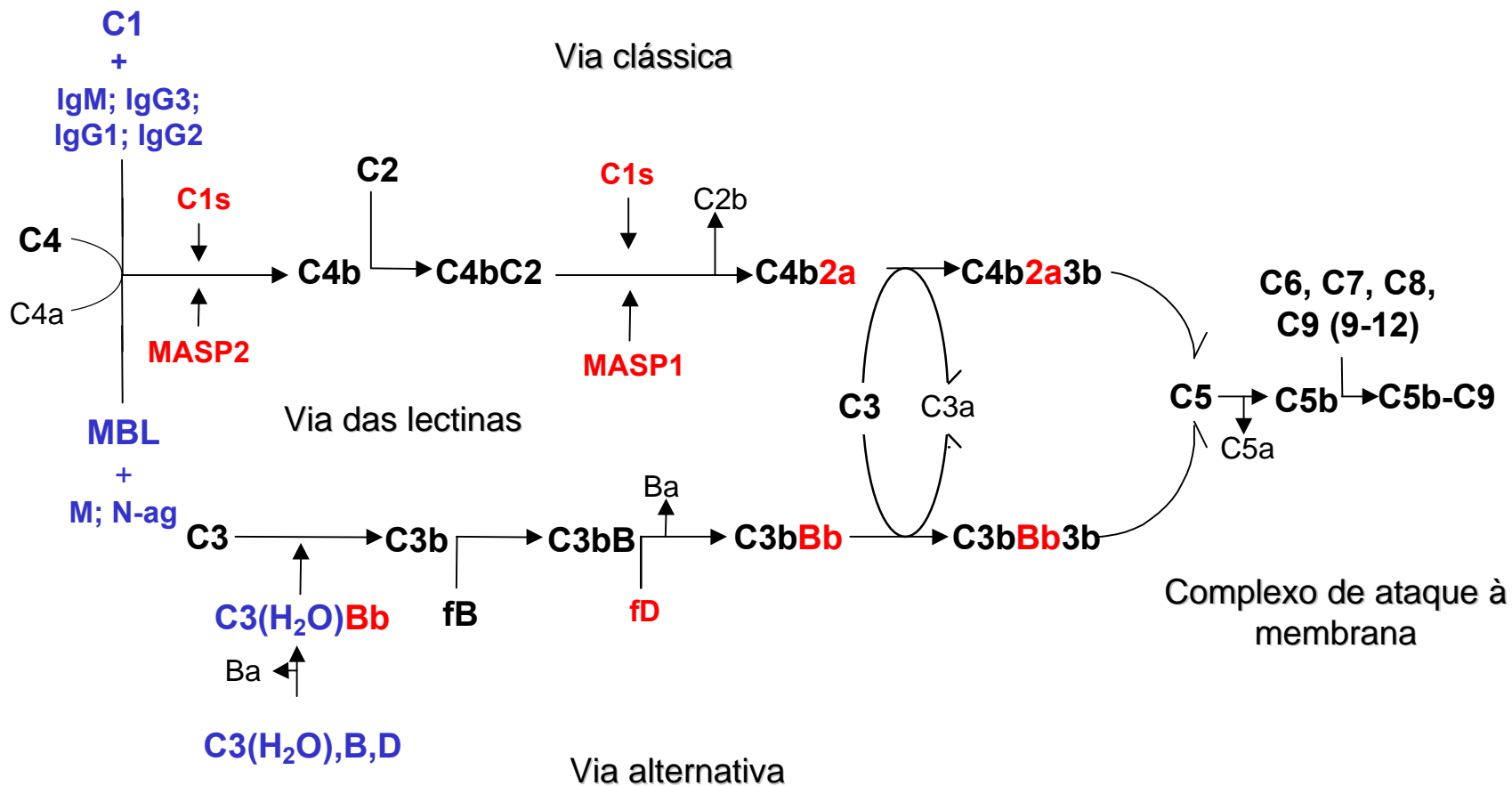
que seria importante no controle de uma infecção bacteriana, durante o estabelecimento da fase aguda (HOLMSKOV *et al.* 1994).

#### 1.1.1.4. O complexo de ataque à membrana

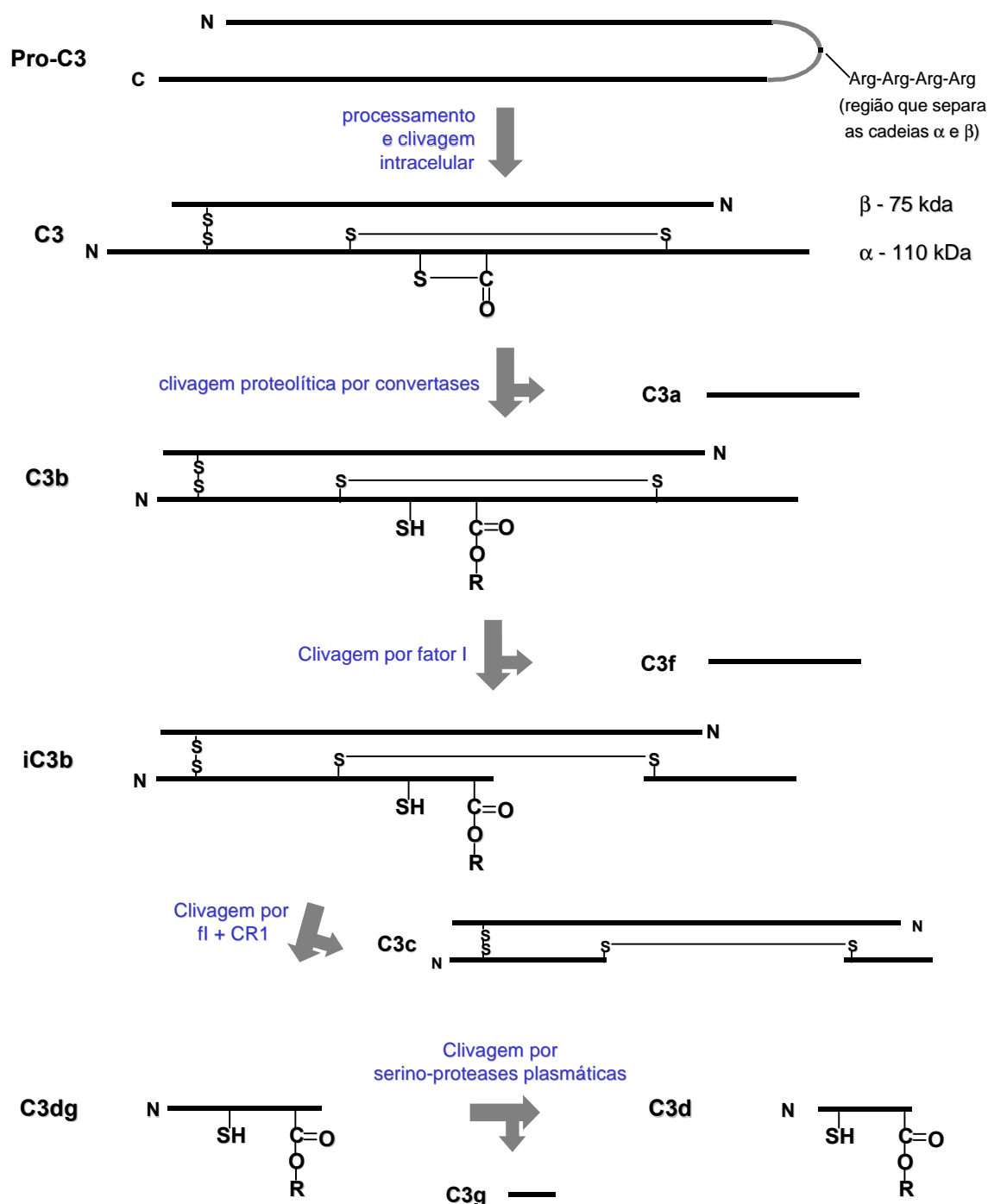
Com a formação das C5 convertases ocorre a clivagem de C5 com a geração de um fragmento solúvel, C5a, que se difunde a partir do local de clivagem e um que permanece associado às convertases, C5b. A este último liga-se o C6, que, ao fazê-lo, expõe um sítio de ligação para C7. Com a ligação deste último componente produz-se uma mudança conformacional no complexo, que passa a apresentar regiões hidrofóbicas, desprendendo-se da convertase e ligando-se a uma membrana próxima. A vida média do C5b-7 na fase fluida é muito curta e os complexos que não encontram uma membrana para se fixar sofrem rápida hidrólise ou são inativados por reguladores solúveis; nessa fase, mesmo a ligação de C8 e C9 elimina a capacidade do complexo de interagir com uma membrana. Os complexos fixados à uma superfície, por outro lado, retêm a capacidade de ligar C8 e C9 por períodos de tempo mais longos (embora também sejam alvo de proteínas regulatórias presentes nas membranas) (HÄNSCH 1988).

O complexo fixado na membrana não causa, até então, grandes danos à célula, pois não está inserido profundamente na bicamada lipídica. Com a ligação de C8, formam-se pequenos poros através da membrana (de aproximadamente 10 Å de diâmetro), desestabilizando-a. O C8 é formado por três cadeias: uma  $\beta$ , pela qual ele se liga ao C7; uma  $\alpha$  e uma  $\gamma$ , que são muito semelhantes e que se inserem na bicamada lipídica pela exposição de sítios hidrofóbicos, após a ligação da cadeia  $\beta$  (WHALEY e LEMERCIER 1993).

A lise osmótica da célula só ocorre, efetivamente, após a ligação de vários monômeros de C9 ao complexo. O mecanismo pelo qual o C9 se insere na membrana é semelhante ao C8; uma região da molécula liga-se às cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  e outra região insere-se na membrana trespassando-a. Com a ligação de novas moléculas de C9 (9-12 unidades ou, eventualmente, até 18) a sítios de ligação recém-expostos no C9 já ligado, formam-se poros de aproximadamente 10 nm de diâmetro na membrana (WHALEY e LEMERCIER 1993).



**Figura 1.1. Ativação do sistema complemento e formação do complexo de ataque à membrana**  
 Os iniciadores das vias estão em azul; as proteínas ou fragmentos com ação catalítica estão em vermelho. **M:** manose; **N-ag:** N-acetil glicosamina.



**Figura 1.2. Representação das moléculas de pró-C3, C3 maduro e dos produtos gerados pela clivagem por C3 convertases e por proteínas regulatórias**

Modificado de MORGAN e HARRIS (1999).

### 1.1.2. Proteínas regulatórias

Cada etapa do sistema complemento está sujeita a um rigoroso controle por parte de inibidores de fase fluida ou ligados à membrana. Sem esse controle ocorreria um rápido consumo de seus componentes, pela ativação do sistema, mesmo na ausência de um estímulo externo. Além disso células do próprio hospedeiro tornar-se-iam, facilmente, alvos para a deposição do MAC e subsequente lise.

O primeiro passo no controle da ativação da via clássica é feito pelo inibidor de C1 esterase, C1inh, que é um inibidor de serino-proteases atuando também sobre outras proteases, como plasmina, ativador de plasminogênio e sobre os fatores XIa e XIIa da cascata da coagulação. O C1inh inibe a atividade proteolítica de C1 sobre C2 e C4 por dissociar os seus componentes, ligando-se irreversivelmente a C1r e C1s e liberando o C1q, que permanece ligado ao antígeno (pelas porções Fc de Igs). Essa inibição ocorre momentos após a ativação do C1, de modo que sua vida média é muito curta (AGOSTONI 1989).

Grande parte das proteínas regulatórias do sistema complemento atua sobre os componentes C3 e C4, ou sobre as C3 convertases. O principal regulador desses componentes é o fator I, uma proteína composta por duas cadeias unidas por pontes dissulfeto. Na cadeia  $\alpha$  reside a atividade catalítica de serino-protease, responsável pela clivagem de C3b e C4b, nas suas respectivas cadeias  $\alpha$ . Na cadeia  $\beta$  encontram-se os domínios responsáveis pela ligação do substrato e dos cofatores de membrana ou solúveis, dos quais depende a atividade catalítica dessa enzima (WHALEY e LEMERCIER 1993).

Na presença dos cofatores solúveis, fator H e C4bp, o fI é capaz de clivar C3b e C4b, respectivamente, gerando iC3b e iC4b, ainda ligados covalentemente à membrana (com a liberação de pequenos fragmentos solúveis: C3f, C4c e C4d). O iC3b não apresenta mais os sítios de ligação para fB e C5, não sendo mais capaz de participar das C3 ou C5 convertases. O mesmo ocorre com o iC4b, que perde o sítio de ligação para C2. Esses cofatores apresentam, ainda, uma atividade de decaimento das C3 e C5 convertases: clássicas, no caso de C4bp ou alternativas, no caso de fH, independentemente da presença

de fI. Existem outras proteínas relacionadas ao fH (FHR), codificadas por genes diferentes, assim como proteínas semelhantes ao fH (FHL), que são derivadas de “splicing” alternativo do gene de fH (ZIPFEL e SKERKA 1994).

O receptor de complemento tipo I (CR1) e a proteína cofatora presente em membranas (MCP) também possuem atividades cofadoras de fI. Ambas são capazes de mediar a clivagem de C3b e C4b, em iC3b e iC4b, porém o CR1 é o único cofator que permite a clivagem subsequente de iC3b por fI, resultando na formação de C3dg, ligado à membrana e C3c, liberado para a fase fluida. A clivagem posterior de C3dg, gerando C3d de membrana e C3g, de fase fluida, é mediada por proteases não específicas, como plasmina, tripsina ou elastase (DIERICH 1988).

O CR1, mas não o MCP, apresenta atividade de decaimento para as C3 e C5 convertases. Outra proteína de membrana com esse tipo de atividade é o fator de aceleração do decaimento (DAF) que acelera a dissociação de C2a e Bb de C4b e C3b, respectivamente. Esta proteína, porém, não possui atividade cofatora para fI (MORGAN e HARRIS 1999).

Em murinos não foram encontrados DAF ou MCP até o momento, porém, foi identificada uma proteína regulatória importante chamada Crry, sem correspondente em humanos. Essa proteína de membrana possui atividades cofatora de fI na clivagem de C3b e C4b e de decaimento das C3 convertases, não atuando como receptor para C3b (ao contrário de CR1) (KIM *et al.* 1995).

Duas proteínas de membrana, o fator de restrição homóloga (HRF) e o CD59, regulam a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e a atividade dos complexos já formados. Assim como o DAF, ambas estão fixadas na membrana por caudas de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), ao passo que CR1, MCP e Crry possuem cadeias transmembrânicas e intracitoplasmáticas (MORGAN e HARRIS 1999).

O HRF é uma molécula espécie-específica para humanos, não demonstrando atividade protetora contra o sistema complemento de outras espécies. A inibição exercida por essa molécula resulta numa menor ligação de C9 ao MAC, porém o modo pelo qual isso ocorre ainda não está totalmente esclarecido. Suspeita-se que a ligação de alta afinidade ao C8 (pelas cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$ ) exerça algum papel nessa inibição (MORGAN e

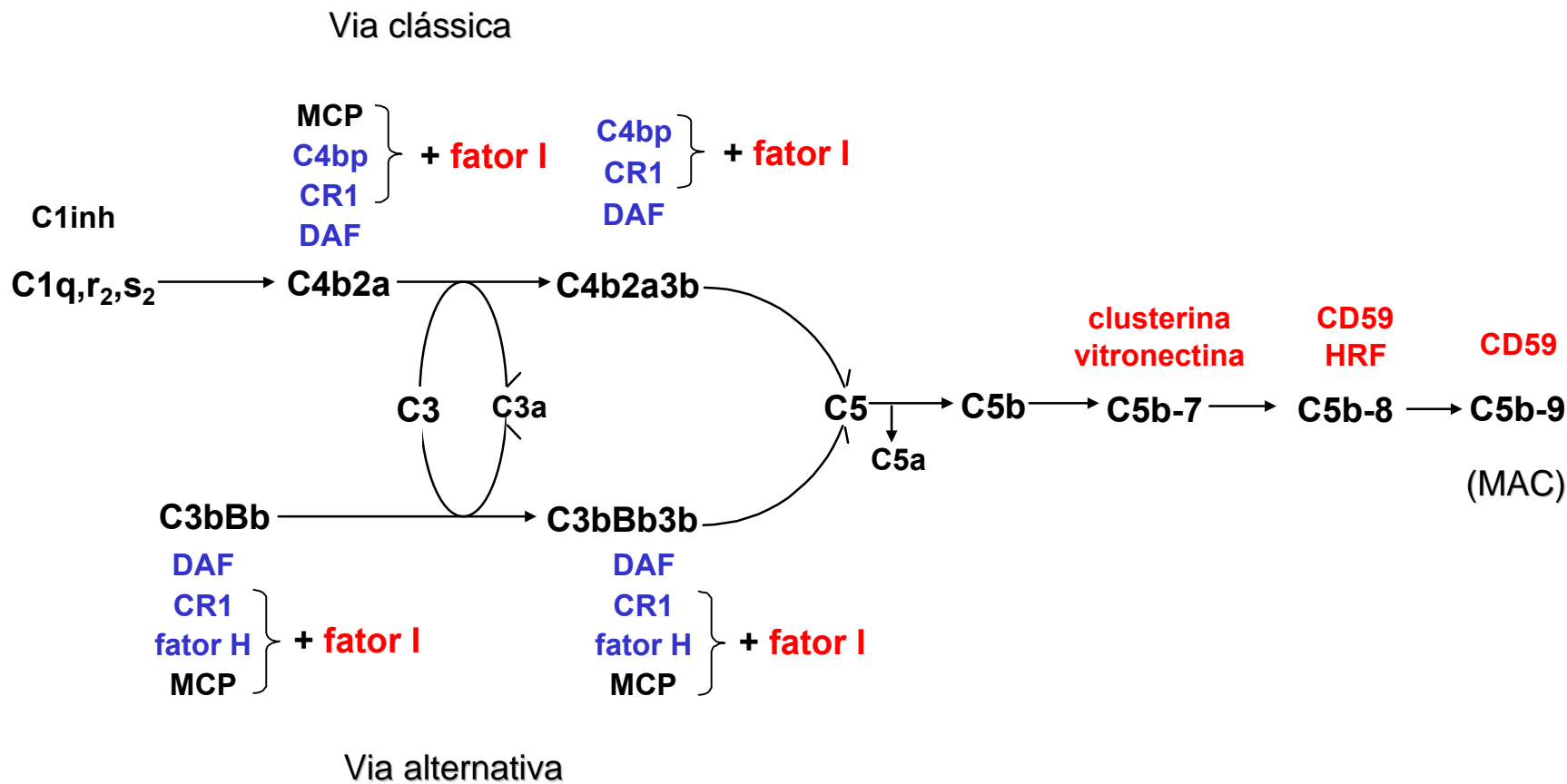


HARRIS 1999); por esse motivo o HRF já foi chamado de proteína ligante de C8 (C8bp).

O CD59 tem uma distribuição muito ampla, sendo expresso em muitos tipos celulares, principalmente nas células circulantes. Ele atua ligando-se a C8 e C9 presentes no MAC, impedindo não só a inserção deste último na membrana, mas também a ligação de outras moléculas de C9 ao complexo (MORGAN e HARRIS 1999).

Vitronectina, ou proteína S e clusterina, ou SP-40, são proteínas solúveis, sintetizadas principalmente no fígado, que atuam como reguladores dos complexos de ataque à membrana, ligando-se aos sítios hidrofóbicos de C5-7, recém-expostos, impedindo que este se insira na membrana (HÄNSCH 1988).

Os peptídeos C3a, C4a e, principalmente, C5a medeiam importantes atividades pró-inflamatórias, dependentes do resíduo de Arg C-terminal presente em cada uma dessas moléculas. Esse aminoácido é alvo de clivagem pela carboxipeptidase N, uma metaloprotease plasmática. A clivagem da Arg de C3a e C4a elimina toda a atividade desses fragmentos, enquanto que o C5<sub>desArg</sub> ainda apresenta alguma atividade inflamatória (como mostrado abaixo).



**Figura 1.3. Regulação do Sistema Complemento**

CR1, MCP, fH e C4bp são cofatores de fator I. Proteínas com atividade de aceleração do decaimento das convertases estão em azul.

### 1.1.3. Receptores

Vários fragmentos proteolíticos solúveis derivados da ativação do complemento, assim como os que permanecem ligados à membrana, são responsáveis por mediar importantes funções imunológicas; o que ocorre através do seu reconhecimento por receptores situados em diversos tipos celulares.

Dois receptores de pesos moleculares diferentes já foram descritos para a cauda de C1q e um terceiro para as cabeças globulares. A função exercida por este último ainda não foi esclarecida. Já os receptores para a cauda de C1q, presentes em neutrófilos, monócitos, células endoteliais, entre outras, têm sido implicados no reconhecimento de partículas opsonizadas por esta molécula, o que resultaria em uma fagocitose mais intensa (somando-se a outras opsoninas, como IgG e C3b), assim como na ativação desses fagócitos. A ligação do C1q ao seu receptor é bloqueada por C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub> e só ocorre após a dissociação das serino-proteases, juntamente com C1inh (TENNER 1999).

A estrutura geral do C1q é compartilhada por uma família de lectinas, também envolvidas na imunidade inata do organismo, as colectinas (lectinas que possuem um domínio semelhante ao colágeno), que ligam-se a carboidratos presentes em patógenos pelas suas cabeças globulares, assim como o C1q liga-se aos anticorpos. Dessa família fazem parte a MBL e as proteínas surfactantes presentes no pulmão (SP-A e SP-D). O mecanismo pelo qual MBL atuaria na opsonização seria semelhante ao de C1q, sendo necessário o desligamento de MASP-1 e MASP-2 (TENNER 1999). O reconhecimento de SP-A e SP-D por receptores de C1q presentes em fagócitos é um mecanismo importante para a eliminação de algumas espécies de bactérias, principalmente no pulmão (EGGLETON e REID 1999).

O CR1 (CD35) é o receptor para C3b, C4b e iC3b (este último com uma afinidade 10 vezes menor que o primeiro) e é abundante em neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e eritrócitos. A ativação de neutrófilos e monócitos/macrófagos por metabólitos bacterianos, citocinas ou outros estímulos induz um rápido aumento no número total de CR1 na superfície dessas células, em até dez vezes (cerca de 50.000), pela

mobilização de vesículas secretórias. Aparentemente, esse aumento da concentração de CR1 na superfície celular e, talvez, modificações no próprio receptor, como sua fosforilação são necessárias para que a célula seja capaz de fagocitar ativamente por esse receptor (SENGELOV *et al.* 1994).

Os linfócitos B são, com exceção de alguns linfócitos T, as únicas células circulantes que expressam o receptor para C3dg, CR2 (CD21). Esse receptor reconhece também iC3b e C3d. Ele está presente também na superfície de células foliculares dendríticas e células epiteliais, entre outras, ocorrendo em associação com outras três moléculas, CD19, TAPA-1 (CD81) e Leu-13. No caso da ligação de um antígeno específico à imunoglobulina de membrana, a ligação concomitante de C3dg ao complexo CR2/CD19 contribui para diminuir a concentração desse Ag necessária para estimular o linfócito B a produzir anticorpos (CARROLL 1998).

O vírus Epstein-Barr (EBV), causador do linfoma de Burkitt e da mononucleose infecciosa, também se liga a CR2 e o utiliza como porta de entrada para infectar o linfócito B (RAY e HICKS 1989).

O CR3 e o CR4 são proteínas heterodiméricas da família das  $\beta_2$  integrinas e, como tais, possuem uma cadeia  $\beta$  comum (CD18), que também está presente em LFA-1. A cadeia  $\alpha$ , ligada não covalentemente à cadeia  $\beta$ , é o que as difere: CD11b no CR3 e CD11c no CR4 (LFA-1 tem uma cadeia CD11a). CR3 está presente em monócitos, neutrófilos, células mielóides e NK; CR4 está presente em células mielóides, monócitos e macrófagos. Esses dois receptores ligam-se a iC3b e contribuem para a fagocitose de partículas opsonizadas.

O CR3 (assim como o LFA-1) liga-se a ICAM-1 (CD54), que é uma molécula da superfamília das imunoglobulinas e está presente, entre outras células, em linfócitos B e T, células endoteliais e fibroblastos. A ligação de CR3 a ICAM-1 possibilita a firme aderência de leucócitos ao endotélio e a sua diapedese para o espaço intersticial. A aderência de células ao tecido conjuntivo da derme também é uma das funções exercidas por CR3 e CR4, pela ligação a fibronectina, presente na matriz extracelular.

C3aR e C5aR (CD88) são os receptores para C3a e C5a, respectivamente. Eles estão presentes nas membranas de neutrófilos (a quantidade de C5aR nessas células pode chegar

a 80.000/célula), monócitos, macrófagos, mastócitos e basófilos, entre outros. O C5aR pode ser encontrado ainda em grande quantidade em plaquetas (EMBER e HUGLI 1997).

Esses receptores pertencem à família da rodopsina (proteína fotorreceptora dos bastonetes da retina), do receptor  $\beta$ -adrenérgico e de muitos outros, cujas características principais são a presença de sete hélices transmembrânicas e o acoplamento da sua extremidade C-terminal à proteína G (STRYER 1988). Com a ligação de C3a e C5a, os receptores induzem a ativação da enzima adenilato ciclase presente na membrana, com um conseqüente aumento da concentração intracelular de AMP cíclico. Esse aumento resulta na ativação de quinases citossólicas, que efetuam diversas funções relacionadas com o metabolismo bactericida das células, como a desgranulação de mastócitos, basófilos e neutrófilos (EMBER e HUGLI 1997).

## **1.2. Funções biológicas dependentes da ativação do sistema complemento**

### **1.2.1. A lise osmótica mediada pelo complexo de ataque à membrana**

A lise da célula envolve o influxo desmedido de íons presentes em maior concentração no meio extracelular, como  $\text{Na}^+$ , e o efluxo daqueles que, como o  $\text{K}^+$ , estão presentes em altas concentrações em relação ao meio externo. É possível que outros fatores também contribuam para essa lise, como o consumo exagerado de ATP por mecanismos celulares dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , subitamente desencadeados pelo rápido influxo deste íon (WHALEY e LEMERCIER 1993).

Bactérias gram-positivas são bastante resistentes à lise pelo MAC, pois sua parede celular contém uma camada de peptidoglicano muito espessa, que impede que isso ocorra. Como o C3b liga-se muito bem ao peptidoglicano de suas superfícies, estas bactérias, opsonizadas, são eliminadas principalmente pela ingestão por fagócitos.

A estrutura da parede celular das bactérias gram-negativas não é tão espessa nem tão protetora, porém, possui uma estrutura complexa o suficiente para dificultar a lise. A deposição do MAC na membrana externa dessas bactérias não é suficiente para lisá-las, é

preciso que essa deposição ocorra também na sua membrana interna e para tanto os componentes precisam atravessar o espaço periplásmico. O exato mecanismo pelo qual isto se processa não é de todo claro (MOXON e KROLL 1990).

O C3b liga-se eficientemente à porção lipídica do lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas. Este composto pode atuar como protetor para algumas cepas contendo LPS com longas cadeias laterais na parede celular, ficando a deposição do MAC, restrita a essas cadeias, sem afetar a membrana em si. Por outro lado, há bactérias com LPS de cadeias laterais curtas que também escapam à deposição do MAC, segundo mecanismos, por ora, desconhecidos (MOXON e KROLL 1990).

O MAC eventualmente deposita-se em células saudáveis do próprio organismo, sem provocar sua lise. Além da atuação de proteínas regulatórias, que é essencial para controlar a lise autorreativa, as células nucleadas e metabolicamente ativas são mais resistentes ao acúmulo de uma certa quantidade de complexos, minimizando seus efeitos pela atuação das bombas iônicas e pela eliminação dos complexos por exocitose (método também utilizado por alguns parasitas para escapar à lise) (BHAKDI 1993).

### **1.2.2. Produção de fatores quimiotáticos**

Um dos mais importantes aspectos da resposta do organismo ao estabelecimento de uma infecção é o rápido influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório (seguidos num segundo momento por monócitos), partindo do sangue. A migração desses neutrófilos envolve um grande número de moléculas e comportamentos celulares diferentes mas que agem em conjunto, num fenômeno caracterizado por etapas.

O primeiro contato com o endotélio e o subsequente rolamento dos neutrófilos sobre este são mediados por selectinas, que ligam-se a carboidratos de algumas glicoproteínas. A firme adesão do neutrófilo ao endotélio e sua diapedese são dependentes das integrinas CR3 e CR4 (além de LFA-1) presentes na superfície do leucócito, pela ligação com o ICAM-1 (TEDDER *et al.* 1995). A migração de monócitos depende também de CR3 e CR4, assim como de outras integrinas.

Desde o momento em que passam a rolar no endotélio, os leucócitos entram em contato com várias proteínas solúveis produzidas no local da inflamação e pelas próprias células endoteliais. Esses fatores induzem respostas migratórias nos leucócitos, sendo que um dos mais importantes é o C5a. Sua ligação com o receptor no leucócito induz um aumento da quantidade de integrinas na superfície (pela fusão de grânulos com a membrana plasmática), além de aumentar a adesividade destas moléculas por alterações conformacionais (SPRINGER 1994). O gradiente de concentração de C5a que o leucócito encontra ao deixar o vaso direciona sua migração para o sítio inflamatório.

Outros fragmentos derivados da ativação do complemento são também fatores quimiotáticos, como é o caso de C3a, C5a<sub>desArg</sub> e Ba (derivado da clivagem de fB por fD). No entanto a atividade desses fragmentos é muito pequena se comparada com a do C5a (MORGAN 1990).

Foi observado, também, um aumento de leucócitos circulantes em resposta a um pequeno fragmento derivado da clivagem de C3c, o C3e (GHEBREHIWET e MÜLLER-EBERHARD 1979). Este fragmento possui um receptor específico em granulócitos e sua ligação, aparentemente, induz a liberação do conteúdo enzimático de leucócitos polimorfonucleares (DIERICH 1988).

### **1.2.3. Produção de anafilatoxinas**

Os peptídeos anafiláticos C3a e C5a têm estrutura e função semelhantes. Sua ligação com os receptores presentes em mastócitos e basófilos induz a liberação dos conteúdos de seus grânulos de e basófilos, que incluem histamina, proteoglicanas, proteases neutras, PAF e TNF, entre outros. Esses compostos causam vasodilatação, aumento da permeabilidade dos capilares sangüíneos, influxo de leucócitos, ativação de monócitos e macrófagos e vários outros efeitos, inclusive sistêmicos.

A ligação de C5a aos receptores em neutrófilos também causa a liberação do conteúdo enzimático de seus grânulos (incluindo lizozima, elastase e mieloperoxidase), além de induzir a explosão respiratória em neutrófilos e monócitos. o que tem efeitos

tóxicos para os patógenos (e dependendo do grau, para as células do indivíduo).

O MAC possui outras funções biológicas, além de provocar a lise de células alvo. No foco de infecção ele é depositado tanto na superfície das células de organismos invasores quanto nas células do próprio hospedeiro (porém em quantidades menores). Conforme mencionado acima, essa deposição não resulta necessariamente na lise dessas células, ao contrário, pode contribuir para sua ativação. Monócitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, entre outros, produzem e liberam LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores inflamatórios, em resposta à deposição de MACs nas suas membranas (MORGAN 1990).

#### **1.2.4. Solubilização, eliminação e inibição da precipitação de imunocomplexos circulantes**

O sistema complemento inibe a precipitação de imunocomplexos (ICs) de IgG ou IgM, pela ligação de C1q e formação da C3 convertase clássica, resultando na deposição de C3b aos fragmentos Fc dos complexos. Essa ligação desestabiliza as interações Fc-Fc, diminuindo o tamanho dos IC e facilitando sua solubilização (MILLER e NUSSENSWEIG 1975).

Quando esses ICs chegam a precipitar-se, eles podem ativar a via alternativa, além da via clássica. Com isso são depositadas cada vez mais moléculas de C3b na superfície do complexo, que resulta na sua dissolução. Complexos de IgA não ativam a via clássica e podem, portanto, atingir tamanhos consideráveis. A deposição de C3b pela via alternativa é muito importante na eliminação desses IC (JOHNSON 1987).

Os eritrócitos ligam-se a ICs circulantes pelo CR1 presentes em suas membranas, transportando-os para o baço e fígado, onde eles são captados e eliminados pelas células de Kupffer. A quantidade de CR1 na membrana dos eritrócitos, cerca de 500/célula, é pequena se comparada com outros tipos celulares, porém a grande quantidade dessas



células na circulação faz com que este seja um mecanismo eficiente de retirada dos ICs circulantes. Quando os eritrócitos carregando ICs passam pelo baço e fígado, estes são retidos por macrófagos, que contém uma quantidade de CR1 muito maior na membrana do que os eritrócitos. A clivagem de C3b por fI, para a qual o CR1 opera como cofator, também contribui para essa retenção, pois o iC3b gerado tem uma menor afinidade por CR1 do que o C3b e a ligação do IC ao eritrócito torna-se mais fraca (SCHIFFERLI *et al.* 1986).

### 1.2.5. Produção de opsoninas

Uma das funções mais importantes do sistema complemento é a opsonização de organismos patogênicos ou partículas estranhas, contribuindo para sua fagocitose. As mais importantes opsoninas são os fragmentos C3b, iC3b e C4b (este último com uma eficiência muito menor). O C3b possui uma afinidade maior pelo CR1, sendo a principal opsonina do sistema complemento. O iC3b é uma opsonina importante, apesar de sua ligação com CR1 ter uma menor afinidade, pois está presente na membrana (ou superfície ativadora) durante um período de tempo mais longo que o C3b e em maior concentração. A ingestão das partículas opsonizadas, pelos fagócitos também é feita via CR3 e CR4.

A fagocitose de organismos pode ser mediada por anticorpos específicos, principalmente do tipo IgG, que são reconhecidos por receptores presentes em fagócitos. Os anticorpos, complexados com antígenos podem, por sua vez, ativar a via clássica, resultando na deposição de C3b e numa melhor opsonização (SCHREIBER 1984).

Os neutrófilos e monócitos não primados/ativados não são capazes de fagocitar ativamente via CR1, CR3 ou CR4. Da mesma forma como o observado para o receptor de IgG (FcγRI; CD64). Diferente deste último, porém, a ligação e fagocitose via CR1, CR3 e CR4 não induz a produção de metabólitos tóxicos de oxigênio e outros compostos microbicidas pelos fagócitos (“burst” respiratório) (LAW 1988).

### 1.2.6. Sistema complemento e a resposta humoral

O sistema complemento tem um papel importante no desenvolvimento da resposta humoral a antígenos T-dependentes. Cobaias naturalmente deficientes de C3 têm uma resposta secundária muito débil, quando imunizadas com o fago  $\phi$ X174 e são incapazes de efetuar eficientemente a troca de classe dos isótipos produzidos (de IgM para IgG) (BOTTGER *et al.* 1986). Camundongos nocauteados para os genes de C3, C4 (FISCHER *et al.* 1996) ou CR2 (MOLINA *et al.* 1996), assim como animais tratados com anticorpos monoclonais específicos para regiões presentes tanto em CR1 quanto em CR2 (HEYMAN *et al.* 1990) demonstraram o mesmo defeito em resposta a antígenos T-dependentes.

Empregando-se uma construção quimérica de duas ou três moléculas de C3d associadas a um antígeno T-dependente, demonstrou-se que esse fragmento é capaz, em camundongos, de diminuir o patamar da concentração do antígeno necessário para provocar a ativação dos linfócitos B em até 100 vezes (DEMPSEY *et al.* 1996). As duas explicações mais prováveis formuladas para explicar esse fenômeno foram uma melhor captura e retenção dos antígenos por células foliculares dendríticas, melhorando sua apresentação aos linfócitos B, ou uma participação do complexo CR2/CD19 na transdução do sinal, ao haver ligação do Ag pela imunoglobulina de membrana.

Camundongos transgênicos para o gene da recombinase 2 (RAG-2), que não são capazes de maturar linfócitos B, reconstituídos com blastocistos derivados de camundongos deficientes de CR2 apresentaram respostas humorais defeituosas a Ags T-dependentes, confirmando a segunda hipótese (sem, no entanto, descartar completamente a primeira) (CROIX *et al.* 1996).

### **1.3. O componente C3**

#### **1.3.1. Estrutura gênica e protéica**

O componente C3 humano está codificado por um gene de cópia única localizado no braço curto do cromossomo 19, que contém 41 exons e abrange 42 kb ao todo. Os 16

primeiros exons codificam a cadeia  $\beta$  e os 25 restantes para a cadeia  $\alpha$ . Seu RNA mensageiro é formado por 5,2 kb. No exon 24 estão codificados os aminoácidos necessários para a formação da ligação tiol-éster (VIK *et al.* 1991).

Curiosamente, apesar de se observar os nucleotídeos GT-AG, no começo e no fim de cada íntron, respectivamente, que são os sinais conservados para reconhecimento de “splicing”, na região 5’ do íntron 29 observa-se um GC (BARNUM *et al.* 1989).

O pró-C3 sofre alterações pós-traducionais para formar a proteína madura, de duas cadeias:  $\alpha$ , de 110 kDa e  $\beta$ , de 75 kDa, ligadas por pontes dissulfeto inter e intra-cadeia. Essas modificações incluem eliminação de um peptídeo sinal de 22 aminoácidos, na região N-terminal, de um segmento de quatro argininas, localizado entre os segmentos correspondentes às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , glicosilação (adição de manose e N-acetil glicosamina) e formação da ligação tiol-éster na cadeia  $\alpha$  (DEBRUJIN e FEY 1985).

A molécula madura de C3 tem 185 kDa, estando presente no soro de adultos em concentrações que variam entre 1,0 e 1,6 mg/mL (MORGAN 1990), sendo, assim, o componente plasmático mais abundante do sistema complemento humano. Essa molécula é sintetizada como um precursor de cadeia única, o pró-C3, de 1.663 aminoácidos (BRADE *et al.* 1977).

### 1.3.2. Biossíntese

O C3 é sintetizado principalmente no fígado, por hepatócitos (ALPER *et al.* 1969), assim como quase todas as outras proteínas do sistema complemento. Outros tipos celulares também são capazes de sintetizar essa proteína, como leucócitos mono e polimorfonucleares, fibroblastos e células endoteliais, entre outros.

A síntese de C3 pode ser estimulada por compostos bacterianos, como LPS (STRUNK *et al.* 1985), citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF (KATZ *et al.* 1989), enquanto IFN- $\gamma$  induz uma diminuição da taxa de síntese (BARNUM *et al.* 1989). Além dos elementos já citados, foram identificados, no gene, seqüências regulatórias para o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (cuja ligação ao DNA é controlada, entre outros, por IL-1 e TNF),

estrógeno, glicocorticóides e hormônio da tireóide e outros (VIK *et al.* 1991). Essa regulação é exercida diretamente no DNA, resultando em uma maior (ou menor) transcrição do gene ou no RNAm, por induzir uma maior estabilidade deste, aumentando a disponibilidade de cada molécula de RNA para tradução (MITCHELL *et al.* 1996). O C3 é uma proteína de fase aguda e sua síntese, pelo fígado aumenta de duas a três vezes com o estímulo, que pode incluir citocinas, como as mencionadas acima (KATZ *et al.* 1989).

### 1.3.3. Polimorfismo

O polimorfismo de C3 foi primeiramente estudado na população caucasóide pela observação do padrão migratório de isoformas da proteína, por meio da eletroforese de soro humano total, por diferentes grupos, mais ou menos simultaneamente. ALPER e PROPP (1968) descreveram cinco alótipos diferentes: F; F<sub>0,8</sub>; F<sub>1</sub>; S e S<sub>1</sub>, por eletroforese em géis de agarose. As letras F e S são relativas aos padrões “fast” e “slow”, respectivamente e os números referem-se a formas muito próximas dos alótipos. AZEN e SMITHIES (1968) observaram seis alótipos, por eletroforese prolongada em géis de amido.

Os alótipos mais comuns em todos os grupos humanos estudados até o momento são C3S e C3F. As freqüências observadas para C3S variam entre 0,79 (caucasianos) e 0,99 (asiáticos) (RITTNER e STRADMANN-BELLINGHAUSEN 1990). Outras diferenças foram, no entanto, encontradas nestes alótipos, pelo uso de anticorpos monoclonais (SCHNEIDER e WÜRZNER 1999).

Uma freqüência maior do alelo que codifica para C3F têm sido associada com alguns estados patogênicos, como glomerulonefrite e lipodistrofia parcial provocadas por fatores nefritogênicos (NeF) (FINN e MATHIESON 1993), vasculite sistêmica, nefropatia de IgA e em doadores renais, em casos em que o transplante era rejeitado pelo receptor (ANDREWS *et al.* 1995). Essas observações sugerem uma possível participação de C3F em doenças autoimunes e inflamatórias, por mecanismos, até agora, desconhecidos.

A análise do gene de C3 revelou que simples trocas de nucleotídeos entre os alelos C3S e C3F, resultando na substituição de um único aminoácido na proteína final. Dois

grupos não relacionados, no entanto, identificaram diferentes regiões, onde essas substituições se localizariam (POZANSKY *et al.* 1989; BOTTO *et al.* 1990a).

## 1.4. Imunodeficiências

O estudo das imunodeficiências humanas desperta interesse, não só pela possibilidade de se avaliar a abrangência de seus efeitos no organismo dos portadores, formular tratamentos mais eficientes, identificar os defeitos causadores de tais deficiências, ou mesmo descobrir sua cura, como também, por providenciar oportunidades de estudo das interrelações entre os inúmeros componentes do sistema imune. Mais recentemente, este estudo tem sido impulsionado pela identificação de vários genes responsáveis por essas deficiências, utilizando técnicas de biologia molecular e pela criação de animais transgênicos como modelos experimentais.

### 1.4.1. Deficiências de proteínas do sistema complemento

Todas as deficiências de componentes do sistema complemento são autossômicas recessivas, com a exceção de C1inh, que é autossômica dominante e proterdina, que é recessiva ligada ao X. Os heterozigotos têm aproximadamente 50% da concentração normal desses componentes no plasma e de modo geral não apresentam problemas.

Deficiências de componentes da via clássica: C1q; C1r; C1s; C2 e C4 resultam em uma maior ocorrência de doenças auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e lúpus discóide; doenças por deposição de imunocomplexos, como vasculite, glomerulonefrite ou artrite e também, numa maior predisposição a infecções por bactérias piogênicas (LOKKI e COLTEN 1995).

A deficiência de C2 é a mais comum na população caucasóide, com uma frequência de aproximadamente 1:30.000 indivíduos. Destes, aproximadamente 25% não apresentam grandes problemas. A ocorrência de doenças causadas por deposição de ICs são

encontradas em mais de 60% dos deficientes de C2 e quase 100% dos deficientes de C4).

O componente C4 possui dois loci gênicos, denominados C4A e C4B, que codificam proteínas funcionalmente diferentes. Essas proteínas diferem no tipo de ligação química que se estabelece com a superfície aceptora, após a clivagem por C1s. O C4b derivado do locus C4A liga-se preferencialmente a grupamentos amina, enquanto que o derivado de C4B liga-se preferencialmente a grupamentos hidroxila. A deficiência exclusiva de C4A acarreta doenças por deposição de ICs, enquanto que a de C4B não está associada a quadros clínicos muito graves. A deficiência total de C4 tem características semelhantes à deficiência de C4A (COLTEN e ROSEN 1992).

A deficiência de C5 resulta em uma maior susceptibilidade a infecções por um grande número de bactérias, pois é eliminada a fonte do mais importante fator quimiotático e anafilático do sistema complemento, além de essencial para a formação do MAC (HAUPTMANN 1989).

As deficiências de C6, C7 e C8 estão associadas principalmente com infecções recorrentes por meningococos, doenças por deposição de ICs também são observadas, em menor grau. Assim como na deficiência de C2, aproximadamente 25% dos deficientes de C6 são saudáveis. A sua ocorrência também é muito freqüente na população caucasóide (1:60.000) (HAUPTMANN 1989). A deficiência de C8 tem um aspecto mais complicado, pois esta molécula é codificada por três genes diferentes. Os genes das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  estão localizados próximos entre si, no cromossomo 1, já o da cadeia  $\beta$  está no cromossomo 9. Defeitos em qualquer um desses genes resultam numa molécula não funcional de C8. Alguns deficientes dessa proteína apresentam doenças por deposição de Ics (COLTEN e ROSEN 1992).

A deficiência de C9 é rara em caucasianos, porém, é uma das mais freqüentes na população japonesa (1:1.000). Curiosamente os deficientes encontrados nesta população, muitas vezes não apresentam nenhum sintoma de doenças, ao contrário dos caucasianos. Os motivos pelos quais essa deficiência é tão freqüente e inofensiva nos japoneses não foi elucidado (HAUPTMANN 1989).

A deficiência de C1inh tem um caráter dominante, com uma freqüência de 1:150.000. Todos os afetados encontrados até o momento são heterozigotos e se dividem

em dois grupos: os que possuem concentrações menores que 30% do normal (85% dos casos) e os que possuem concentrações normais, ou até maiores, dessa proteína (15%). No segundo caso a deficiência resulta de moléculas não funcionais de C1inh (MORGAN 1990).

Uma das características principais dessa deficiência é a ativação desmedida da via clássica, com consumo exagerado de C1; a outra é o desenvolvimento ocasional de um inchaço edematoso, localizado principalmente no rosto, membros e genitália. Esse quadro clínico é conhecido como angioedema hereditário (HAE). Em algumas ocasiões pode haver obstrução da laringe, causando morte por asfixia se não houver tratamento imediato. Os mecanismos diretamente responsáveis pelo edema ainda não foram totalmente esclarecidos. Um produto da clivagem de C2 por C1s, C2 cinina, pode estar envolvido. Esse fragmento induziria a desgranulação de mastócitos resultando no edema. Outro substrato para a clivagem por C1s implicado nessa reação é a bradicinina, que atuaria da mesma forma proposta para C2 cinina (MORGAN 1990; COLTEN e ROSEN 1992).

Existem casos de deficiência secundária de C1inh, que acarretam um quadro clínico semelhante ao HAE, com a diferença que, nesses casos, o C1q está presente em concentrações reduzidas no plasma. Essa manifestação, conhecida como angioedema adquirido (AAE) aparece em doenças linfoproliferativas de linfócitos B. O fator determinante da AAE é a ativação desmedida de C1 nas superfícies dos clones de linfócitos B por anticorpos anti-idiótipos de suas Igs de membrana.

Deficiências de receptores do complemento estão relacionadas com uma maior susceptibilidade a infecções de pele e mucosas. A ausência de CR3 e CR4 determina uma menor migração de neutrófilos e uma maior dificuldade de ativação dos mecanismos bactericidas dessas células, a “explosão” respiratória. Deficiências totais de CR1 não foram encontradas até o momento, porém níveis de CR1 abaixo do normal têm sido encontrados em indivíduos com SLE, como uma consequência dessa doença (WILSSON *et al.* 1986).

A deficiência concomitante de DAF, MCP e CD59 é encontrada em indivíduos que sofrem de hemoglobinúria paroxísmica noturna (PNH). Os eritrócitos dos indivíduos afetados têm uma maior sensibilidade à lise pelo próprio sistema complemento, pela falta desses inibidores de membrana. Os episódios de hemólise podem acarretar trombose nos

vasos sangüíneos, o que pode vir a ter efeitos muito graves para os deficientes. O defeito molecular associado a essa deficiência é uma incapacidade de gerar âncoras de GPI, presentes nas estruturas dessas e outras proteínas.

A properdina é a única proteína do sistema complemento cuja deficiência está associada ao X e apenas indivíduos do sexo masculino foram encontrados até o momento. O estabelecimento da via alternativa no soro desses indivíduos está bloqueada, porém a via clássica desenvolve-se normalmente. O principal problema enfrentado pelos deficientes são infecções meningocócicas, que podem ser fulminantes. As re-infecções geralmente são controladas sem maiores problemas (SIM *et al.* 1993).

Um único deficiente homozigoto, para fB foi encontrado até o momento (os heterozigotos tem, geralmente, fenótipo normal) (DENSEN *et al.* 1996), o qual foi diagnosticado com infecção meningocócica. Pouquíssimos casos de deficiências de fD foram descritos, sendo que na maioria foi observada a presença de infecções por *Neisseria meningitidis* (HAENEY *et al.* 1980), muitas vezes fulminantes.

Pelo fato das deficiências totais de componentes da via alternativa, como fB, fD, properdina e até fH, serem muito raras, foi sugerido que essa via teria um papel fundamental para a sobrevivência, imediatamente após o nascimento, por exercer um controle sobre algumas infecções que, de outro modo, progrediriam rapidamente (FRIES *et al.* 1986).

#### **1.4.1.1. Deficiência de C3**

##### **1.4.1.1.1. Primária**

Até o momento já foram relatadas deficiências primárias de C3 em 18 famílias (ver **Tabela 1.1** para descrições dos casos e referências), de diferentes regiões do mundo e das mais variadas etnias. A principal manifestação desta deficiência são as infecções bacterianas (refletindo o encontrado em outras deficiências da via clássica) e, em alguns casos, acompanhadas de doenças por deposição de ICs. Essa deficiência tem um caráter



heterogêneo, pois em alguns casos foram detectadas concentrações de C3 em torno de 50 µg/mL, enquanto em outros não foi detectado nenhum C3 (SINGER *et al.* 1994a).

Os principais agentes patogênicos causadores das infecções, quando identificados, foram: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, que estão entre os principais causadores de meningite infantil (CARPENTER 1985). Infecções por *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (causador de meningite pré-natal) também foram observadas. As manifestações mais comuns relacionadas com essas infecções foram pneumonia, meningite e otite média. Em alguns casos foram observadas complicações renais, resultantes, provavelmente, de um elevado número de imunocomplexos circulantes, que se depositaram em estruturas renais. A endotoxina (LPS) de bactérias gram-negativas pode induzir uma ativação de clones de linfócitos B, resultando numa grande quantidade de imunocomplexos circulantes; o mesmo pode ocorrer numa glomerulonefrite pós-estreptocócica, na qual os Acs complexados com Ags bacterianos depositam-se nos glomérulos (DAVIES *et al.* 1994).

A deposição de ICs na membrana basal dos glomérulos, ou entre esta e as camadas de células adjacentes pode causar a glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP). Com essa deposição ocorre um espessamento da membrana, que resulta em proteinúria e hematúria acentuadas e uma progressiva falha do sistema renal. A infiltração de células inflamatórias agrava as lesões, piorando o quadro geral. Deposição de ICs em outros tecidos, como vasos sangüíneos, articulações, válvulas cardíacas, pulmões e baço também ocorrem nos deficientes. Da mesma forma os ICs recrutam células inflamatórias, predominantemente leucócitos polimorfonucleares, que causam dano e até necrose dos tecidos afetados (SCHIFFERLI *et al.* 1986).

A falha na remoção dos imunocomplexos por leucócitos mononucleares do fígado e baço é uma das causas dos problemas apontados acima. A retirada destes ICs da circulação foi estudada em deficientes totais de C3, utilizando IgG marcada com I<sup>125</sup>. Verificou-se que esses complexos são removidos mais rapidamente do que nos indivíduos normais, nos primeiros momentos após a sua administração, possivelmente via receptor para Fc de IgG presentes nos fagócitos. Porém essa remoção estabiliza-se após algum tempo e não é completa, como ocorre com indivíduos normais. Alguns complexos permanecem na

circulação e podem depositar-se de forma contínua nos tecidos, até que seja estabelecido um quadro inflamatório (HALMA *et al.* 1992).

As causas moleculares das deficiências, todas diferentes entre si, foram pesquisadas em cinco famílias não relacionadas. No primeiro desses estudos, feito por BOTTO *et al.* (1990b), foi descrito o caso de um menino de 10 anos deficiente total de C3. O alelo responsável pelo defeito, presente em homozigose, foi seqüenciado, revelando que o “spliceossomo” (o complexo formado por RNA e proteínas, responsável pela remoção [“splicing”] do RNA transcrito a partir dos íntrons) reconhecia um doador de “splicing” críptico dentro do exon 18, ao invés do doador normal, no início do íntron 18. A retirada do RNA entre esse sítio e o o sítio receptor de “splicing” normal do exon 19 gera uma deleção de 61 nucleotídeos no RNAm resultante. Essa deleção muda o quadro de leitura do RNAm, gerando um códon de parada 17 nucleotídeos abaixo do ponto de “splicing”. Com isso, a tradução é interrompida no meio do exon 19 (no começo da cadeia  $\alpha$ ), resultando numa proteína não funcional e que é rapidamente degradada.

O mesmo grupo estudou outro caso de deficiência total de C3. Em uma mulher africânder, de 37 anos, foi encontrado um alelo em homozigose contendo uma deleção de 800 pb, suprimindo completamente os exons 22 e 23. A ligação dos exons 21 e 24 causa uma mudança do quadro de leitura, com a geração de um códon de parada 19 pb abaixo da deleção. A causa da deleção no gene está, provavelmente, associada com a recombinação homóloga de duas seqüências Alu presentes nos íntrons 21 e 23, durante a meiose, produzindo um alelo com uma deleção dos exons compreendidos entre essas seqüências e outro contendo uma duplicação dos mesmos (BOTTO *et al.* 1992).

No caso de um neozelandês de 20 anos com concentração plasmática de C3 ao redor de 7  $\mu\text{g/mL}$  (menos de 1% do normal), medida por métodos imunoquímicos, observou-se, por northern blotting, que tanto o tamanho, quanto a quantidade de RNAm para C3 eram normais. Em gel de poliacrilamida com SDS, foi observada uma secreção de C3 extremamente reduzida pelas células desse indivíduo, apesar do pró-C3 ser sintetizado normalmente (KATZ *et al.* 1994). Ao sequenciar o cDNA desse indivíduo, verificou-se que a origem desse defeito é a substituição de um único nucleotídeo no exon 13, que resulta numa troca de um aminoácido na posição 549 da molécula de pró-C3 (Asp para Asn).

Verificou-se que o C3 deposita-se em regiões próximas ao núcleo das células. O defeito na molécula pode ter alguma conseqüência na sua interação com o retículo endoplasmático, afetando sua secreção (SINGER *et al.* 1994b).

Ao analisar os dados do sequenciamento de cDNA viu-se que o indivíduo descrito acima era heterozigoto para dois alelos diferentes de C3, ambos defeituosos. Os pais do deficiente, como era de se esperar, apresentaram concentrações reduzidas de C3, porém o alelo herdado do pai continha um defeito diferente ao já descrito e ainda não caracterizado (KATZ *et al.* 1995).

Outro caso de deficiência de C3 devido a uma mutação de um sítio doador de “splicing” foi reportado em uma mulher taiwanesa de 23 anos. Neste caso o sítio defeituoso ocorre no íntron 10, devido a uma mutação de ponto, GT para TT. O exon 10 não é transcrito a causa disso, levando ao reconhecimento de um códon de parada na proteína (HUANG e LIN 1994).

Em uma criança proveniente do Laos, foi descoberto um pró-C3 de tamanho normal, assim como as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . A produção desse C3, porém, era equivalente a 1% do normal; por RIA a concentração de C3 plasmático detectada foi de 4  $\mu\text{g/mL}$ . O RNAm tinha um tamanho normal e correspondia, também, a 1% da quantidade obtida por fibroblastos normais. A região de início da síntese e os sinais reguladores, induzidos por IL-1 $\beta$  e IL-6 não possuíam defeitos, no gene, indicando que mutações nessa região, importante para a taxa de síntese de RNA, não eram responsáveis pelo defeito (SINGER *et al.* 1996).

Deficiência primária completa de C3 foi encontrada em outros animais, como cães (WINKELSTEIN 1981), cobaios (BURGER *et al.* 1986) e coelhos (KOMATSU *et al.* 1988). Como modelo de estudo a deficiência pode ser induzida experimentalmente em animais de laboratório por administração de fator de veneno de cobra (CVF), um análogo a C3 resistente à clivagem por FI (VOGEL *et al.* 1984). Mais recentemente, camundongos nocauteados para C3 foram criados, com esse fim.

#### 1.4.1.1.2. Secundária

Concentrações reduzidas de C3 ocorrem em indivíduos com deficiências de fI ou fH. As concentrações de fB, C5 e properdina também estão abaixo do normal, refletindo o estado permanente de ativação da via alternativa. Como resultado, notam-se, nos deficientes, uma maior susceptibilidade a infecções por bactérias encapsuladas, como: *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* e a presença de doenças mediadas pela deposição de imunocomplexos, como SLE e GNMP (ALPER *et al.* 1970; ABRAMSON *et al.* 1971).

A investigação de deficiências totais de fator I possibilitou a descoberta da alça de amplificação da via alternativa, pela observação de que uma pequena quantidade de C3b estaria sempre sendo gerada pela via alternativa, mesmo em condições normais. Na ausência de regulação pelo “inativador de C3b” essa ativação residual levaria eventualmente à depleção de C3 nos soros dos deficientes de fI (ALPER *et al.* 1970, ABRAMSON *et al.* 1971).

Assim como no caso do C3, pouco mais de 20 casos de deficiência total de fI foram identificados e, destes, quatro tiveram suas causas moleculares reveladas. As causas encontradas para as deficiências foram mutações pontuais, em exons diferentes do gene de fI, envolvendo perda de sítio receptor de “splicing” e parada precoce da tradução ou trocas de aminoácidos nas regiões catalíticas da molécula final (SIM *et al.* 1992; VYSE *et al.* 1996). O resultado dessas mutações são produtos protéicos não funcionais.

Em um indivíduo japonês foi observada uma substituição de um aminoácido na posição 1298 da molécula de C3 (Arg por Gln). Esta região é onde ocorre a clivagem de C3b por fI, a troca desse aminoácido, no entanto, impede que tal clivagem ocorra. O C3b gerado no soro do deficiente não pode ser inativado, sendo consumido pela via alternativa, assim como outros componentes que dela fazem parte. As características dessa deficiência são as mesmas de uma deficiência secundária de C3, porém, ao contrário das outras, cujas causas moleculares estão presentes no gene de fI (ou fH), este defeito está localizado no gene de C3 (WATANABE *et al.* 1993).

### 1.4.1.1.3. Adquirida

Os quadros de GNMP, glomerulonefrite aguda ou crônica podem estar associados com deficiências de C3 provocadas pelos auto-anticorpos de IgG denominados de NeF. Os anticorpos C3NeF e C4NeF reconhecem epítomos expressos somente nas convertases alternativa (no fragmento Bb) e clássica, respectivamente (a localização exata deste último não é clara). Sua ligação estabiliza essas enzimas causando a depleção de C3 (DAHA *et al.* 1978).

A presença dos NeF está associada com a produção de grandes quantidades de ICs, que se depositam nos glomérulos, causando os danos observados. Em outros tecidos, como o adiposo, podem ocorrer danos relacionados a esses fatores, provocados, possivelmente, por uma maior lise celular pelo MAC. Outro elemento a intensificar a inflamação local é a geração de grandes quantidades de anafilotoxinas, C3a e C5a (MATHIESON *et al.* 1993).

**Tabela 1.1. Quadro clínico e causas moleculares das deficiências primárias de C3 em indivíduos homocigotos<sup>a</sup>**

<i>Nacionalidade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Consanguinidade</i>	<i>Infecções e agente causador</i>	<i>Outras manifestações</i>	<i>Causas moleculares</i>
Sul-africana (africânder) (ALPER <i>et al.</i> 1972)	1 F	S	Pneumonia (14x): <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Klebsiela aerogenes</i> ; meningite: <i>N. meningitidis</i> ; otite média	Erupções eritematosas	Deleção de 800 pb, excluindo totalmente exons 22 e 23 e causando mudança do quadro de leitura do RNA, com geração de códon de parada (BOTTO <i>et al.</i> 1990b)
Norte-americana (BALLOW <i>et al.</i> 1975)	1 F	N	Septicemia: <i>S. pneumoniae</i> ; infecções do trato urinário: <i>E. coli</i> ; otite média: <i>H. influenza</i> tipo B	GNMP (BERGER <i>et al.</i> 1983)	
Sul-africana (caucasóide) (GRACE <i>et al.</i> 1976)	1 F	N	Meningite (3x): <i>S. pneumoniae</i> ; pneumonia lobar: <i>S. pneumoniae</i> Faleceu aos 7 anos e 6 meses. A necrópsia revelou meningite purulenta com presença de PMN	Ausência de C1q.	
Norte-americana (caucasóide) (OSOFSKY <i>et al.</i> 1977)	1 M	S	Otite média	Erupções macropapulares; artralgia no pulso. Transfusão de sangue total eliminou os sintomas	
Norte-americana (DAVIS <i>et al.</i> 1977)	1 F	ND	Pneumonia; artrite séptica; otite média; faringite; convulsões		
Libanesa (PUSSSELL <i>et al.</i> 1980)	1 F 1 F 1 M	ND	- Otite média - Peritonite: <i>S. pneumoniae</i> - Peritonite	Proteinúria (em todos); microhematúria (nas 2 F) GNMP (apenas no M) Sintomas de doença semelhante a SLE;	
Japonesa (SANO <i>et al.</i> 1981)	2 F	S	Bronquite (em apenas 1 deficiente)	artralgia; eritema macropapular	
Taiwanesa (HSIEH <i>et al.</i> 1981)	1 F	N	Pneumonia; otite média: <i>H. influenza</i> ; peritonite; artrite séptica	Erupções cutâneas durante a infecção; artralgia	Mutação de sítio doador de “splicing” no íntron 10, substituição de GT por TT, causando a deleção de todo ou parte do exon 10 (HUANG e LIN 1994)

**Tabela 1.1. Continuação**

<i>Nacionalidade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Consanguinidade</i>	<i>Infecções e agente causador</i>	<i>Outras manifestações</i>	<i>Causas moleculares</i>
Holandesa	1 F	ND	- Meningite: <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>		

(ROORD <i>et al.</i> 1983)	1 F 1 F		- Meningite: <i>S. pneumoniae</i> ; otite média - Osteomielite; otite média	- Erupções macropapulares - Erupções macropapulares; GNMP	
Laotiana (BORZY <i>et al.</i> 1971)	1 M	N	Pneumonia lobar; meningite (2x): <i>S. pneumoniae</i>	GNMP	Tamanho normal de RNAm, pró-C3 e cadeias $\alpha$ e $\beta$ ; a quantidade de C3 e RNAm sintetizado por fibroblastos equivalente a 1% do normal. Não foram encontrados defeitos na região promotora (SINGER <i>et al.</i> 1996)
Brasileira (GRUMACH <i>et al.</i> 1988)	1 M	S	Meningite (3x): <i>N. meningitidis</i> ; broncopneumonia (4x); otite média; osteomielite (2x); piodermite; infecções do trato urinário		
Inglesa (BOTTO <i>et al.</i> 1990)	1 M	S	Otite média; infecções respiratórias: <i>S. pyogenes</i>	Erupções multiformes durante infecção Nefropatia de IgA; síndrome semelhante a SLE	Mutação em sítio doador de “splicing” no íntron 18, GT para AT, causando mudança do quadro de leitura e reconhecimento de códon de parada precoce
Japonesa (IMAI <i>et al.</i> 1991)	1 M	S	Meningite		
Neo-zelandesa (PELEG <i>et al.</i> 1992)	1 M	ND	Pneumonia	Artralgia; eritema macropapular	Defeito em um dos alelos impede a secreção, pela substituição de um aminoácido na cadeia $\beta$ , Asp <sub>549</sub> para Asn (SINGER <i>et al.</i> 1994b). O defeito no outro alelo resulta no bloqueio da síntese de pró-C3 (KATZ <i>et al.</i> 1995)
Turca (SANAL <i>et al.</i> 1992)	1 F	ND	Meningite pneumocócica; hepatite; otite média		

<sup>a</sup> Tabela modificada de SINGER *et al.* 1994b. **ND:** não determinado; **GNMP:** glomerulonefrite membranoproliferativa, **SLE:** lúpus eritematoso sistêmico; **PMN:** leucócitos polimorfonucleares.

## **II. Objetivos do trabalho**

2.1. Caracterizar a deficiência encontrada no paciente em estudo, através da determinação dos níveis plasmáticos de componentes do complemento, investigando também alguns aspectos da imunidade humoral e celular e pelo estudo do comprometimento de algumas das funções biológicas dependentes da ativação do sistema.

2.2. Caracterizar, por estudos de polimorfismo de C3 o(s) alelo(s) que possam estar envolvido(s) na herança dessa deficiência, de modo a compreender o seu padrão de herança na família em estudo.

2.3. Avaliar a síntese e secreção de C3 em culturas de fibroblastos do probando.



## **III. Materiais e métodos**

### **3.1. Resumo clínico**

O probando L.A.S. é do sexo masculino, nascido em São Paulo a um de Abril de 1991. Ele vem de uma família numerosa natural do Rio Grande do Norte e é filho de pais consangüíneos em segundo grau (tio e sobrinha). Não se registram em sua família antecedentes de doenças congênitas, ou outro tipo de doença grave. Previamente ao nascimento dessa criança, porém, esse casal já havia tido quatro filhos falecidos antes de completarem 4 meses de vida, por motivos diversos. Quatro anos após seu nascimento os pais tiveram outro menino, perfeitamente saudável.

Até os 4 anos de idade essa criança havia sofrido, entre outros episódios infecciosos menos preocupantes, uma adenite severa, tratada com amoxicilina e clavulonato e uma sinusite maxilar. Até o fim do ano seguinte ele sofreu outra sinusite, 2 amidalites purulentas, 1 broncopneumonia, giardíase e adenite cervical severa. Esta última infecção não respondeu ao tratamento com antibióticos e regrediu somente após uma infusão de plasma normal. Isto proporcionou níveis parciais de C3 funcional ao soro, que se mostraram capazes de conter a infecção em um curto intervalo de tempo.

Quando começou a ser atendido no Ambulatório de Pediatria da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, aos 5 anos e meio de idade, L.A.S. havia recentemente sofrido de varicela infectada, com abscesso axilar esquerdo tratado no Hospital João XXIII com cefalexina por 10 dias e apresentava manchas arrocheadas nas pernas, que foram diagnosticadas como vasculite.

### **3.2. Obtenção dos soros humanos**

Foram colhidos 10 mL de sangue total, após consentimento da família, do probando e de seus familiares e deixados em repouso durante 45 min em gelo para retração do

coágulo. Os soros foram separados por centrifugação a 600 g por 15 min a 4°C e imediatamente alíquotados em tubos de microcentrífuga e congelados a -80°C.

Para a obtenção da mistura de soros humanos normais (SHN) foram retirados 5-7 mL de sangue de cada indivíduo. O sangue foi centrifugado após 45 min em gelo, como descrito acima e os soros, não alíquotados, foram congelados a -80°C. Posteriormente esses soros foram descongelados e volumes iguais de cada foram misturados em tubos de microcentrífuga, em gelo, e estocados a -80°C.

Os indivíduos normais foram recrutados entre colegas do Departamento de Imunologia e pessoas que atenderam ao posto da Fundação Pró-Sangue localizado no Hospital Universitário da USP. Foram descartadas amostras que apresentaram sorologia positiva ou indeterminada para qualquer um dos testes realizados pela própria Fundação: hepatites B e C, sífilis, doença de Chagas, HIV I, HTLV I e II.

Para a utilização nos ensaios funcionais do sistema complemento as alíquotas de soros puros e da mistura de soros normais foram descongeladas imediatamente antes do experimento, sendo utilizadas uma única vez com esse fim. Nas dosagens de proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas foram utilizadas tanto alíquotas congeladas a -20°C quanto a -80°C.

### **3.3. Obtenção de soro de coelho anti-C3 humano**

Os animais foram imunizados com C3 humano purificado de plasma humano normal obtido em nosso laboratório.

Foram injetados, por via sub-cutânea, 4 µg de C3 em PBS (solução salina tamponada com fosfato) emulsificado v/v com adjuvante completo de Freund, divididos em duas aplicações de 3 mL cada em dias consecutivos no dorso dos animais (três pontos de aplicação cada). Após 21 dias os animais foram desafiados por via intra-venosa com 6 µg de C3 em PBS, divididos em duas aplicações em dias consecutivos. Passados 4 dias da última inoculação foi feita uma sangria teste nos animais para verificação dos níveis de anticorpos específicos no soro por imunodifusão dupla. Tão logo foram confirmados títulos satisfatórios de anticorpos contra C3 humano nesses soros foi feita sangria total por punção cardíaca nos animais.

A separação dos soros foi feita como descrito acima, estes foram aliquotados e congelados a -20°C.

### **3.4. Imunodifusão radial quantitativa**

O método de imunodifusão radial simples (ver OUCHTERLONY e NILSSON 1978) foi usado para determinar as concentrações plasmáticas dos componentes C3, C4, fator H e fator I nos soros do probando e familiares e das classes de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA no soro do probando. Para tanto utilizaram-se placas de vidro de 8 x 8 cm recobertas por uma camada de 1 mm de agarose a 1% em PBS contendo 2% de soro policlonal de cabra com anticorpos específicos para C4, fH ou fI, de carneiro para IgG, IgM e IgA ou de coelho para C3.

Foram feitos orifícios de 3 mm de diâmetro nos géis de agarose, nos quais foram aplicadas, em duplicata, amostras de 5 µL dos componentes purificados: C4, fH e fI, Igs e C3 com concentrações conhecidas, de misturas de soros humanos normais e dos soros teste (probando e familiares). Após 24 h de difusão das proteínas a 4°C em ambiente úmido as lâminas foram submergidas em uma solução de cloreto de sódio a 0,15 M em água destilada por mais 24 h a 4°C (exceto para o fator H); ao fim desse período as lâminas foram secas em estufa a 37°C por 48 h, coradas com solução de azul de Coomassie por 20 min e descoradas por 2 h.

Com os valores dos diâmetros dos halos formados pelos componentes purificados nas placas foram feitas curvas padrão de concentração, das quais foram extrapolados por regressão linear os valores das concentrações dos componentes nos soros teste.

### **3.5. Imunodifusão dupla bi-dimensional**

A ocorrência das proteínas C5, C6, C7, C8 e C9 nos soros testados foi avaliada utilizando-se esta técnica, que permite a análise semi-quantitativa de um antígeno presente em uma solução ou em uma mistura de antígenos, (OUCHTERLONY e NILSSON 1978).

Foram aplicados 5  $\mu$ L dos anti-soros de cabra contendo os anticorpos de interesse. Nos demais orifícios foram aplicados 5  $\mu$ L de misturas de SHN e soros teste puros e diluídos a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 em PBS. As lâminas foram feitas em duplicata.

Após 48 h de difusão a 4°C as lâminas foram lavadas e coradas como descrito acima. Os resultados do ensaio foram apresentados como a maior diluição da mistura de SHN e dos soros teste capazes de formar uma linha visível de precipitação em contato com o anti-soro (ver: figura 3.4).

### **3.6. Radioimunoensaio competitivo**

Para quantificar o C3 presente no soro do probando foi utilizado um ensaio indireto em que esta proteína compete pelos sítios de ligação de anticorpos específicos com C3 marcado radioativamente.

Placas de 96 poços foram cobertas com soro de coelho anti-C3 humano purificado a 0,1% em solução de bicarbonato de sódio a 10 mM, pH=9,6 (200  $\mu$ L/poço) e mantidas a 4°C por 24 h, quando esta solução foi substituída por 250  $\mu$ L de PBS-Blotto-tween e as placas incubadas por 30 min a 37°C. Foram depositados nos poços, após descartar a solução anterior, 100  $\mu$ L de C3 previamente marcado com iodo radioativo (C3-I<sup>125</sup>) empregando-se soluções de cloramina T e metabissulfito de sódio, (HUNTER 1978) com uma atividade específica de 200.000 cpm/mL; foi adicionado conjuntamente o mesmo volume de soro (teste ou normal) diluído a 1:1.000, 1:1.500 e 1:2.000 ou C3 humano purificado, nas concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 e 0,0312  $\mu$ g/mL, ambos em PBS-Blotto-tween.

A curva padrão de concentração, assim como as concentrações das amostras individuais foram estabelecidas pela leitura da emissão radioativa dos poços isolados em contador gama. Foram realizados controles negativos: sem anticorpo e com C3-I<sup>125</sup>; com anticorpo sem C3-I<sup>125</sup> e positivos: com anticorpo, C3-I<sup>125</sup> sem C3 radioativo.

### **3.7. Ensaio hemolítico para dosagem de CH<sub>50</sub>**

Este ensaio baseou-se no descrito por Mayer (1961), com algumas modificações. Eritrócitos de carneiro em solução de Alsever (v/v) foram lavados com solução salina, centrifugados a 500 g por 5 min a 4°C, por duas vezes e ressuspensos a 5% em tampão TEA-VC (via clássica). Essa suspensão foi incubada por 30 min com soro de coelho anti-eritrócito de carneiro (hemolisina), inativado a 56°C por 30 min e diluído a 1:5.500 no mesmo tampão (a suspensão de eritrócitos sensibilizados constitui o sistema hemolítico).

Para os ensaios foram feitas quatro diluições dos soros em TEA-VC: 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60 e, partindo destas, foram feitas quatro séries de nove tubos, com diluições finais de: 1:50, 1:81, 1:111, 1:143, 1:176,5, 1:207, 1:231, 1:261 e 1:300 (série A); 1:67, 1:108, 1:148, 1:190,5, 1:235, 1:276, 1:308, 1:348 e 1:400 (série B); 1:83, 1:135, 1:185, 1:238, 1:294, 1:345, 1:385, 1:435 e 1:500 (série C) e 1:100, 1:162, 1:222, 1:286, 1:353, 1:414, 1:461,5, 1:522 e 1:600 (série D).

De cada uma das 36 diluições resultantes foram retirados 0,6 mL e adicionados, em tubos de vidro, a 0,4 ml de eritrócitos sensibilizados, em banho de gelo; as misturas resultantes foram incubadas em banho-maria por 30 min a 37°C, sob agitação moderada (60 rpm), para permitir a lise dos eritrócitos. Como branco da reação foi incluído controle com TEA-VC sem soro e como controle positivo foi utilizada água destilada no lugar do soro diluído, ambos em duplicata. Ao término do período de reação foi adicionado 1 ml de tampão TEA-EDTA a 0-4°C em todos os tubos, os quais foram imediatamente centrifugados a 500 g por 5 min a 4°C para sedimentação das hemácias remanescentes e os sobrenadantes transferidos para outros tubos.

Os valores de lise foram obtidos pela leitura da densidade óptica (D.O.) do sobrenadante das reações em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 541 nm, em cubetas de vidro. Com base nos valores do branco da reação (lise espontânea dos eritrócitos) e do controle com água destilada (100% de lise) calculou-se a proporção de lise provocada por cada diluição do soro, desta forma foi calculado o valor de Y para cada diluição:

$$\text{Fórmula 3.1. } Y = \frac{\text{lise}}{1 - \text{lise}}$$

Curvas de Y por volume de soro correspondente foram construídas para cada série de diluições e o CH<sub>50</sub> desses soros foi determinado, ou seja: o volume de soro necessário para promover a lise de 50% dos eritrócitos; que corresponde na curva a Y=1. Os resultados foram apresentados como unidades de CH<sub>50</sub>/mL de soro.

### **3.8. Ensaio hemolíticos comparativos**

Os ensaios hemolíticos comparativos para as vias clássica e alternativa descritos por NILSSON e NILSSON (1984) permitem a análise de vários soros individuais simultaneamente, utilizando uma única dose de cada, ao invés de várias diluições e em volumes finais pequenos. Os valores de atividade lítica são obtidos pela comparação com uma mistura de soros normais. Ensaio hemolítico em placas revestidas por agarose contendo hemácias sensibilizadas foram feitos para verificar o efeito da reposição de C3 no soro do probando.

#### **3.8.1. Via clássica**

##### **3.8.1.1. Ensaio hemolítico em tubos**

O sistema hemolítico foi preparado como descrito acima, em seguida os eritrócitos sensibilizados foram ressuspensos a 40% em TEA-VC. A mistura de SHN e os soros teste foram diluídos a 1:5 em TEA-VC e misturados v/v (100 µL) com a suspensão de eritrócitos, como branco da reação foi incluído um tubo contendo apenas TEA-VC. As misturas resultantes foram incubadas por 20 min a 37°C sob agitação vigorosa (90 rpm), ao término da qual foram adicionados 3 mL de TEA-EDTA resfriado a 0-4°C para parar a reação. Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro a 541 nm, como descrito acima. A lise de cada soro foi calculada como a proporção da lise de um tubo contendo 100 µL de sistema hemolítico e 3,1 mL de água destilada.

A atividade hemolítica foi apresentada como porcentagem da atividade da mistura de SHN.

### **3.8.1.2. Ensaio hemolítico em placas**

Para verificação da atividade hemolítica do soro do probando, após reposição de C3 purificado, foi feito um ensaio hemolítico em placas revestidas por agarose contendo hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina diluída a 1:5.500.

A agarose foi dissolvida a 1% em tampão veronal. Antes de revestir as placas, com a agarose a uma temperatura não muito elevada, foi adicionada a suspensão de hemácias, para uma concentração final de 5%. Os soros foram aplicados, puros e diluídos em tampão veronal, nos orifícios feitos nas placas (3 mm de diâmetro) e estas foram incubadas a 4°C em câmara úmida por 24 h. Passado esse período, as placas foram postas em estufa a 37°C por 2 h, para possibilitar a lise das hemácias.

Foi empregado soro do probando puro e diluído a 1:2 em tampão veronal. Amostras de soro do probando com adição de C3 purificado a 1 mg/mL foram aplicadas, assim como soro do probando diluído v/v com soro de outro indivíduo deficiente de C3 ou com soro normal. Os diâmetros dos halos de lise formados pelos soros-teste foram comparados com uma mistura de soros de 46 doadores adultos normais.

### **3.8.2. Via alternativa**

Neste ensaio foram usados eritrócitos de coelho, que ativam diretamente a via alternativa independentemente de anticorpos específicos (PLATTS-MILLS e ISHIZAKA 1974). Os eritrócitos foram diluídos a 50% em TEA-VA (via alternativa) e foram misturados, num volume de 100 µL, a 50 µL de soro não diluído, tanto da mistura normal como dos testes. Todos os passos a seguir, inclusive incubação, centrifugação e cálculo das proporções de lise foram feitos da mesma forma descrita para a via clássica. Tubos contendo apenas TEA-VA (branco) ou água destilada (100% de lise) foram incluídos como controles.

A atividade do soro teste foi apresentada como a porcentagem da atividade da mistura de SHN (soro referência) corrigida por um fator R, que é a relação do soro referência com a atividade média de soros normais, previamente determinados:

$$\text{Fórmula 3.2. Atividade soro teste} = \frac{\text{D. O. soro teste}}{\text{D. O. soro referência}} \times 100 \times R$$

Sendo que:

$$\text{Fórmula 3.3. R} = \frac{\text{atividade do soro referência}}{\text{atividade média dos soros normais individuais}}$$

### 3.9. Ensaio quimiotático

O ensaio original foi adaptado da literatura (ZIGMOND e HIRSCH 1973) e consiste na avaliação da migração de leucócitos através de um filtro de nitrocelulose de aproximadamente 120  $\mu\text{m}$  de espessura com poros de 5  $\mu\text{m}$ , em resposta a diferentes estímulos quimiotáticos. O filtro é colocado numa câmara (BOYDEN 1962) que consiste de dois compartimentos cilíndricos de acrílico, com capacidade para 0,5 mL, firmemente ajustados com o auxílio de anel de borracha.

Utilizou-se como padrão uma mistura de 46 SHN diluída a 5% em SSBH (solução salina balanceada de Hank) e tratada de duas formas: ativada com LPS a 65  $\mu\text{g/mL}$  durante 30 min a 37°C, ou inativada por aquecimento durante 30 min a 56°C. O soro do probando foi diluído a 5% e a 10% em SSBH e ativado com LPS, como descrito acima. Como controle basal da reação foi utilizado SSBH sem soro.

Foram colhidos 5 mL de sangue de indivíduos normais e saudáveis em tubos contendo heparina a 20 U/mL e que foram utilizadas como fonte de leucócitos. Os números totais de células em 10  $\mu\text{L}$  de sangue foram determinados em hemocítmetro de Neubauer após coloração com cristal violeta (1:20). A viabilidade total das células de cada amostra de sangue foi determinada pelo método de exclusão de corante, misturando-se iguais volumes de sangue previamente diluído a 1:100 em PBS e de azul de Tripán e observando, em hemocítmetro de Neubauer, a porcentagem de células incapaz de expulsar o corante após 5 min. Não foram utilizadas suspensões de leucócitos com viabilidade menor que 95%.



No compartimento inferior de cada câmara foram depositadas as fontes de fatores quimiotáticos, num volume de 0,5 mL e no compartimento superior 0,5 mL da suspensão de sangue total na diluição de  $1 \times 10^6$  células/mL em SSBH. Foram feitas duplicatas para cada tratamento.

As câmaras foram incubadas por 45 min em estufa a 37°C num ambiente úmido. Os filtros foram então removidos, sendo o excesso de hemácias foi eliminado com um breve jato de água destilada e os filtros imediatamente colocados em recipientes com etanol absoluto, por 5 min para fixar as células. Estas foram, em seguida, lavadas por 2 min em H<sub>2</sub>O destilada, coradas em hematoxilina por 45 s e lavadas por mais 2 min em H<sub>2</sub>O destilada. Os filtros foram, a seguir, imersos numa solução de carbonato de lítio por 10 min e desidratados progressivamente em etanol 70%, etanol 95% e butanol/etanol (4:1), todos por 10 min. Para diafanizar os filtros e permitir uma melhor visualização das células estes foram deixados em xilol por 12 hs. A observação das células em microscópio óptico foi feita com os filtros montados entre lâmina e lamínula com meio de montagem Entellan.

Para se calcular os valores da migração das células foram escolhidos seis campos ao acaso, não sobrepostos, em cada filtro. Com a objetiva de 40X de aumento foi focalizado o plano correspondente à superfície do filtro originalmente em contato com a suspensão celular. A distância entre esta e o plano em que puderam ser observadas apenas três células em foco foi calculada por meio da escala graduada do botão micrométrico. Foi calculada a média da distância migrada nos doze campos observados (nas duplicatas) para cada preparação: soro padrão, inativado, teste ou branco, (SSBH sem soro) assim como o desvio padrão dos valores.

### **3.10. Ensaio de fagocitose de *Candida albicans***

A opsonização de *C. albicans* por soro normal e do probando foi avaliada por meio da visualização dos fungos fagocitados e mortos por leucócitos humanos normais. Os fungos em cultura foram mantidos em tubos contendo meio sólido Sabouraud, sendo utilizadas apenas culturas repicadas a menos de um mês. Aproximadamente 24 h antes de cada experimento foi feito um novo repique no mesmo meio, do qual foi retirado um

inóculo de fungos imediatamente antes do ensaio, o qual foi ressuspendido em SSBH para  $1 \times 10^7$  *Candida*/mL.

A suspensão de *Candida* foi diluída a 1:1 com SHN (200  $\mu$ L de cada) ou com soro do probando, ambos diluídos a 40% em SSBH e incubada em banho-maria por 30 min a 37°C para possibilitar sua opsonização. Foram também utilizados SHN previamente inativado por aquecimento a 56°C por 30 min e SSBH sem soro, este último como controle basal da reação.

Foram colhidos 5 mL de sangue total de indivíduos normais em tubos contendo heparina a 20 unidades/mL e os números totais de leucócitos foram determinados em hemocítmetro de Neubauer após coloração com cristal violeta. O sangue foi então diluído em SSBH para a obtenção de uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  leucócitos/mL. A viabilidade total dessas células foi calculada como descrito acima.

Os fungos opsonizados foram então misturados com a suspensão de leucócitos, em volumes iguais (400  $\mu$ L). A preparação resultante foi incubada em banho-maria a 37°C com agitação moderada (60 rpm) por 60 min.

Ao término do período de fagocitose diluiu-se a suspensão contendo leucócitos e fungos a 1:5 em azul de Turk 20% e 200  $\mu$ L foram aplicados em lâminas de vidro limpas montadas em câmaras de Suta, em duplicata. O excesso de líquido foi absorvido por papel de filtro, restando apenas as células aderidas ao vidro. Após 20 min, as células foram coradas com 1,5 mL de Rosenfeld por 5 min, seguindo-se adição de 2 mL de água destilada fervida (pH=6,5) por 15 min e lavagem em água corrente para retirada do excesso de corante. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente.

A visualização das lâminas foi feita em microscópio, com a objetiva de imersão (aumento final de 1000X). Foram observados 200 fagócitos em cada lâmina, registrando-se a presença ou não de fungos e o número de *C. albicans* vivas e mortas. Com esses dados foram calculados os parâmetros abaixo:

$$\text{Fórmula 3.4. Porcentagem de fungos mortos} = \frac{\text{número de fungos mortos}}{\text{número de fungos fagocitados}} \times 100$$

número de fagócitos

$$\text{Fórmula 3.5.} \quad \text{Porcentagem de células com fungos} = \frac{\text{contendo fungos}}{\text{número total de células}} \times 100$$

### 3.11. Extração de DNA genômico de leucócitos sangüíneos humanos

Foram colhidos 10 mL de sangue periférico em tubos estéreis contendo 80 µL de uma solução de EDTA a 1,6 mM, pH=8,0, tanto do probando e seus familiares como de indivíduos normais. Adicionou-se aos tubos 90 mL de solução de lise estéril e estes foram centrifugados a 680 g por 15 min, o sobrenadante foi retirado e ao precipitado foram adicionados 4,5 mL de uma solução de cloreto de sódio a 75 mM e EDTA, pH=8,0 a 24 mM, após homogeneizar ligeiramente o precipitado foram adicionados 5 mL de uma solução contendo 5% de SDS e 100 µg/mL de proteinase K e os tubos incubados em estufa a 37°C por 12 h para degradar proteínas remanescentes.

O lisado foi misturado gentilmente com o mesmo volume de fenol saturado, pH=8,0, centrifugado a 680 g e o sobrenadante transferido para outro tubo, esse procedimento foi repetido mais uma vez com fenol e uma com clorofórmio-álcool isoamílico, 24:1, e visa retirar as proteínas da solução. O DNA foi precipitado com acetato de sódio a 0,3 M e etanol absoluto (dois volumes). Após centrifugação a o DNA foi lavado com etanol a 70% (0,5 mL) duas vezes, para retirar o excesso de sal do precipitado, ressuspendido em TE e estocado a 4°C. Todas as soluções utilizadas, assim como tubos e outros materiais que entraram em contato com soluções contendo DNA foram autoclavados a 121°C por 20 min para eliminar moléculas capazes de degradar DNA (DNAses) porventura presentes nestes materiais.

### 3.12. Técnica de PCR para análise dos alelos de C3

Para amplificar segmentos do gene de C3 que são diferentes nos alelos S ("slow") e F ("fast") utilizamos, com pequenas alterações, uma técnica modificada de PCR, (reação de polimerase em cadeia) que consiste em amplificar o DNA genômico por meio de dois oligonucleotídeos iniciadores específicos para um ou outro alelo e um oligonucleotídeo comum a ambos. Como tais oligonucleotídeos diferem em apenas uma base a temperatura

de anelamento utilizada é consideravelmente alta, conferindo uma seletividade bastante grande à técnica (FINN e MATHIESON 1992).

Foram utilizados 200 ng de DNA genômico dos indivíduos em uma solução contendo deoxinucleotídeos a 1 mM, cloreto de magnésio a 3 mM; oligonucleotídeos a 2  $\mu$ M, tampão do fabricante 1X concentrado (tris-HCl a 20 mM, pH 8,4 e cloreto de potássio a 50 mM) e 3,5 unidades de *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase, para um volume final de 25  $\mu$ L.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram CCAACAGGGAGTTCAAGTCAGA AAAGGTGG, (C3F) para a região 5' do alelo que codifica a proteína F; CCAACAGGGA GTTCAAGTCAGAAAAGGTGC, (C3S) para a região 5' do alelo S. Esses oligonucleotídeos hibridam com o DNA molde na região que vai da posição 334 a 363 no cDNA do gene de C3; para a região 3' de ambos os alelos foi utilizado 5'-TGTTGACCATGACCGTCCGGCCCACG GGTA-3' (C3CP), região que corresponde às posições de 528 a 558 no cDNA.

A reação de amplificação envolveu trinta e cinco ciclos de 1 min de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento e extensão a 73°C.

Alíquotas dos produtos amplificados foram aplicadas em géis de agarose a 2,5% em tampão TBE (tris-borato-EDTA) numa cuba de eletroforese e os géis submetidos a 8 V/cm durante 45-60 min, depois do que foram analisados sob luz ultra-violeta após coloração em solução de brometo de etídio a 1:10.000 e fotografados em máquina Polaroid. As bandas fluorescentes dos produtos foram comparadas com o tamanho relativo de bandas de DNA de bacteriófago  $\phi$  174 digerido com *Hae* III (de *Haemophilus aegyptius*).

### **3.13. Cultura de fibroblastos de pele**

Fragmentos de pele de aproximadamente 3 mm<sup>2</sup> foram retirados dos indivíduos, (probando, mãe e indivíduos normais) com o seu prévio consentimento, por pessoal médico. Os fragmentos foram imediatamente depositados em meio de cultura para descontaminação por 2 h. Cortes finos deste material foram posteriormente realizados, sob condições de esterilidade, com tesoura íris e transferidos para garrafas de cultura estéreis de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com SBF. Para possibilitar a aderência e

proliferação dos fibroblastos em contato com a superfície da garrafa, os cortes foram cultivados sob lamínulas de vidro. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C sob uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub> (VYSE *et al.* 1994).

Após 3-5 semanas de cultivo, quando os fibroblastos aderidos às garrafas apresentavam aproximadamente 80% de confluência, os mesmos foram removidos utilizando-se uma solução de tripsina. Após centrifugação a 500 g por 10 min à temperatura ambiente, as células foram ressuspensas novamente em meio DMEM contendo SBF e transferidos para novas garrafas de cultura (repique). No terceiro repique os fibroblastos foram transferidos para novas garrafas de cultura para imediata utilização em experimentos de marcação metabólica ou ressuspensos em SBF contendo 10% de DMSO e congelados em nitrogênio líquido dentro de tubos criogênicos, para futura utilização.

### **3.14. Estimulação dos fibroblastos e marcação metabólica com metionina-S<sup>35</sup> e cisteína-S<sup>35</sup>**

Os fibroblastos, cultivados em meio DMEM suplementado, foram utilizados quando atingiram 80% de confluência em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, em estufa de CO<sub>2</sub>. As células foram removidas com solução de tripsina, centrifugadas, (como descrito acima) ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado, contadas em hemocitômetro e 0,5 x 10<sup>6</sup> células foram transferidas para placas de cultura estéreis de 35 mm de diâmetro, em duplicata, e mantidas em estufa até que atingissem 80% de confluência nas placas.

Foi adicionado às culturas confluentes, após retirada do meio antigo e lavagem das células com PBS estéril, meio DMEM completo (com antibióticos) sem SBF contendo 1 µg/mL de LPS, por 24 h, para estimular a síntese de C3 e fator B pelas células (STRUNK *et al.* 1985).

Duas horas antes da marcação, o meio de cultura com LPS foi substituído por meio DMEM sem cisteína e metionina, o que obriga as células a consumir os estoques intracelulares desses aminoácidos. Foram, então, adicionados 250 µCi de Trans<sup>35</sup>S-label, contendo aproximadamente 70% de <sup>35</sup>S-met e 15% de <sup>35</sup>S-cis e as células incubadas por mais 5 h em estufa. Após esse período o sobrenadante das células de uma das duplicatas foi coletado, as células lavadas com PBS e lisadas com solução de lise. À outra duplicata foi

adicionado mais 1 mL de DMEM suplementado (contendo met e cis, além de 10% de SBF) e as células retornadas à estufa por mais 24 h, quando retirou-se também o sobrenadante das células e estas foram lisadas.

Os sobrenadantes e lisados celulares foram centrifugados por 5 min a 15.000 g à temperatura ambiente e transferidos para novos tubos, e aos sobrenadantes foi adicionado 1 volume de tampão IPP, os tubos foram colocados em gelo e todas as novas centrifugações ocorreram a 4°C.

### **3.14.1. Precipitação das proteínas marcadas com TCA**

Foram coletadas duas alíquotas de 3 µL, tanto do lisado como do sobrenadante e foi adicionado a apenas uma delas 0,4 mL de uma solução contendo 0,025% de BSA e 7,5% de TCA (partindo de uma solução de TCA a 100% [p/v]) e centrifugadas a 15.000 g à temperatura ambiente por 5 min para precipitar as proteínas presentes na solução. Ao precipitado foram adicionados 300 µL de solução 5% de TCA e centrifugados por 5 min a 15.000 g à temperatura ambiente, por duas vezes, para lavá-lo. O precipitado foi então dissolvido em 0,2 mL de SDS a 2% em água destilada a 70°C.

Ambas alíquotas (com e sem TCA) foram diluídas em 5 mL de líquido de cintilação e 1 mL dessas amostras foram depositadas em tubos de plástico para serem lidas num contador de cintilação, em canal de leitura para S<sup>35</sup>.

### **3.15. Imunoprecipitação de C3 e fator B**

Foram adicionados 15 µL de SPA (previamente lavado com PBS contendo 0,5% de BSA) a 80% em PBS aos lisados e sobrenadantes e misturados por agitação vigorosa em vórtex, seguindo-se incubação por 1 h a 4°C sob oscilação moderada e centrifugação a 15.000 g por 2 min; todos os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Esse processo elimina imunoglobulinas bovinas introduzidas pela suplementação do meio.

Foram adicionados a tubos contendo os lisados celulares e os sobrenadantes da cultura 4 µL de soro de coelho policlonal mono específico anti-C3 humano e estes foram incubados por 12 h a 4°C, para propiciar a formação de imunocomplexos específicos.

Como controle de síntese e secreção proteica pelas células foram adicionados a outras alíquotas dos sobrenadantes e lisados 4 µL de soro de cabra policlonal mono específico para fator B humano, que foram incubadas da mesma forma. Após esse período foram adicionados 20 µL de SPA repetindo-se os passos de incubação e centrifugação descritos acima. Os sobrenadantes foram desprezados.

Os precipitados foram misturados num vórtex com 0,5 mL de tampão de lavagem e esta mistura foi centrifugada por 2 min a 15.000 g para reprecipitação do SPA; os precipitados foram lavados por mais 2 vezes dessa forma e 2 vezes em tampão de lavagem sem BSA. Após a última lavagem os precipitados foram centrifugados por 15 min a 15.000 g, todo o sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 50 µL de tampão de corrida para gel de poliacrilamida contendo DTT a 40 mM, aquecendo-se os tubos a 95°C por 3 min.

### **3.16. Gel de poliacrilamida com SDS para proteínas**

Para análise das proteínas radioativas imunoprecipitadas das culturas de fibroblastos, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e agente redutor, utilizando protocolo modificado da literatura (LAEMMLI 1970).

Foi feito um gel de corrida a 10% (**Tabela 3.1**) de 11 cm de comprimento x 17 cm de largura com 1,5 mm de espessura, encimado por um gel de empacotamento a 3% (**Tabela 3.2**) de 2 cm x 17 cm x 1,5 mm. As amostras de proteínas foram aplicadas nos poços do gel, juntamente com marcadores proteicos de pesos moleculares conhecidos e este foi submetido a 3 V/cm até que a linha de corante atingisse a linha divisória entre os géis e então a voltagem foi aumentada para 6 V/cm.

Após a corrida o gel foi submergido em azul de Coomassie brevemente aquecido por 45 min, para corar e fixar as bandas proteicas e deixado em solução descorante, sob agitação suave, por 12 h, ou até que as bandas das amostras e marcadores fossem nitidamente visíveis e bem contrastadas contra o fundo. O gel foi então lavado por 15 min em água destilada e por 1 h em solução de salicilato de sódio a 1 M, sob agitação moderada, para intensificar o sinal emitido.

O gel foi secado à vácuo, a 80°C por 3,5 h sobre uma folha de papel de filtro, quando foi, então, posto em contato com um filme para radiografia em um cassete à prova de luz, por três semanas a -80°C.

**Tabela 3.1. Gel de corrida a 10%**

<i>Soluções estoque:</i>	<i>Porcentagem (v/v) da solução final:</i>
Tris-HCl a 1,5 M, pH=8,8:	25
SDS a 10%:	1
Persulfato de amônio a 10%:	1
TEMED:	0,05
Solução monomérica de acrilamida:	33,5

**Tabela 3.2. Gel de empacotamento a 3%**

<i>Soluções estoque:</i>	<i>Porcentagem (v/v) da solução final:</i>
Tris-HCl a 0,5 M, pH=6,8:	25
SDS a 10%:	1
Persulfato de amônio a 10%:	1
TEMED:	0,05
Solução monomérica de acrilamida:	10

Todas as soluções foram feitas em água destilada (ver: SAMBROOK *et al.* 1989).

### 3.17. Tratamento estatístico dos dados obtidos

#### 3.17.1. Ensaio quimiotáticos



Foi feita uma análise de variância, seguida de um teste para comparações múltiplas (teste de Tukey) entre as várias variâncias amostrais, com um nível de confiança de 95%.

### **3.17.2. Ensaio de fagocitose**

Foram feitas comparações entre proporções, duas a duas, utilizando uma aproximação normal do teste de qui-quadrado (ver: ZAR 1996).

## IV. Resultados

### 4.1. Testes clínicos

As provas hematológicas, cutâneas e histológicas (**Tabelas 4.1-4.3**) realizadas com o probando não indicaram diferenças do que seria esperado para uma criança normal de sua idade. As provas cutâneas de leitura tardia e para verificação de imunecomplexos circulantes também não revelaram anormalidades grosseiras quanto à sua imunidade celular ou humoral.

Os números totais de sub-populações linfocitárias do probando foram avaliadas por citometria de fluxo (**Tabela 4.4**) e estão compreendidos no intervalo de normalidade disponível na literatura (REICHERT *et al.* 1991). Os números relativos dessas células não apresentam diferença relevante em relação ao normal.

As dosagens de imunoglobulinas e dos isótipos de IgG foram feitas por imunodifusão radial (**Tabela 4.5**). IgA e IgG totais revelaram valores normais, IgM, no entanto, mostrou-se bastante aumentada. A causa disto pode ser a existência freqüente de focos inflamatórios pequenos, sem grande relevância clínica. Chama a atenção também a discrepância entre os valores de IgG total quando comparados com os de IgG1, que lhe são superiores e ao intervalo normal. As dosagens de isótipos representam a média entre três experimentos enquanto que as de subtipos de IgG representam apenas um e nas três dosagens de IgG total os valores situaram-se dentro do intervalo normal. Os valores de IgG1 poderiam estar elevados devido a uma flutuação normal.

**Tabela 4.1. Testes clínicos realizados com o probando (provas imunohematológicas, cutâneas e eletroforese de proteínas séricas)**

<i>Prova</i>	<b>Resultado</b>	
	<i>Probando</i>	<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>
Iso-hemaglutininas:		
- Anti-A	1/32	-
- Anti-B	1/32	-
Tipo sanguíneo	O <sup>+</sup>	-
Tricofitina	negativo	-
Levedurina	negativo	-
PPD	negativo	-
HIV	negativo	-
Fator anti-núcleo (FAN)	negativo	-
Anti Estreptolisina-O (ASLO)	80 U	-
Eletroforese de proteínas séricas (mg/dL):		
- Albumina	4,07	3,5-5,5
- $\alpha$ 1	0,18	0,2-0,4
- $\alpha$ 2	0,71	0,5-0,9
- $\beta$	0,4	0,6-1,1
- $\gamma$	0,84	0,7-1,7

<sup>a</sup> Valores referentes a adultos, segundo THORN *et al.* (1977). Os testes foram realizados no Depto. de Pediatria, Seção de Imunopediatria da Escola Paulista de Medicina

**Tabela 4.2. Contagem diferencial de células sanguíneas do probando**

<i>Tipo celular</i>	<b>Nº total</b> (por mm <sup>3</sup> de sangue)	
	<i>Probando</i>	<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>
Leucócitos	8.480	6.000-15.000
Neutrófilos	2.410	3.000
Eosinófilos	580	100-300
Basófilos	90	0-150
Linfócitos	4.710	1.500-4.000
Monócitos	530	200-950
Plaquetas	273.000	200.000-350.000
Hemácias	4,6x10 <sup>6</sup>	4,5 ± 0,7x10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> Os valores normais são referentes a adultos (THORN *et al.* 1977), com exceção dos números totais de leucócitos, que são referentes a crianças brasileiras de 4 a 7 anos (CARVALHO 1994). Testes realizados no Depto. de Pediatria, Seção de Imunopediatria da Escola Paulista de Medicina.

**Tabela 4.3. Provas hematológicas realizadas com o probando**

<i>Parâmetro avaliado</i>	<b>Resultado</b>	
	<i>Probando</i>	<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>
Hematócrito (%)	30,5	35±5
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	11,6	12,2±2,3
Volume corpuscular médio (fL)	65,7	-
Hemoglobina corpuscular média (pg)	20,9	-
Concentração de hemoglobina corpuscular média (%/100 mL de hemácias)	31,8	-
RDW ("red cell distribution width") (fL)	17,9	-

<sup>a</sup> Valores normais referentes a crianças brasileiras de 3 meses a 10 anos, segundo CARVALHO (1994). Estudos realizados no Hospital Israelita Albert Einstein por pessoal do próprio hospital.

**Tabela 4.4. Avaliação dos números totais e relativos de subpopulações linfocitárias, no sangue do probando, por citometria de fluxo**

<i>População</i>	<b>Porcentagem</b>		<b>Nº total (por mm<sup>3</sup> de sangue)</b>	
	<i>Probando</i>	<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>	<i>Probando</i>	<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>
Linfócitos totais	46	25-40	3.404	1.500-3.500
Linfócitos B	22,2	27,8-39	756	-
Linfócitos T	78,4	60-90	2.669	900-3.200
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	35,1	20-35	1.195	300-1.200
Células NK	2,8	4-32	95	80-600

<sup>a</sup> Os valores normais incluem 95% da população caucasiana, segundo REICHERT *et al.*

(1991). Estudos realizados no Hospital Israelita Albert Einstein por pessoal do próprio hospital.

**Tabela 4.5. Concentrações das classes de imunoglobulinas e subclasses de IgG no soro do probando, determinadas por imunodifusão radial**

<i>Classes e subclasses</i>	<i>Probando</i>	<i>Concentração (mg/dL)</i>	
		<i>Intervalo normal por faixa etária<sup>a</sup></i>	
IgA	160,7	30-257	18 meses-9,9 anos
IgG (total)	1073	524-1.528	1-13,9 anos
IgG1	1.675	168-958	6 meses-7 anos
IgG2	57	18-264	
IgG3	109	15-124	
IgG4	< 8	8 - 77	
IgM	387,6	40-172	4-7,9 anos

As concentrações das classes de imunoglobulinas foram determinadas no Depto. de Pediatria, Seção de Imunopediatria da Escola Paulista de Medicina e no Laboratório de Mucosas do Depto. de Imunologia do ICB, USP. Os valores constituem a média de 3 determinações. As subclasses de IgG foram dosadas no Laboratório de Mucosas do Depto. de Imunologia do ICB, USP, pela bióloga Cristina Arslanian-Kubo. <sup>a</sup> Valores normais para as classes de imunoglobulinas segundo CARNEIRO-SAMPAIO e GRUMACH (1992) e para subclasses de IgG segundo FUJIMURA (1990).

#### **4.2. Concentrações plasmáticas de proteínas do sistema complemento**

Com o objetivo de auxiliar a compreensão do padrão de herança da deficiência de C3 e identificar de modo mais prático os indivíduos da família do probando, apresentamos

na **Figura 4.1** o heredograma da família do probando. Neste os indivíduos são identificados por algarismos romanos, representando a geração a que pertencem e arábicos, representando sua posição. No texto, nas tabelas e demais figuras deste trabalho utilizou-se a numeração dos indivíduos apresentada neste heredograma.

A concentração plasmática de C3 na criança imunodeficiente e nos seus familiares foi quantificada por imunodifusão radial simples, utilizando-se para tanto soro policlonal de coelho, obtido em nosso laboratório ou soro policlonal de cabra (comercial). Nenhum desses dois anti-soros, no entanto, foi capaz de precipitar C3 do soro do probando, ao contrário do observado para seus familiares ou para indivíduos normais (**Figura 4.2**).

Com a finalidade de certificar-se se esta ausência de C3 era completa ou se pequenas concentrações de C3, indetectáveis por imunodifusão radial, estariam presentes no soro do probando, foi empregado o método de radioimunoensaio competitivo (RIA). A concentração de C3 encontrada, dessa forma, foi de 0,15 µg/mL, enquanto que a presente em soro normal, calculada pelo mesmo método, foi de 1.160,0 µg/mL.

A mãe do probando (**III 5**) apresentou 429 µg/mL de C3, o que representa 25-40% da concentração normal, determinada pelo método (1244±346 µg/mL). Dois de seus tios, os indivíduos **III 4** e **III 10**, apresentaram concentrações próximas da metade dos valores normais, 535,1 e 589,4 µg/mL, respectivamente (35-60% do normal). Para os indivíduos **III 2** e **III 16**, foram encontrados 790,8 e 705,1 µg/mL, respectivamente, o que significa entre 50 e 75% dos valores normais (**Tabela 4.6**).

Tais níveis reduzidos de C3 seriam improváveis de se encontrar em pessoas normais a não ser no decorrer de um processo infeccioso, quando há um consumo elevado do C3 circulante, ou durante a recuperação deste. Também é possível, em contrapartida, encontrar níveis de C3 transitoriamente elevados durante um evento inflamatório, pois sua concentração aumenta em até três vezes durante a fase aguda. Tendo em vista os efeitos desses e outros fatores sobre as flutuações nas concentrações protéicas, os critérios utilizados para a colheita de sangue foram restritivos quanto a indivíduos sobre os quais houvesse qualquer suspeita de alteração no estado de saúde, assim como após jejum prolongado, sob efeito de álcool ou que estivessem fazendo uso de medicamentos. Para



umentar a fidelidade e a precisão dos dados obtidos realizamos, sempre que possível, mais de uma dosagem protéica para cada indivíduo, com soros colhidos em datas diferentes.

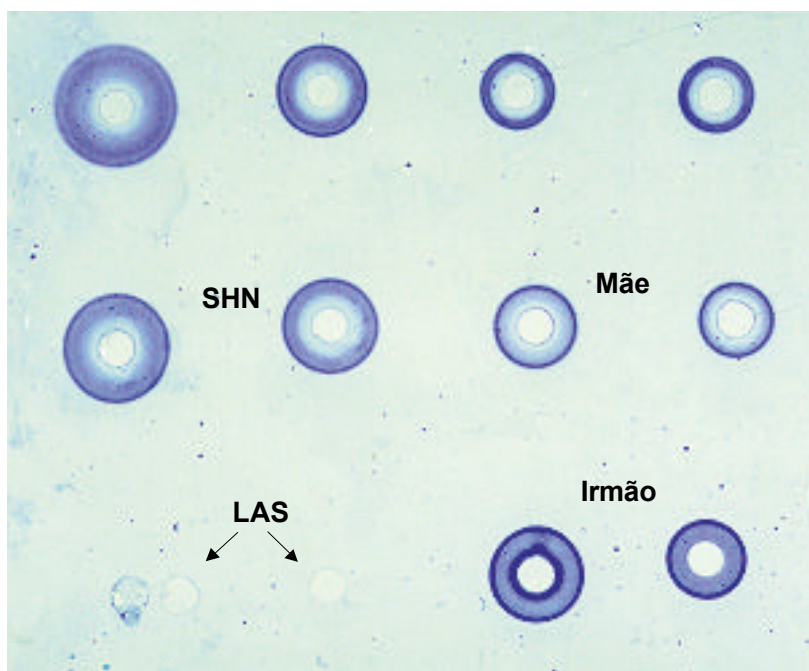
As concentrações das proteínas C4, fator H e fator I no probando foram avaliadas por imunodifusão radial, apresentando-se dentro dos intervalos de normalidade para sua idade (7 anos) (**Tabela 4.6**).

Os resultados parecem refletir a ocorrência de um alelo deficiente em alguns indivíduos da família do probando, que seriam heterozigotos assintomáticos para esta deficiência, já que nenhum indivíduo, com exceção do próprio probando, apresenta um histórico de infecções bacterianas recorrentes ou doenças por deposição de imunocomplexos. Este tipo de padrão é condizente com o observado nas deficiências de C3 estudadas até o momento (SINGER *et al.* 1994), assim como na maioria das doenças genéticas humanas conhecidas (THOMPSON & THOMPSON 1991).

As concentrações plasmáticas dos componentes C4, fator H e fator I do probando e familiares, calculadas por imunodifusão radial, apresentaram-se dentro dos intervalos normais descritos para as diferentes faixas etárias, citados na literatura (FERRIANI *et al.* 1991; MORGAN 1990) ou obtidos em nosso laboratório pelo mesmo método e de acordo com critérios estatísticos pré-estabelecidos (FERREIRA DE PAULA *et al.* 1999; dados não publicados). Os valores de fator I dos indivíduos **II 8** (tio paterno do probando) e **III 16** (tia materna), no entanto, mostraram-se mais elevados que a média normal ( $63,9 \pm 12,9$ ), ainda assim dentro do intervalo de 95% de normalidade (38,8-100,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Tabela 4.6**). Fato esse que não encontra correlação com os níveis de C3, pois apesar do indivíduo **III 16** apresentar níveis de C3 inferiores ao normal, o indivíduo **II 8** possui concentração normal desta proteína (1386  $\mu\text{g/mL}$ ).

A presença de outras proteínas do sistema complemento foi avaliada por imunodifusão dupla no soro do probando e de familiares, sem que fossem notadas diferenças marcantes entre estas e as ocorrentes no soro de indivíduos normais (**Tabela 4.7**). Este ensaio provê resultados comparativos entre a menor diluição do soro teste e normal capaz de provocar uma linha de precipitação em contato com anticorpos específicos (**Figura 4.3**).

C3 purificado ®



**Figura 4.1. Imunodifusão radial simples para determinação das concentrações de C3 no soro do probando e de familiares**

Nos orifícios foram aplicados 5 µL dos componentes purificados e dos soros. Foi utilizado soro de coelho anti-C3 humano diluído a 2% no gel. C3 purificado foi empregado nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. Os soros foram diluídos a 1:20 e 1:10. **SHN**: mistura de 46 soros normais. **LAS**: probando.

**Tabela 4.6. Concentrações plasmáticas de C3, C4, fator I e fator H no probando e familiares, determinados por imunodifusão radial simples**

Proteína	Concentração (µg/mL)													Intervalo normal <sup>b</sup>				
	Indivíduo													SHN <sup>a</sup>	3-6 anos	5-6 anos	6-9 anos	Adultos
	II 8	III 1	III 2	III 3	III 4	III 5	III 10	III 16	III 17	IV 5	IV 6	IV 7						
C3	1.584,5	1.102,5	790,8	1.259,3	535,1	429	589,4	705,1	1.190,8	970	<b>0</b>	1.250	1.244± 346	-	770- 1.390	-	1.050- 1.650	
C4	535	655,9	592,8	634,9	415,9	700	453,4	460	683	748,5	<b>602,1</b>	132,5	657± 107,8	-	-	-	-	
fator I	93	45,2	28,3	30,7	30,4	57,3	34,7	83	33,1	27,5	<b>55,2</b>	73,3	56±24,8	63,0± 14,9	-	52,5± 9,9	63,9± 12,9	
fator H	625,2	582,0	659,7	709,5	614,9	735,5	780,3	536,3	530,5	589,4	<b>448,8</b>	661,1	668± 35,6	736,8± 305	-	514,1± 195,9	453,8± 124,0	

<sup>a</sup> Misturas de 10 soros normais de adultos (fatores I e H) ou 46 soros (C3 e C4). <sup>b</sup> Os valores normais para as faixas de 3-6 anos e 6-9 são mostrados segundo FERREIRA DE PAULA *et al.* (1999), dados não publicados, os da faixa de 5-6 anos são segundo FERRIANI *et al.* (1991) e os de adultos segundo MORGAN (1990) (C3) e FERREIRA DE PAULA *et al.* (1999), dados não publicados (fH e fI). As concentrações de C3, C4 e fator H correspondem à média obtida entre, pelo menos, duas determinações diferentes para cada membro da família; os valores de fator I provem de determinações individuais. Os códigos dos indivíduos correspondem aos números atribuídos no heredograma (Figura 3.1). Os valores correspondentes ao probando estão em negrito.

**Tabela 4.7. Determinação semi-quantitativa de proteínas do sistema complemento de vários indivíduos da família do probando, por imunodifusão dupla**

<i>Proteína</i>	<b>Diluição<sup>a</sup></b>													
	<i>Indivíduo</i>													
	II 7	II 8	III 1	III 2	III 3	III 4	III 5	III 10	III 16	III 17	IV 5	<b>IV 6</b>	IV 7	SHN <sup>b</sup>
C5	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:8	1:16	1:8	1:8	1:8	<b>1:8</b>	1:8	1:8-1:16
C6	1:4	1:8	1:4	1:4	1:4	1:8	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8	<b>1:8</b>	1:8	1:4-1:8
C7	1:8	ND	1:8	1:8	1:4	1:8	1:8	1:4	1:8	1:4	1:8	<b>1:8</b>	1:16	puro-1:8
C8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:4	1:8	1:8	1:8	1:16	1:8	1:8	<b>1:16</b>	1:8	1:4-1:32
C9	1:16	1:16	1:16	1:2	1:8	1:8	1:8	1:32	1:8	1:8	1:8	<b>1:16</b>	1:8	1:8-1:16

<sup>a</sup> Os resultados são apresentados como a maior diluição do soro capaz de provocar uma linha de precipitação visível em contato com o anti-soro. <sup>b</sup> Mistura de 46 SHN. ND: não determinado. Os códigos dos indivíduos correspondem aos números atribuídos no heredograma (Figura 3.1). Os valores correspondentes ao probando estão em negrito.

### 4.3. Atividade hemolítica dependente das vias clássica e alternativa

#### 4.3.1. Via clássica

A atividade hemolítica dependente da via clássica foi de início avaliada pela determinação das unidades hemolíticas presentes por mL de soro, ou unidades de CH<sub>50</sub>, que correspondem ao volume de soro necessário para provocar 50% de lise das hemácias de uma suspensão, sob condições pré-estabelecidas (MAYER 1961).

Devido à sensibilidade deste método é preciso fazer diluições sucessivas do soro, que vão de 1:50 (2%), até 1:600 (0,2%) (para detalhes ver seção 2.7), pois dentro desse intervalo pode-se encontrar a diluição na qual os componentes da cascata enzimática de ativação do sistema complemento, assim como os constituintes do complexo de ataque à membrana estão presentes na quantidade exata para gerar uma unidade de CH<sub>50</sub>. Foram analisados dessa forma os soros do probando (IV 6), de sua mãe (III 5) e de outros dois parentes, III 1 e III 4.

Ao contrário dos outros, o soro do probando não foi capaz de provocar a lise dos eritrócitos, quando empregado nas diluições acima. Uma nova série de diluições foi portanto utilizada, variando de 1:1,7 (60%) até 1:10 (10%), com o que tampouco se obteve a lise de 50% das hemácias. O probando apresentou, assim, menos do que 4 unidades hemolíticas por mL de soro, que é o valor mínimo detectável pelo ensaio, nas condições envolvidas.

Os resultados de atividade hemolítica para a mãe estão abaixo dos encontrados para soros normais. Ainda assim esses valores não refletem o que seria esperado para um soro contendo aproximadamente um terço da concentração normal de C3 (429 µg/mL). O mesmo ocorre para o indivíduo III 4, que possui 535,1 µg/mL de C3 e atividade hemolítica mais próxima do intervalo normal e semelhante ao indivíduo III 1, que tem mais do dobro da quantidade de C3 plasmático (1.102,5 µg/mL) (Tabela 4.8). Ficou evidenciado com esses resultados que níveis parciais de C3 são capazes de atribuir ao soro uma capacidade hemolítica muito próxima do normal.

Além do método já mencionado, com o qual foram obtidos os resultados descritos acima foi empregado também um método comparativo para a análise das atividades hemolíticas da via clássica, semelhante ao utilizado para a via alternativa. Os valores de alguns indivíduos são apresentados de acordo com os dois métodos (**Tabelas 4.8 e 4.9**). O motivo pelo qual utilizou-se essa abordagem foi de que os valores normais obtidos em nosso laboratório pelo método de determinação de  $CH_{50}$  mostraram-se deslocados em relação ao intervalo considerado normal em testes de rotina no Lab. de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (e possivelmente em outros laboratórios clínicos). Pela apresentação dos valores encontrados para os soros-teste em porcentagem do normal pretendeu-se expor os resultados de uma forma mais clara, que evitasse interpretações equivocadas. Uma breve discussão sobre os dois ensaios foi feita nos parágrafos abaixo e no capítulo **Discussão**.

Os resultados obtidos pelos ensaios hemolíticos comparativos representam a lise de hemácias pelos soros-teste em relação à promovida por uma mistura de soros normais. Esse método tem como base o fato de que a hemólise por soro é constante mesmo na presença de hemácias em excesso e como vantagens a simplicidade em relação ao ensaio de determinação de  $CH_{50}$  e o pequeno volume de soro empregado em cada determinação (NILSSON & NILSSON 1984).

Assim como o ocorrido com a determinação de  $CH_{50}$ , a mãe do probando revelou, por esse método, a menor atividade hemolítica em relação ao normal, 81,6%. O indivíduo **III 4** apresentou uma atividade semelhante à da mãe, 86,3%, enquanto a atividade do soro de **III 1** foi de 96,4%. Todos os outros indivíduos estudados revelaram valores de lise entre 90 e 100% do normal (**Tabela 4.9**).

Os indivíduos **III 1** e **III 4** revelaram uma quantidade de unidades de  $CH_{50}$  por mL muito próximas, ao passo que uma diferença de mais de 10% entre as atividades líticas desses dois soros foi obtida pelo método comparativo. Analisando os resultados dos dois métodos concluiu-se que tanto um quanto o outro não são capazes de, por si só, revelar uma redução nos níveis C3 sérico (ou outras proteínas do sistema complemento), a menos que seja muito acentuada. Pelos resultados obtidos, portanto, as atividades hemolíticas

dependentes da via clássica de todos os indivíduos estudados devem ser consideradas normais.

Com o intuito de confirmar que a deficiência é realmente dependente de C3 e verificar a funcionalidade dos outros componentes do complemento presentes no soro do probando, efetuamos ensaios com reposição de C3. Além de C3 purificado, foram adicionados soro normal e soro de outro deficiente de C3 ao soro do probando, em iguais volumes. Este outro indivíduo deficiente de C3, C.A., foi inicialmente descrito por GRUMACH *et al.* (1988) e tem as bases moleculares de sua deficiência estudadas em nosso laboratório. Por conveniência e economia de C3 purificado, foram feitos ensaios hemolíticos comparativos, em placas de hemólise.

Observou-se que a reposição de C3 a uma concentração próxima de 80% do normal (1 mg/mL) restaurou a capacidade lítica do soro do probando, assim como o ocorrido ao se misturar soro normal (**Tabela 4.10**). Esse resultado atesta que não existem outros defeitos responsáveis por pela resposta anormal de ativação do sistema complemento no probando, além da ausência de C3.

#### **4.3.2. Via alternativa**

Na via alternativa, o C3b gerado pela clivagem de C3 pela convertase de fase fluída  $C3(H_2O)Bb$  deposita-se em superfícies aceptoras, levando à formação de mais C3 convertases, mecanismo que resulta em uma alça de amplificação. Uma superfície aceptora para C3b, que o protege da degradação e possibilita a continuidade da via alternativa (ver **Introdução**) é a membrana de hemácias de coelho (PLATTS-MILLS & ISHIZAKA 1974). Ensaios para verificação da atividade da via alternativa no soro empregam amplamente essas células, o que, juntamente com tampões contendo EGTA (para inibir a atividade da via clássica), os torna métodos muito simples e factíveis.

As avaliações das atividades hemolíticas dependentes da via alternativa foram efetuadas de acordo com o ensaio comparativo descrito acima. É de especial atenção neste caso o volume de soro a ser gasto, pois os ensaios de quantificação de unidades líticas no

soro, para a via alternativa ( $AP_{50}$ ) despendem uma grande quantidade de soro, maior que nos ensaios da via clássica.

Assim como o ocorrido para a via clássica, o probando apresentou atividade hemolítica pela via alternativa, completamente nula. Depois do probando os valores mais baixos de lise para a via alternativa foram obtidos com soro de sua mãe, que é o membro da família portando os níveis mais baixos de C3 (fora o próprio probando). Não obstante, esses valores correspondem a 86,3% do normal. Os valores para os demais indivíduos também ficaram dentro do intervalo de 80% a 100% do normal (**Tabela 4.9**).



**Tabela 4.8. Atividades hemolíticas dependentes da via clássica nos soros do probando e de alguns familiares, em unidades de CH<sub>50</sub>/mL de soro**

CH <sub>50</sub> (U/mL)						
<i>Indivíduo</i>					<i>Intervalo normal<sup>a</sup></i>	
III 1	III 4	III 5	IV 6	SHN <sup>b</sup>	Feminino	Masculino
124	127,5	118	<4	153,0±24,47	152-318	178-411

<sup>a</sup> Valores do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. <sup>b</sup> Mistura de 10 soros normais. Códigos: ver heredograma (**Figura 4.1**). Valores em negrito são referentes ao probando.

**Tabela 4.9. Atividades hemolíticas dependentes das vias clássica e alternativa nos soros do probando e familiares, em porcentagem do normal**

<i>Vias de ativação</i>	<i>Atividade hemolítica (porcentagem do normal<sup>a</sup>)</i>											
	<i>Indivíduo</i>											
	II 8	III 1	III 2	III 3	III 4	III 5	III 10	III 16	III 17	IV 5	IV 6	IV 7
Clássica	99,1	96,4	97,4	96,6	86,3	81,6	97,0	95,0	99,8	96,4	<b>0</b>	ND
Alternativa	128,2	99,7	107,7	117,8	89,5	86,3	103,5	86,4	102,8	88,5	<b>0</b>	100,2

<sup>a</sup> A atividade dos soros foi determinada em porcentagem da atividade de uma mistura de 26 soros normais, após um cálculo de correção para essa atividade (ver fórmulas 3.1 e 3.2). Códigos: ver heredograma (**Figura 4.1**). Valores em negrito são referentes ao probando.

**Tabela 4.10. Atividade hemolítica dependente da via clássica no soro do probando após reposição com C3 purificado, plasma normal e de outro deficiente de C3 (C3D), valores em porcentagem do normal**

<b>Atividade hemolítica<sup>a</sup> (porcentagem do normal<sup>b</sup>)</b>					
<i>Experimento</i>	<i>Tratamento</i>				
	LAS	LAS/SHN	LAS/C3D	LAS/C3	SHN
1º	0	79,2	0	34,7	45,2
2º	0	75,3	0	38,2	48,8
3º	0	92,91	0	53,7	53,7
4º	0	88,32	0	49,7	57,9
Média	0	83,9	0	44,1	51,4

<sup>a</sup> Foram medidos os diâmetros dos halos de lise em placas contendo hemácias sensibilizadas misturadas a agarose. <sup>b</sup> Mistura de 46 soros normais. **LAS:** probando; **LAS/SHN:** soro do probando misturado a soro normal (1:1); **LAS/C3D:** soro do probando/soro deficiente de C3 (1:1); **LAS/C3:** soro do probando contendo 1 mg/mL de C3 purificado.

#### 4.4. Geração de fatores quimiotáticos derivados da ativação do sistema complemento

A geração de fatores quimiotáticos derivados da ativação do sistema complemento foi avaliada pela medição da distância percorrida por leucócitos normais através de poros de uma matriz de nitrocelulose, que têm em média 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O tamanho dos poros é suficiente para que os neutrófilos sejam capazes de atravessá-los por migração ativa, pois é menor que o diâmetro destes, enquanto que dificulta, senão impede, a mobilidade de monócitos e linfócitos, que são células mais volumosas. Os últimos, além de tudo, apresentam uma mobilidade muito menor que os outros dois sobre uma matriz de nitrocelulose (WILKINSON *et al.* 1982).

A migração celular ocorre em resposta a um gradiente de fatores quimiotáticos solúveis que se estabelece através do filtro e em direção ao aumento da concentração desses fatores. A distância migrada pelas células depende, obviamente, da concentração desses agentes químicos no compartimento inferior da câmara de Boyden. Como o C5a, gerado pela clivagem de C5, é um fator quimiotático de grande importância para a resposta inflamatória, a capacidade de geração deste fator foi comparada em soro normal e no soro do probando.

Ambos os soros foram ativados com LPS, resultando num intenso aumento da atividade catalítica pelas C3 e C5 convertases da via alternativa e conseqüente geração e acúmulo de C5a. O soro do probando foi utilizado a 5% e 10%, enquanto o normal apenas a 5%. Como controles foram utilizados SSBH sem soro e soro normal (5%) inativado por aquecimento a 56°C, o que resulta na degradação dos componentes termolábeis do soro (inclusive C2, C5, C7, C8 e C9) (DIAS DA SILVA 1989), eliminando as convertases e a produção de C5a.

Os valores experimentais de migração dos leucócitos obtidos em resposta à solução salina (migração basal) foram semelhantes aos obtidos em resposta ao soro normal inativado, e ao soro do probando tanto a 5% como a 10%. Estes resultados diferiram significativamente dos valores obtidos para soro normal ativado, com  $P < 0,05$  (**Figura 4.5**). Isso indica que, devido à ausência de C3, não há geração de fatores quimiotáticos derivados

do sistema complemento no soro do probando, quando estimulado.

Além de atividade quimiotática, os leucócitos podem apresentar atividade quimiocinética em resposta a algumas substâncias químicas (WILKINSON *et al.* 1982), o que também envolve o seu reconhecimento por um receptor de membrana, mas que, ao contrário da primeira, não resulta numa migração direcionada em relação a um gradiente de concentração.

Um último controle de migração foi incluído para determinar se a migração observada seria uma consequência de quimioquinesa ao invés de quimiotaxia. Foi adicionado soro ativado à suspensão de leucócitos, no compartimento superior da câmara, na mesma concentração daquela presente no compartimento inferior (5%), ou numa concentração superior (10%). Dessa forma, anulou-se o gradiente quimiotático no filtro ou estabeleceu-se um gradiente negativo. Os resultados desses ensaios revelaram uma migração semelhante à basal, atestando portanto, a necessidade de geração de um gradiente de concentração através do filtro para que haja uma migração efetiva dos leucócitos.

#### **4.5. Geração de opsoninas pela ativação do sistema complemento**

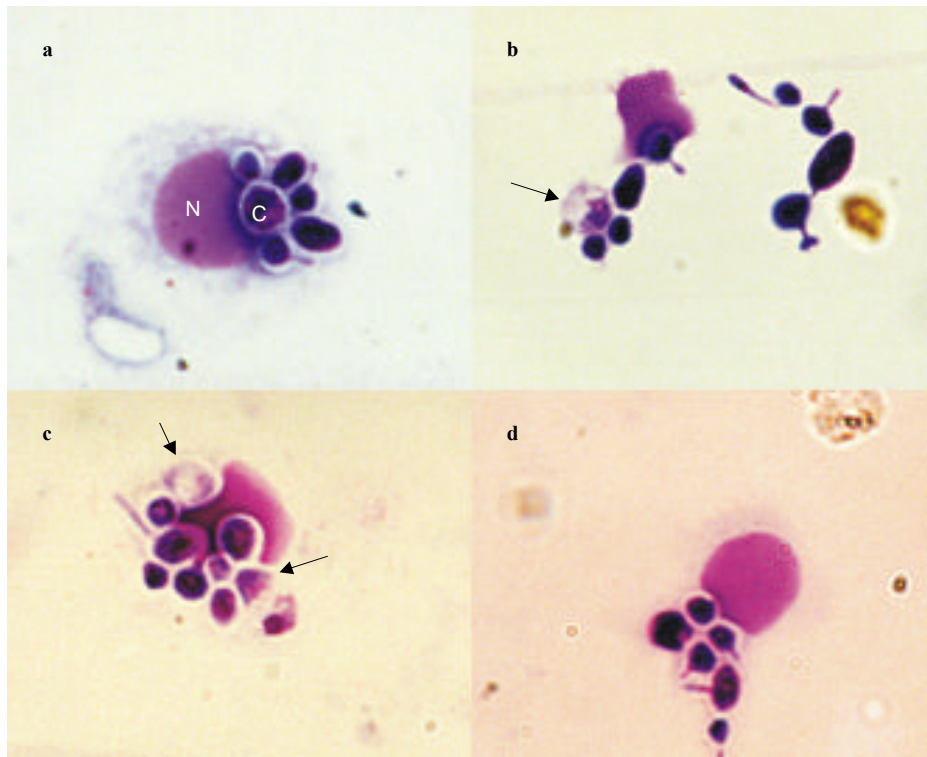
A geração de opsoninas pelo sistema complemento foi estudada pela avaliação da fagocitose e morte de *Candida albicans* por fagócitos humanos após incubação com soro (normal e do probando). Como controles basais foram usados soro inativado e SSBH sem soro.

Alguns componentes presentes na superfície desses fungos, como polissacarídeos, são ativadores potentes da via alternativa e, possivelmente, também da via das lectinas, como resíduos de manose e N-acetil glucosamina. Essa ativação leva a uma grande deposição de fragmentos derivados de C3 (C3b, iC3b) ou C4 (C4b) na superfície dos fungos. Sua fagocitose, que ocorre naturalmente, na ausência de opsoninas, aumenta consideravelmente por meio dos receptores presentes em leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, que reconhecem esses fragmentos, principalmente CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18) (MORGAN 1990).

A quantidade de fungos vivos e mortos por fagócito foi visualizada após transferência destes para lâminas e coloração dos mesmos (**Figura 4.6**). É importante ressaltar que o método utilizado torna impossível afirmar com exatidão quando um fungo está contido no interior do fagócito ou simplesmente aderido externamente. O que é possível afirmar com segurança é se o fungo em questão está vivo ou morto, pois este último adquire uma coloração azulada e mais difusa do que o arroxeado denso do fungo vivo.

A porcentagem de fagócitos contendo *C. albicans* foi menor quando se utilizou soro do probando do que com soro normal, mais próxima do controle basal com SSBH (**Tabela 4.11**). Não foram observadas diferenças quanto à presença de fungos nos fagócitos entre os tratamentos de soro normal e soro normal inativado.

Foi obtida uma maior mortalidade de fungos nos fagócitos quando estes foram tratados com soro normal do que com soro do probando (**Tabela 4.12**). Nestes experimentos o padrão de morte de fungos se repete, apesar de existir uma variação nos números absolutos entre os dois experimentos. Ao realizar o tratamento estatístico dos dados, verificou-se que no primeiro experimento a porcentagem de morte apresentada quando os fungos foram opsonizados com soro do probando foi semelhante ao de fungos tratados com SSBH, enquanto que no segundo essa porcentagem foi semelhante ao de soro inativado. Nos dois casos a porcentagem de morte obtida com soro ativado foi significativamente diferente daquelas obtidas com os outros tratamentos, apesar do número de fungos ser semelhante entre os tratamentos de soro normal e inativado.



**Figura 4.4. Ingestão e morte de *Candida albicans* opsonizadas por soro normal e do probando, por fagócitos humanos normais**

Os fungos foram tratados com solução salina balanceada de Hank (SSBH) e soro normal inativado por aquecimento a 56°C, como controles (a e b, respectivamente) ou opsonizadas com soro normal (mistura de 46 SHN) e soro do probando (c e d, respectivamente). Todos os soros foram diluídos a 40% em SSBH. **N**: núcleo do fagócito; **C**: *C. albicans*. As setas indicam *C. albicans* mortas.

**Tabela 4.11. Porcentagem de fagócitos normais contendo *C. albicans* tratadas com soro normal e do probando, como fonte de opsoninas**

<i>Experimento</i>	<b>Porcentagem de células com <i>C. albicans</i></b>			
	<i>Tratamento</i>			
	SSBH	SHNi	SHN	LAS
1 <sup>o</sup>	56,5	65	67,5	52,4
2 <sup>o</sup>	65	78	78,5	66

**SSBH:** Solução salina balanceada de Hank; **SHN:** Mistura de 46 soros humanos normais; **SHNi:** soro normal inativado por aquecimento; **LAS:** probando.

**Tabela 4.12. Porcentagem de morte de *C. albicans* tratadas com soro normal e do probando, em fagócitos normais**

<i>Experimento</i>	<b>Porcentagem de morte de <i>C. albicans</i></b>			
	<i>Tratamento</i>			
	SSBH	SHNi	SHN	LAS
1 <sup>o</sup>	38,4	57,5	60,9	50,0
2 <sup>o</sup>	37,3	49,3	59,5	49,9

**SSBH:** Solução salina balanceada de Hank; **SHN:** Mistura de 46 soros humanos normais; **SHNi:** soro normal inativado por aquecimento; **LAS:** probando. Os resultados para o probando são estatisticamente semelhantes aos do meio sem soro no primeiro experimento e ao soro inativado no segundo. Os valores de SHN são estatisticamente diferentes dos outros tratamentos, nos dois experimentos.

#### 4.6. Alotipagem genética de C3

A alotipagem de C3 envolveu amplificação do DNA genômico dos indivíduos por PCR baseando-se em diferenças de seqüências nucleotídicas entre os alelos codificantes para as proteínas S e F. A diferença na composição das duas formas de C3 é perceptível pelos seus comportamentos migratórios em gel de agarose. S é o nome atribuído à forma mais lenta da proteína ("slow") e F à mais rápida ("fast").

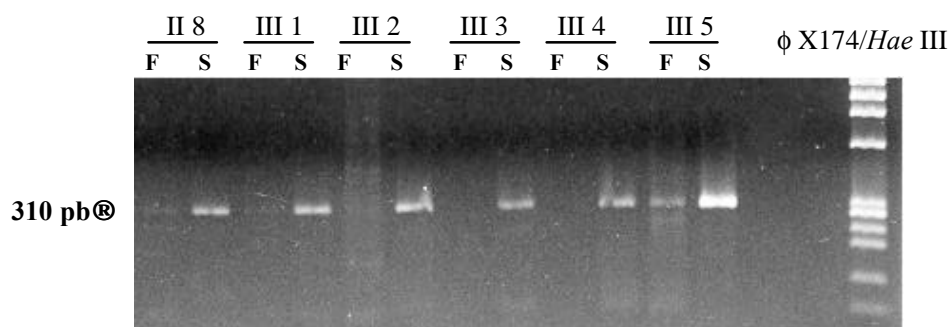
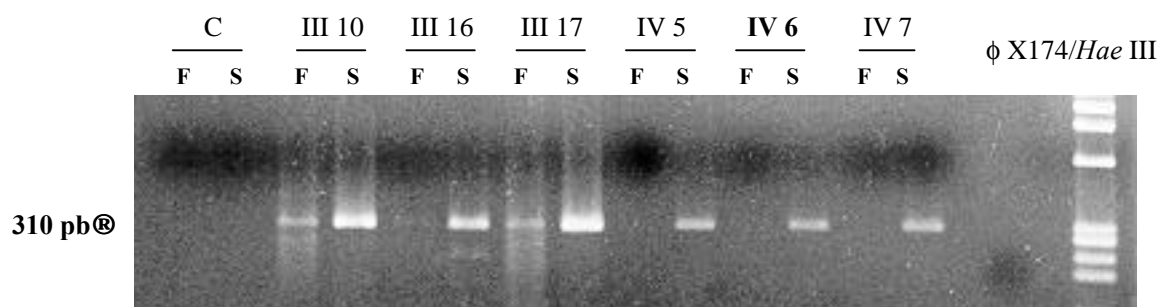
A reação de amplificação alelo-específica baseia-se na observação (empírica) de que dois oligonucleotídeos iniciadores, que diferem em apenas uma base nitrogenada, apresentam grande especificidade de ligação à seqüência correspondente no DNA, quando é empregada uma alta temperatura de anelamento (NEWTON *et al.* 1989). Para assegurar a eficiência da reação os oligos (tanto os específicos quanto o comum) têm uma extensão de 30 bases.

Os resultados obtidos mostraram que no probando e na maioria dos indivíduos ocorreu apenas a amplificação do alelo S, enquanto que nos indivíduos **III 2**, **III 10**, **III 16** e **III 17** ocorreu amplificação também do alelo F (**Figura 4.6**). Pela comparação das intensidades dos produtos no probando, seu irmão (**IV 5**) e seu primo (**IV 7**) concluiu-se que ele (probando) possui dois alelos S e que não haveria defeitos grosseiros na região amplificada, de aproximadamente 300 pares de bases (pb).

Nos indivíduos SF citados acima, observou-se um produto amplificado de intensidade menor do alelo S em relação aos SS e do alelo F em relação ao S, o que parece indicar que a amplificação deste alelo é menos eficiente. Para imbuir esses dados de mais credibilidade, o DNA dos quatro indivíduos SF foi amplificado em reações de PCR nas quais utilizou-se uma temperatura de anelamento de 74°C. Com isso aumentou-se a estringência da reação e a amplificação, conseqüentemente, tornou-se muito mais específica.

Os resultados obtidos, mais uma vez, mostraram amplificação dos dois alelos em todos os indivíduos, embora com menor intensidade (resultados não mostrados).





**Figura 4.5. Determinação dos alelos de C3 presentes no probando e familiares, por PCR**

Gel de agarose a 2,5% mostrando os produtos das reações de PCR. **F:** C3 “fast”; **S:** C3 “slow”, **C:** controle sem DNA.  $\phi$ X174/*Hae* III: DNA de bacteriófago X174 digerido com *Hae* III, marcador de tamanho. Os indivíduos III 5, III 10, III 16 e III 17 amplificaram os alelos S e F, os demais somente o alelo S. **IV 6:** probando.

#### 4.7. Síntese e secreção de C3 por fibroblastos estimulados

O estudo da síntese, processamento e secreção de C3 foi efetuado estimulando-se fibroblastos normais, do probando e de sua mãe com LPS. Esse composto, presente na parede celular de bactérias gram-negativas, induz um aumento da síntese de C3 e fB, entre outras proteínas (STRUNK *et al.* 1985). A proteína sintetizada e marcada metabolicamente com met-S<sup>35</sup> e cis-S<sup>35</sup> foi precipitada do sobrandante das culturas de fibroblastos, empregando-se soro de coelho anti-C3 humano. Como controle de síntese e secreção empregamos soro anti-fB humano.

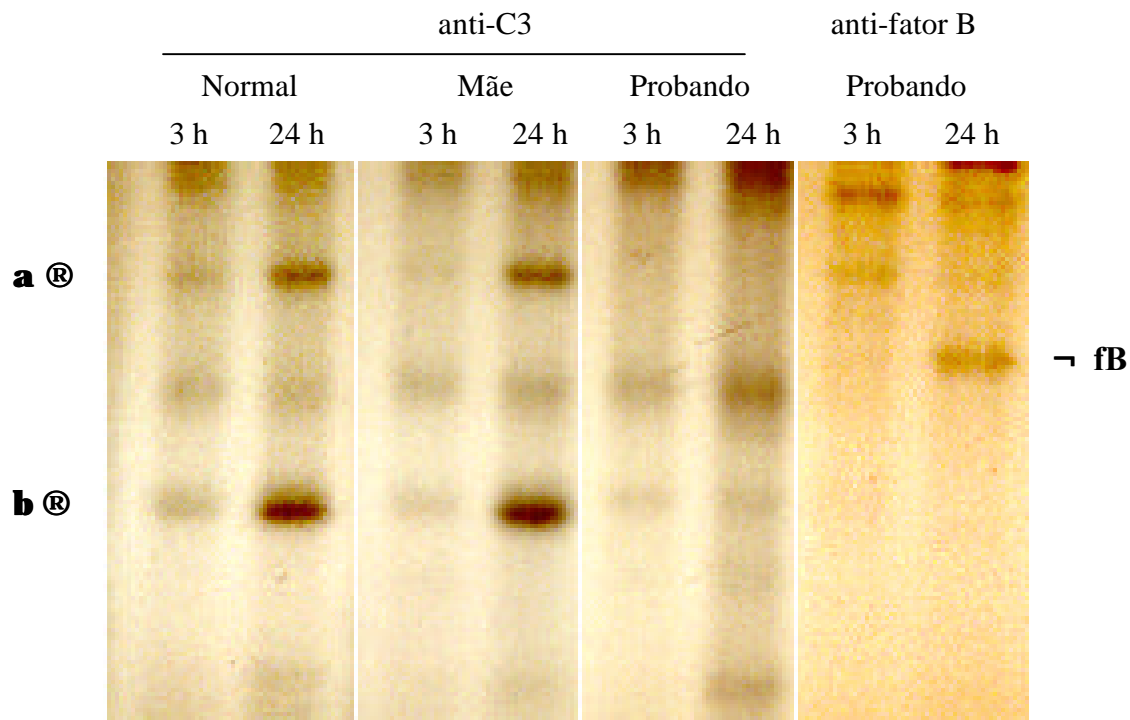
Após corrida em gel de poliacrilamida com SDS na presença de agente redutor, foi feita uma autorradiografia, o que permitiu identificar as bandas relativas às cadeias  $\alpha$  (70 kDa) e  $\beta$  (110 kDa) de C3 e a cadeia única de fB (93 kDa). Foram analisados sobrenadantes de dois momentos diferentes das culturas, 3 e 24 h após o pulso de precursores radioativos.

Fragmentos derivados das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de C3 do probando não puderam ser observadas no gel, enquanto os produtos de um indivíduo normal para C3 e da mãe do probando puderam ser claramente identificados (**Figura 4.7**).

Na autorradiografia pode-se observar uma banda de tamanho superior a 75 kDa, presente no probando, que pode ser confundida com a cadeia beta de C3. Trata-se, porém, de um produto inespecífico da precipitação com anti-C3, presente nos produtos analisados após precipitação com anti-fB.

A banda relativa ao pró-C3, de 185 kDa, infelizmente não pode ser observada em nenhum indivíduo, o que, sem dúvida, nos informaria muito melhor sobre a deficiência do probando. Os dados sobre síntese, secreção e tamanho relativo do fator B (93 kDa) produzido pelas células do probando não estão normais.

Os resultados observados revelam uma incapacidade de síntese da cadeia alfa, que talvez seja degradada intracelularmente sem que ocorra secreção. A cadeia beta talvez sofra uma maior susceptibilidade à degradação, justamente pela ausência da cadeia alfa, visto que não há aumento na sua síntese após 24 h.



**Figura 4.7. Autorradiografia de gel de poliacrilamida com SDS de sobrenadante de culturas de fibroblastos precipitados com anti-C3 e anti-fB**

As culturas de fibroblastos de indivíduo normal, do probando e de sua mãe foram marcadas com 250  $\mu\text{Ci}$  de met- $\text{S}^{35}$  e cis- $\text{S}^{35}$  por 2 h. Os sobrenadantes foram coletados após 3 e 24 h e imunoprecipitados com soro policlonal mono específico anti-C3 e anti-fB humano. As posições relativas às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de C3 e cadeia única defator B são mostradas.

## IV. Discussão

As dosagens de proteínas do sistema complemento mostraram que o indivíduo possui entre 7 e 10 mil vezes menos C3 plasmático do que o normal, o que é praticamente zero para todos os efeitos, enquanto todas as outras proteínas analisadas estão presentes em concentrações normais. A mãe do probando possui entre um terço e metade da quantidade normal de C3. Quanto ao pai, não há informações, visto que ele faleceu anteriormente ao início deste projeto. Dosagens de fator H e fator I em vários indivíduos da família, no entanto, descartaram a possibilidade de um desbalanço no controle da ativação do sistema. Isso caracteriza uma deficiência primária completa de C3 no indivíduo analisado.

Em todos os casos de deficiências de C3 observam-se infecções por organismos gram-negativos, que freqüentemente se repetem várias vezes durante a vida do indivíduo. A primeira manifestação infecciosa nos deficientes aparece sempre no decorrer do primeiro ano de vida, em todos os casos descritos na literatura (revisado em BOTTO e WALPORT 1993). Ao contrário, o probando não teve infecções ou outros problemas relacionados com a deficiência durante os dois primeiros anos de vida, quando teve adenite severa e sinusite maxilar.

Como é comum nos casos de deficiência de C3 descritas (revisado em SINGER *et al.* 1994 e BOTTO *et al.* 1995), a criança estudada tem apresentado até o momento, várias infecções bacterianas recorrentes. diferença dos casos semelhantes descritos, o probando não teve infecções ou outros problemas relacionados com a deficiência durante os dois primeiros anos de vida.

O fato de que uma das infecções sofrida pelo probando só foi contida após administração de plasma normal é uma prova da grande suscetibilidade dos deficientes de C3 a certos microorganismos. O tratamento com infusões de plasma normal ou componentes purificados foi estudada em deficientes de fator I, mesmo na ausência de infecções (ALPER *et al.* 1970; ZIEGLER *et al.* 1975; BARRETT e BOYLE 1984), demonstrando restaurar completamente as funções imunológicas dos deficientes, por um período de aproximadamente 15 dias. A administração constante de plasma humano

parcialmente purificado, como medida preventiva nos casos de deficiência de C3 e fII, assim como é utilizada em outros casos, já foi sugerida. Porém, o risco de transmissão de hepatite ou outras doenças e a possibilidade de sensibilização do sistema imune, com produção de anticorpos contra as proteínas exógenas, torna muito arriscado tal tratamento, preferindo-se empregá-lo somente em casos extremos.

Embora extremamente preocupantes durante a infância as infecções por bactérias encapsuladas vai, à medida que essa criança deficiente cresce, perdendo importância clínica e o acompanhamento médico torna-se cada vez menos necessário. Um dos aspectos determinantes para esse fato é a maturidade do sistema imune adaptativo. A presença de anticorpos específicos para a cápsula de polissacarídeos, cujo título é muito baixo durante a infância (COOPER e NEMEROW 1989), permite um rápido reconhecimento das bactérias invasoras e o estabelecimento de uma resposta eficiente antes que a infecção tome grandes proporções (KOVARIK e SIEGRIST 1998). Tratamentos com infusões periódicas de plasma purificado ou esforços para eliminação do problema, como terapia gênica, neste caso, certamente não justificam os riscos envolvidos.

O probando teve vasculite, uma doença caracterizada pela deposição de ICs na pele, atraindo células inflamatórias, que acabam por provocar lesões no tecido. Como mostrado anteriormente (**Tabela 1.1** e **Introdução**), as doenças por deposição de ICs são um fator secundário nas deficiências de C3. Nas deficiências de C1q, C1r, C1s, C2 e C4 nas quais a ocorrência destas doenças é muito mais freqüente (DAVIES *et al.* 1994), nota-se, em grande parte dos casos, a presença de altos títulos de auto-anticorpos. No soro do probando, o teste para detecção de fator anti-núcleo foi negativo. A existência de auto-anticorpos, contudo, não está excluída e depende de futuras verificações, porém uma fonte plausível para os ICs responsáveis pelo episódio de vasculite seria uma síntese de anticorpos contra antígenos externos, induzida pela presença de uma infecção viral, varicela, que se estabeleceu e foi debelada antes do aparecimento da vasculite. Além de possibilitar o reconhecimento de antígenos externos para serem reconhecidos pelo sistema imune, esta infecção pode resultar numa maior lise celular, com exposição de auto-antígenos estranhos ao sistema imune, em grande quantidade, como DNA, ribonucleoproteínas e histonas, entre outros.

Defeitos no estabelecimento de uma resposta imune normal têm sido observados em animais depletados de C3 pelo uso de CVF (PEPYS 1974) e em animais naturalmente deficientes (revisado em SINGER *et al.* 1994a), assim como em camundongos nocauteados para os genes de C3 e C4 (WESSELS *et al.* 1995). Em todos esses modelos animais foi observada uma falha na troca de cadeias pesadas de imunoglobulinas (de IgM para IgG), após um segundo contato com Ags T-dependentes (desafio), assim como uma diminuição dos títulos totais das Igs. Estudos equivalentes já foram realizados em humanos, demonstrando títulos totais de IgM, após a primeira imunização com  $\phi$ X174 e de IgG, após o desafio, dentro dos limites normais, porém, títulos reduzidos de IgG específica (OCHS *et al.* 1986).

O probando mostrou possuir níveis indetectáveis de IgG4 (abaixo da resolução do método), um fato que pode estar, talvez, relacionado com um falha na troca de classe das Igs. Concentrações não detectáveis deste subtipo foi demonstrada, também, em dois dos três deficientes totais de C3 estudados em uma família holandesa, o terceiro deficiente total apresentou 0,24 g/L de IgG4, enquanto a mãe dos deficientes (heterozigota) apresentou 0,2 g/L e o pai (*idem*), 0,25 g/L, sendo que o intervalo normal para o teste foi de  $0,6 \pm 0,4$  g/L (ROORD *et al.* 1983). Se ocorrer uma inabilidade dos linfócitos B de efetuar a troca de classes para esse subtipo, isso não afeta a produção dos outros, que mostram-se normais no probando, assim como a IgG total. Para comprovar esses resultados, novas determinações de anticorpos totais e de IgG4, em particular, devem ser feitas, não só no soro do probando, mas também no de sua mãe.

Um dos primeiros passos para se caracterizar esta deficiência de C3 aqui estudada, foi o de se quantificar as concentrações dos componentes do sistema complemento, por métodos imunoquímicos. No entanto, essa verificação, por si só, não é capaz de fornecer informações acerca da funcionalidade desses componentes, isoladamente, ou do sistema como um todo. Com esse objetivo foram realizados experimentos para avaliação das funções imunológicas dependentes do sistema complemento, como a lise provocada pela formação do complexo de ataque à membrana sobre células alvo, a capacidade de geração de fatores quimiotáticos e de opsoninas, após ativação das vias clássica e alternativa.

A lise osmótica de hemácias pela deposição do MAC reflete um aspecto importante

que ocorre *in vivo*, que é a capacidade do soro de lisar microorganismos patogênicos. Esse mecanismo é determinante para a eliminação de *Neisseria sp.* e infecções causadas por esse agente são muito comuns em indivíduos deficientes de componentes do MAC (revisado em LOKKI e COLTEN 1995). A deposição do complexo em células do próprio hospedeiro, presentes nas imediações do sítio inflamatório aumenta a produção e liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, entre outros, o que contribui para criar um ambiente não muito acolhedor para qualquer microorganismo patogênico, inclusive algumas bactérias não tão suscetíveis à lise osmótica direta. Esse aspecto é demonstrado pela frequência de infecções meningocócicas em deficientes dos componentes terminais (revisado em HAUPTMANN 1989 e MORGAN 1990).

Nos ensaios hemolíticos, após ativação do sistema complemento pelas vias clássica ou alternativa, o soro do probando provocou uma lise de hemácias semelhante à lise espontânea (na ausência de soro), o que significa, provavelmente, que esta função é, também, completamente ausente, *in vivo*. A complementação do soro do probando com C3 purificado resultou numa lise normal, mostrando que os outros componentes que tomam parte na indução desta lise são funcionalmente normais. Todos os outros indivíduos estudados revelaram capacidades hemolíticas normais, pelas duas vias. Em alguns casos os resultados levantaram dúvidas acerca da sensibilidade dos métodos (ao menos do modo como foram realizados), já que não mostraram diferenças relevantes entre as atividades hemolíticas de indivíduos com concentrações plasmáticas de C3 abaixo de 50% do normal e indivíduos normais.

Na literatura também é feita referência à insensibilidade dos métodos de determinação da atividade hemolítica, em casos nos quais não há um consumo exacerbado dos componentes do complemento, pela presença, por exemplo, de uma inflamação (MORGAN 1994). Tomados por outro ângulo esses resultados refletem o fato de que níveis reduzidos de C3 (entre 30% e 50%) são suficientes, funcionalmente, para o bom desempenho das funções imunológicas dependentes do sistema complemento, o que é nitidamente comprovado pelo fato de que os heterozigotos nada demonstram de anormal.

O reconhecimento de compostos de superfície dos patógenos, como carboidratos de superfície e LPS (e outros lipídeos presentes em paredes celulares de bactérias) é o

primeiro passo da resposta imune inata a estes microorganismos. A partir desse reconhecimento, uma série de mecanismos efetores podem ser desencadeados, como a atração de leucócitos ao foco inflamatório, a ativação de células efectoras, a liberação do conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos e a indução da síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos e outros tipos celulares. Sem o estabelecimento desse quadro inflamatório e concomitante aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e sinalização providenciada por citocinas (como IL-1, IL-6, TNF, IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ), não haveria o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos B e T, nem expansão clonal ou indução de memória. É necessário, portanto, que as moléculas efectoras da imunidade inata reconheçam o agente patogênico para que a imunidade adaptativa possa ser posta em prática e proteger o organismo contra uma eventual reinfecção (comentado em PARISH e O'NEILL 1997 e MEDZHITOV e JANEWAY 1998).

Por outro lado, o papel decisivo dos linfócitos B e T para a nossa sobrevivência pode ser observado em indivíduos com imunodeficiências combinadas severas (SCID), que não possuem linfócitos T maduros e, em alguns casos, nem LB. A consequência dessa deficiência é, na maioria dos casos, a morte ainda no primeiro ano de vida (FISCHER *et al.* 1997).

A importância da participação das proteínas solúveis do sistema complemento dentro do modelo apresentado acima é evidente. A susceptibilidade a infecções recorrentes, por parte de deficientes de componentes centrais do sistema complemento (como C3, C4 e fI) correlaciona-se com defeitos nas funções quimiotática e fagocitária e também com uma falha na montagem de uma resposta imune adaptativa normal.

Os ensaios quimiotáticos demonstraram claramente que capacidade do soro do probando de atrair neutrófilos está bastante afetada (os resultados obtidos assemelham-se ao controle basal sem soro ou soro inativado). Poderia-se supor que essa atividade migratória, *in vivo*, estaria também bastante afetada em virtude da incapacidade de geração de C5a em resposta a um estímulo ativador. A ausência de C5 tem sido associada com infecções bacterianas severas, por não ocorrer um eficiente influxo de leucócitos ao sítio inflamatório (SNYDERMAN *et al.* 1979). É possível que a susceptibilidade do probando a



infecções decorra, em parte, desta presumível ineficiência migratória.

A avaliação da fagocitose de *C. albicans* opsonizadas com soro do probando revelou atividades de ingestão e morte de fungos reduzidas em relação ao normal (fungos opsonizados com soro normal). Esses resultados são indicativos de uma menor geração de opsoninas pelo sistema complemento do probando, o que resulta provavelmente em uma menor capacidade de fagocitose por seus leucócitos, *in vivo*.

Uma associação entre o alelo que codifica para C3F com o C3NeF já foi sugerida a partir de estudos que encontraram uma maior frequência desse alelo em indivíduos com problemas renais (FINN e MATHIESON 1993). O possível mecanismo envolvido nessa associação não é conhecido. Talvez a proteína codificada por aquele alelo não seja tão eficiente na solubilização ou na inibição da precipitação de ICs, visto que esta é uma possível explicação para a ocorrência de grandes quantidades de auto-anticorpos em deficientes de componentes da via clássica.

Demonstrou-se que o probando possui dois alelos S, assim como a maioria dos indivíduos. Sua mãe é FS e o pai possuía pelo menos um alelo S. Dos outros indivíduos FS, **III 2** e **III 10** possuem níveis de C3 inferiores ao normal enquanto **III 17** tem níveis normais. Os dois primeiros seriam, portanto, heterozigotos para a deficiência de C3. O filho dos indivíduos **III 16** (tia materna do probando) e **III 17** é SS e normal, enquanto que sua mãe é SS e heterozigota para a deficiência.

Com base nessas informações pode-se deduzir que o defeito que resulta na ausência total de C3 sérico não está associada ao alelo F, portanto, se tal defeito estiver realmente contido no gene de C3, ele ocorreria num dos alelos S segregantes na família.

Para verificar se células do probando seriam capazes de produzir C3, mesmo concentrações baixas, culturas de fibroblastos foram submetidas a um pulso de precursores radioativos e, então, mantidas em estufa com excesso de precursores não radioativos. Os sobrenadantes foram coletados após 3 e 24 h desse pulso para que se pudesse observar a secreção imediata das proteínas marcadas e o acúmulo dessas no sobrenadante das culturas ao longo do tempo.

A imunoprecipitação com a-fB produzido e secretado pelos fibroblastos do

probando revelou uma cadeia de 96 kDa, o que confere com o tamanho da forma sérica dessa proteína. Esse fato sugere que não existem defeitos grosseiros em mecanismos celulares relacionados com as vias de secreção e síntese protéicas nas células do probando.

Com anti-C3, ao contrário, não foram observadas bandas na posição equivalente ao das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do sobrenadante de fibroblastos normais e do C3 purificado, utilizado como marcador no mesmo gel. Da mesma forma não foram encontradas, nas autorradiografias, outras bandas que pudessem representar fragmentos das cadeias de C3, ou seja, bandas não presentes nos sobrenadantes de fibroblastos normais ou de sua mãe.

Em outro estudo de deficiência de C3, descrito na literatura (KATZ *et al.* 1994), ao se observar o RNAm e o pró-C3 sintetizados por fibroblastos, num indivíduo com aproximadamente 7  $\mu\text{g/mL}$  de C3 plasmático (determinado por RIA), verificou-se que estes eram normais em tamanho e intensidade. Já as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína secretada apareciam em menor intensidade, revelando um defeito na secreção (ver **Introdução**). Outro indivíduo estudado, este com 4  $\mu\text{g/mL}$  de C3 no plasma, apresentou uma quantidade de RNAm e de C3, tanto a pró-proteína como as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , próximos de 1% do normal, em ensaios com fibroblastos estimulados. Os tamanhos relativos às cadeias protéicas e à mensagem foram normais (SINGER *et al.* 1996).

Nos dois casos descritos acima existem defeitos que dificultam a secreção de C3 pelas células dos indivíduos. Em um deles o defeito no gene de C3 foi descoberto, tratando-se de uma mutação pontual responsável pela substituição de um único aminoácido na proteína final. Suspeita-se que o modo pelo qual isso poderia prejudicar a secreção seria pela perda de um sinal importante para tal, que deva ser reconhecido pelo maquinário celular, como um padrão específico de glicosilação.

A quantidade de C3 encontrada no soro do probando assemelha-se com a de um indivíduo, cujo DNA apresenta uma deleção de 800 pb no gene de C3, excluindo os exons 22 e 23 e causando uma mudança do quadro de leitura do +RNA e parada precoce da tradução. A proteína sintetizada a partir desse gene tem, obviamente, uma vida média muito curta no plasma, sendo prontamente degradada (BOTTO *et al.* 1992). Tanto neste indivíduo como no probando foram detectados 0,15  $\mu\text{g/mL}$  de C3 plasmático, por RIA, utilizando soro policlonal. Talvez uma pequena quantidade da proteína poderia estar

presente no soro desse indivíduo, na forma de pequenos fragmentos contendo alguns epítomos antigênicos, mas, no nosso caso, de migração muito rápida (e concentração muito baixa) para serem detectáveis nos géis de poliacrilamida.

Parece-nos que o defeito gênico do probando deva, provavelmente pela mudança do quadro de leitura, levar ao reconhecimento de um códon de parada, à semelhança do que foi visto no deficiente discutido acima, tendo como consequência a falha na síntese de grande parte da molécula de C3, visto que nenhum traço desta foi observado por SDS-PAGE. Infelizmente não foi possível a visualização do pró-C3 do probando (ou de nenhum outro indivíduo), o que revelaria mais informações acerca da sua síntese e tamanho.

No sobrenadante de 3 h dos fibroblastos da mãe do probando é possível notar bandas relativas às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de C3 em tamanho idêntico às presentes no sobrenadante de fibroblastos normais, porém com uma intensidade menor. Contudo, no sobrenadante de 24 h a intensidade das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  da mãe foi maior do que as do normal. Considerando-se que tanto após 3 como 24 h não foi notada diferença significativa entre o aspecto morfológico das células ou a densidade das culturas dos três indivíduos e que os volumes dos sobrenadantes aplicados no gel foram padronizados pelos níveis de emissão  $\beta$  do  $S^{35}$  incorporado, podem-se sugerir algumas hipóteses para explicar esse acontecimento: **1)** A síntese e/ou secreção bruta(s) de C3, apesar de menor que o normal após 3 h, seria(m) maior(es) após 24 h. **2)** O C3 sintetizado em menor quantidade pelas células da mãe seria mais resistente à degradação do que o normal, o que resultaria num aumento relativo daquele em relação a este, num período de tempo mais prolongado. **3)** Existiria um atraso na síntese e/ou secreção de C3, resultando num acúmulo quando o C3 produzido por células normais já estaria em processo de degradação por proteases.

Ressaltando o fato de que foram observados 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de C3 no sobrenadante de culturas de leucócitos sanguíneos na mãe em relação a 0,6  $\mu\text{g/mL}$  produzidos por leucócitos de um indivíduo normal, conjuntamente com os valores já mencionados de C3 sérico, parece bastante improvável que a primeira hipótese seja correta. A não ser tomando a suposição que os tipos celulares responsáveis pela síntese da maior parte de C3 sérico (hepatócitos) se comportem de maneira diferente ao observado para fibroblastos, quanto aos mecanismos de síntese. Pelos mesmos motivos acima a segunda hipótese também não

parece plausível, pois um C3 mais resistente à degradação resultaria em concentrações maiores do que as encontradas no soro da mãe, mascaradas pela maior permanência dessa proteína na circulação.

Esses resultados indicam uma diferença nos aspectos revelados pela mãe e pelo próprio probando, pois se existe um alelo nulo de C3 presente em heterozigose na mãe e homozigose no probando, o alelo saudável da mãe demonstraria um funcionamento anormal quanto à síntese de C3, ou a regulação dessa síntese ocorreria de forma diferente em suas células. Há ainda a possibilidade de segregação de um gene relacionado com sinais de secreção na molécula de C3.

## Conclusões

- O probando possui deficiência primária completa de C3. A alotipagem gênica não foi informativa sobre o padrão de herança da deficiência na família em estudo.
- A incapacidade de formar C3 convertases e C5 convertases, tanto pela via clássica como alternativa, acrescida ao comprometimento da produção de opsoninas e de fatores quimiotáticos dependentes do sistema complemento, justificam a maior susceptibilidade do probando a infecções recidivantes.
- Os resultados mostram que esta deficiência é consequência direta da incapacidade de sintetizar e expressar tanto a cadeia  $\alpha$  como a cadeia  $\beta$  da molécula de C3 por células do probando.

## Referências bibliográficas

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. e POBER, J. S. 1997. *Cellular and Molecular Immunology*, 3<sup>a</sup> ed. W. B. Saunders, Philadelphia. 457 p.
- ABRAMSON, N., ALPER, C. A., LACHMANN, P. J., ROSEN, F. S. e JANDL, J. H. 1971. Deficiency of C3 inactivator in man. *J. Immunol.* **107**: 19-27.
- AGOSTONI, A. 1989. Inherited C1 inhibitor deficiency. *Complement Inflamm.* **6**: 112-8.
- ALPER, C. A. e PROPP, R. P. 1968. Genetic polymorphism of the third Component of human complement C'3. *J. Clin. Invest.* **47**: 2181-91.
- ALPER, C. A., JOHNSON, A. M., BIRTCH, A. G. e MOORE, F. D. 1969. Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* **163**: 286-9.
- ALPER, C. A., ABRAMSON, N., JOHNSTON JR., R. B., JANDL, J. H. e ROSEN, F. S. 1970. Studies *in vivo* and *in vitro* of an abnormality in the metabolism of C3 in a patient with increased susceptibility to infection. *J. Clin. Invest.* **49**: 1975-85.
- ALPER, C. A., COLTEN, H. R., ROSEN, F. S., RABSON, A. R. e MACNAB, G. M. 1972. Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections. *Lancet* **ii**:1179-81.
- ANDREWS, P. A., FINN, J. A., MATHIESON, P. W. e SACKS, S. 1995. Molecular analysis of C3 allotypes related to transplant outcome in human renal allografts. *Transplantation* **60**: 1342-46
- AZEN, E. A. e SMITHIES, O. 1968. Genetic polymorphism of C'3 ( $\beta_{1c}$ -globulin) in human serum. *Science* **162**: 905-6.
- BALLOW, M., SHIRA, J. E., HARDEN, L., YANG, S. Y. e DAY, N. K. 1975. Complete absence of the third component of complement in man. *J. Clin. Invest.* **56**: 703-10.
- BARNUM, S. R., AMIGUET, P., AMIGUET-BARRAS, F. FEY, G. H. e TACK, B. F. 1989. Complete intron/exon organization of DNA encoding the  $\alpha$  chain in human C3. *J. Biol. Chem.* **264**: 8471-4.

- BARRETT, D. J. e BOYLE, M. D. P. 1984. Restoration of complement function *in vivo* by plasma infusion in factor I C3b inactivator deficiency. *J. Pediatr.* **104**: 76-81.
- BERGER, M., BALLOW, J. E., WILSON, C. B. e FRANK, M. M. 1983. Circulating immune complexes and glomerulonephritis in a patient with congenital absence of the third component of complement. *N. Engl. J. Med.* **308**: 1009-12.
- BHAKDI, S. 1993. The terminal complement sequence in natural immunity. Em: SIM, E. ed. *Humoral Factors*. Oxford University Press, Oxford. Cap. 9, p. 233-55.
- BIRD, P. e LACHMANN, P. J. 1988. The regulation of IgG subclass production in man: low serum IgG4 in inherited deficiencies of the classical pathway of C3 activation. *Eur. J. Immunol.* **18**: 1217-22.
- BORZY, M. S., GERWURZ, A., WOLFF, L., HOUGHTON, D. e LOVRIEN, E. 1988. Inherited C3 deficiency with recurrent infections and glomerulonephritis. *Am. J. Dis. Child.* **142**: 79-83.
- BOTTGER, E. C., METZGER, S., BITTER-SUERMAN, D., STEVENSON, G., KLEINDIEST, S. e BURGER, R. 1986. Impaired humoral immune response in complement C3-deficient guinea pigs: absence of secondary antibody response. *Eur. J. Immunol.* **16**: 1231-35.
- BOTTO, M., FONG, K., SO, A., KOCH, C. e WALPORT, M. 1990a. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J. Exp. Med.* **172**: 1011-7.
- BOTTO, M., FONG, K. Y., SO, A. K., RUDGE, A. e WALPORT, M. J. 1990b. Molecular basis of hereditary C3 deficiency. *J. Clin. Invest.* **86**: 1158-63.
- BOTTO, M., FONG, K. Y., SO A. K., BARLOW, R., ROUTIER, R., MORLEY, B. J. *et al.* 1992. Homozygous hereditary C3 deficiency due to a partial gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4957-61.
- BOTTO, M. e WALPORT, M. J. 1993. Hereditary deficiency of C3 in animals and humans. *Intern. Rev. Immunol.* **10**: 37-50.
- BOYDEN, S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **115**: 453-66.

- BRADE, V., HALL, R. E. e COLTEN, H. R. 1977. Biosynthesis of pro-C3, a precursor of the third component of complement. *J. Exp. Med.* **146**: 759-65.
- BURGER, R., GORDON, J., STEVENSON, G., RAMADORI, G., ZANKER, B., HADDING, U. *et al.* 1986. An inherited deficiency of the third component of complement, C3, in guinea pigs. *Eur. J. Immunol.* **16**: 7-11.
- CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. e GRUMACH, A. S. coords. 1992. *Alergia e Imunologia em Pediatria*. Sarvier, São Paulo. 261 p.
- CARPENTER, C. C. 1985. Other bacterial infections. Em: WINGAARDEN, J. B. e SMITH, L. H. eds. *Cecil Textbook of Medicine*, 17<sup>a</sup> ed. Saunders, Philadelphia. p. 1592-5.
- CARROLL, M. C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 545-68.
- CARVALHO, W. F. 1994. *Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia*. Cult Médica, Belo Horizonte.
- COLTEN, H. R. e ROSEN, F. S. 1992. Complement deficiencies. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 809-34.
- COOPER, N. R. e NEMEROW, G. R. 1989. Complement and infectious agents: a tale of disguise and deception. *Complement Inflamm.* **6**: 249-58.
- CROIX, D., AHEARN, J., ROSENGARD, A., HAN, S., KELSOE, G., MA, M. *et al.* 1996. Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *J. Exp. Med.* **183**: 1857-64.
- DAHA, M. R., AUSTEN, K. F. e FEARON, D. J. 1978. Heterogeneity, polypeptide chain composition and antigenic reactivity of C3 nephritic factor. *J. Immunol.* **120**: 1389-94.
- DAVIES, A. K., SCHIFFERLI, J. A. e WALLPORT, M. J. 1994. Complement deficiencies and immune complex disease. *Springer Semin. Immunopathol.* **15**: 397-416.



- DAVIS, A. E., DAVIS, J. S., RABSON, A. R., OSOFSKY, S. G., COLTEN, H. R., ROSEN, F. S. *et al.* 1977. Homozygous C3 deficiency: Detection of C3 by radioimmunoassay. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **8**: 543-50.
- DEBRUJIN, M. H. L. e FEY, G. H. 1985. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 708-12.
- DEMPSEY, P. W., ALLISON, M. E., AKKARAJU, S., GOODNOW, C. C. e FEARON, D. T. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: Bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**: 348-50.
- DENSEN, P., WEILER, J., ACKERMANN, L., BARSON, B., ZHU, Z. -B. e VOLANAKIS, J. 1996. Functional and antigenic analysis of human factor B deficiency. *Mol. Immunol.* **33**: 68.
- DIAS DA SILVA, W. 1989. Complemento. Em: BIER, O. G., MOTA, I. e DIAS DA SILVA, W. *Imunologia Básica e Aplicada*, 4<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Cap. 7, p. 134-63.
- DIERICH, M. P. 1988. The receptors. Em: ROTHER, K. e TILL, G. O. eds. *The Complement System*. Springer-Verlag, Berlin. Cap. 1, p. 262-9.
- DOBÓ, J., GÁL, P., SZILÁGYI, K., CSEH, S., LÖRINCZ, Z., SCHUMAKER, V. N. *et al.* 1999. One active subunit is sufficient for the activity of the complement C1 complex: stabilization of C1r in the zymogen form by point mutations. *J. Immunol.* **162**: 1108-12.
- DODDS, A. W., SIM, R. B., PORTER, R. P. e KERR, M. A. 1978. Activation of the first component of human complement C1 by antibody-antigen aggregates. *Biochem. J.* **175**: 383-90.
- EGGLETON, P. e REID, K. B. M. 1999. Lung surfactant proteins involved in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 28-33.
- EINSTEIN, L. P., HANSEN, P. J., BALLOW, M., DAVIS, A. E., ALPER, C. A. *et al.* 1977. Biosynthesis of the third component of complement C3 in vitro by monocytes from both normal and homozygous C3-deficient humans. *J. Clin. Invest.* **60**: 963-9.

- EMBER, J. A. e HUGLI, T. E. 1997. Complement factors and their receptors. *Immunopharmacol.* **38**: 3-15.
- FARRIES, T. C. e ATKINSON, J. P. 1991. Evolution of the complement system. *Immunol. Today* **12**: 295-300.
- FEARON, D. T. e CARTER, R. H. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 127-49.
- FERREIRA DE PAULA, P., FLORIDO, M. P. C., ROXO JR, P., FERRIANI, V. P. L. e ISAAC, L. 1999. Concentration of complement regulatory proteins factors H and I in Brazilian healthy children and adults. Submetido a *Acta Paediatr.*
- FERRIANI, V. P. L., BARBOSA, J. E. e CARVALHO, I. F. 1999. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr.* **88**: 1062-6.
- FINN, J. E. e MATHIESON, 1992. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with nephritic factor. *Clin. Exp.Immunol.* **91**: 410-4.
- FISCHER, A., CAVAZZANA-CALVO, M., DE SAINT BASILE, G., DEVILLARTAY, J. P., DI SANTO, J. P., HIVROZ, C. *et al.* 1997. Naturally occurring primary deficiencies of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 93-124.
- FISCHER, M., MA, M., GOERG, S., ZHOU, X., XIA, J., FINCO, O. *et al.* 1996. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J. Immunol.* **157**: 549-56.
- FONG, K. Y., BOTTO, M., WALPORT, M. J. e SO, A. K. 1990. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics* **7**: 579-86.
- FRIES, L. F., O'SHEA, J. J. e FRANK, M. M. 1986. Inherited deficiencies of complement and complement-related proteins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **40**: 37-49.

- FUJIMURA, M. D. 1990. *Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas*, Tese (doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 159 p.
- GHEBREHIWET, B. e MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1979. C3e: An acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. *J. Immunol.* **123**: 616-21.
- GRACE H. J., BRERETON-STILES, G. G., VOS, G. H. e SCHOLAND, M. 1976. A family with partial and total deficiency of complement C3. *S. Afr. Med. J.* **50**: 139-40.
- GROSS, P. S., AL-SHARIF, W. Z., CLOW, L. A. e SMITH, L. C. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 429-42.
- GRUMACH, A. S., VILELA, M. M., GONZALEZ, C. H., STAROBINAS, N., PEREIRA, A. B., DIAS-DA-SILVA, W. *et al.* 1988. Inherited C3 deficiency of the complement system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**: 247-57.
- HAENEY, M. R., THOMPSON, R. A., FAULKNER, J., MACKINTOSH, P. e BALL, A. P. 1980. Recurrent bacterial meningitis in patients with genetic defects of terminal complement components. *Clin. Exp. Immunol.* **40**: 16-24.
- HALMA, C., DAHA, M. R., CAMPS, J. A. J., EVERS-SCHOUTEN, E. K., PAUWELS, E. K. J. e VAN ES, L. A. 1992. Deficiency of complement component C3 is associated with accelerated removal of soluble <sup>125</sup>I-labelled aggregates of IgG from the circulation. *Clin. Exp. Immunol.* **90**: 394-400.
- HÄNSCH, G. M. 1988. The complement attack phase. Em: ROTHER, K. e TILL, G. O. eds. *The Complement System*. Springer-Verlag, Berlin. Cap. 1, p. 202-30.
- HARRISON, R. A., THOMAS, M. L. e TACK, B. F. 1981. Sequence determination of the thiolester site of the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7388-92.

- HAUPTMANN, G. 1989. Frequency of complement deficiencies in man, disease associations and chromosome assignment of complement genes and linkage groups. *Complement Inflamm.* **6**: 74-80.
- HAZLEWOOD, M. A., KUMARARATNE, D. S., WEBSTER, A. D. B., GOODALL, M., BIRD, P. e DAHA, M. 1992. An association between homozygous C3 deficiency and low levels of anti-pneumococcal polysaccharide antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **87**: 404-9.
- HEYMAN, B., WIERSMA, E. J. e KINOSHITA, T. 1990. In vivo inhibition of the antibody response by a complement receptor-specific monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **172**: 665-8.
- HOLMSKOV, U., MALHORTA R., SIM, R. B. e JENSENIUS, J. C. 1994. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today* 67-74.
- HSIEH, K., LIN, C. e LEE, T. 1981. Complete absence of the third component of complement in a patient with repeated infections. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **20**: 305-12.
- HUANG, J. L. e LIN, C. Y. 1994. A hereditary C3 deficiency due to aberrant splicing of exon 10. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **73**: 267-73.
- HUGLI, T. E. e MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1978. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv. Immunol.* **261**: 1-53.
- HUNTER, W. M. 1978. Radioimmunoassay. Em: WEIR, D. M. ed. *Handbook of Experimental Immunology*, 3<sup>a</sup> ed. Blackwell, Oxford. Cap. 14, p. 14.114.40.
- IMAI, K., NAKAJIMA, K., EGUCHI, K., MIYAZAKI, M., ENDOH, M., TOMINO, Y. et al. 1991. Homozigous C3 deficiency associated with IgA nephropathy. *Nephron* **59**: 148-52.
- ISAAC, L. e ISENMAN, D. E. 1992. Structural requirements for thioester bond formation in human complement component C3. *J. Biol. Chem.* **267**: 10062-9.

- ISAAC, L., AIVAZIAN, D., TANIGUCHI-SIDLE, A., EBANKS, R. O., FARAH, C. S., FLORIDO, M. P. C. *et al.* 1998. Native conformations of human components C3 and C4 show different dependencies on thioester bond formation. *Biochem. J.* **329**: 705-12.
- JOHNSON, A., HARKIN, S., STEWART, M. W. e WHALEY, K. 1987. The effect of immunoglobulin isotype and antibody affinity on complement-mediated inhibition of immune-precipitation and solubilization. *Mol. Immunol.* **24**: 1211-7.
- KAPLAN, M. e VOLANAKIS, J. 1974. Interaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides: lecithinin and sphingomyelin. *J. Immunol.* **112**: 2135-47.
- KATZ, Y., REVEL, M. e STRUNK, R. C. 1989. Interleukin 6 stimulates synthesis of complement proteins factor B and C3 in human skin fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* **19**: 983-8.
- KATZ, Y., SINGER, L., WETSEL, R. A., SCHLESINGER, M. e FISHELSON, Z. 1994. Inherited complement C3 deficiency: a defect in C3 secretion. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1517-22.
- KATZ, Y., WETSEL, R. A., SCHLESINGER, M. e FISHELSON, Z. 1995. Compound heterozygous complement C3 deficiency. *Immunol.* **94**: 5-7.
- KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. e YAMASHURA, I. 1983. Isolation and characterization of a mannose-binding protein from human serum. *J. Biochem.* **94**: 937.
- KIM, Y. -U., KINOSHITA, T., MOLINA, H., HOURCADE, D., SEYA, T., WAGNER, L. M. *et al.* 1995. Mouse complement regulatory protein Crry/p65 uses the specific mechanisms of both human decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *J. Exp. Med.* **181**: 151-9.
- KOMATSU, M., YAMAMOTO, K., NAKANO, Y., NAKAZAWA, M., OZAWA, A. e MIKAMI, M. 1988. Hereditary C3 hypocomplementemia in the rabbit. *Immunol.* **64**: 363-8.

- KOVARIK, J. e SIEGRIST, C. -A. 1997. Immunity in early life. *Immunol. Today* **19**: 150-2.
- LACHMANN, P. J. 1991. The control of homologous lysis. *Immunol. Today* **12**: 312-5.
- LACHMANN, P. J. e HUGHES-JONES, N. C. 1984. Initiation of complement activation. *Springer Semin. Immunopathol.* **7**: 143-62.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
- LAW, S. K. A. 1988. C3 receptors on macrophages. *J. Cell. Sci. Suppl.* **9**: 67-97.
- LOKKI, M. -L. e COLTEN, H. R. 1995. Genetic deficiencies of complement. *Ann. Med.* **27**: 451-4.
- MATHIESON, P. W., WURZNER, R., OLIVEIRA, D. B. G., LACHMANN, P. J. e PETERS, D. K. 1993. Complement-mediated adipocyte lysis by nephritic factor sera. *J. Exp. Med.* **177**: 1827-31.
- MATSUSHITA, M. e FUJITA, T. 1995. Cleavage of the third component of complement C3 by mannose-binding protein-associated serine protease MASP with subsequent complement activation. *Immunobiol.* **194**: 443-8.
- MAYER, M. M. 1961. Complement and complement fixation. Em: KABAT, E. A. e MAYER, M. M. eds. *Experimental Immunochemistry*, 2<sup>a</sup> ed. Thomas Books, Springfield. Cap. 4, p. 133-240.
- MEDZHITOV, R. e JANEWAY, C. A 1998. An ancient system of host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 12-5.
- MILLER, G. e NUSSSENSWEIG, V. 1975. A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 418-22.
- MITCHELL, T. J., NAUGHTON, M., NORSWORTHY, P., DAVIES, K. A., WALPORT, M. J. e MORLEY, B. J. 1996. IFN- $\gamma$  up-regulates expression of the complement components C3 and C4 by stabilization of mRNA. *J. Immunol.* **156**: 4429-34.

- MOLINA, H., HOLERS, V., LI, B., FUNG, Y., MARIATHASAN, S., GOELLNER, J. *et al.* 1996. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3357-61.
- MORGAN, B. P. 1990. *Complement: Clinical Aspects and Relevance to Disease*. Academic Press, London. 214 p.
- MORGAN, B. P. 1994. Clinical complementology: recent progress and future trends. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**: 219-28.
- MORGAN, B. P. 1995. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **32**: 265-98.
- MORGAN, B. P. e WALPORT, M. J. 1991. Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* **12**: 301-6.
- MORGAN, B. P. e HARRIS, C. L. 1999. *Complement Regulatory Proteins*. Academic Press, London. 382 p.
- MOXON, E. R. e KROLL, J. S. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**: 65-85.
- NEWTON, C. R., GRAHAM, A., HEPTINSTALL, L. E., POWELL, S. J., SUMMERS, C., KALSHEKER, N. *et al.* 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system ARMS. *Nucl. Acids Res.* **17**: 2503-16
- NILSSON, U. R. e NILSSON, B. 1984. Simplified assays of hemolytic activity of the classical and alternative complement pathways. *J. Immunol. Methods* **72**: 49-59.
- NILSSON, U. R., NILSSON, B., STORM, K., SJÖLIN-FORSBERG, G. e HÄLLGREN, R. 1992. Hereditary dysfunction of the third component of complement associated with a systemic lupus erythematosus-like syndrome and meningococcal meningitis. *Arthritis Rheum.* **35**: 580-6.
- OCHS, H. D., WEDGWOOD, R. J., HELLER, S. R., e BEATTY, P. G. 1986. Complement membrane glycoproteins, and complement receptors: their role in regulation of the immune response. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **40**: 94-104.

- OSOFSKY, S. G., THOMPSON, B. H., LINT, T. F. e GEWURZ, H. 1977. Hereditary deficiency of the third component of complement in a child with fever, skin rash and arthralgias: Response to transfusion of whole blood. *J. Pediatr.* **90**: 180-6.
- OUCHTERLONY, Ö. e NILSSON, L., -Å 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Em: WEIR, D. M. ed. *Handbook of Experimental Immunology*, 3<sup>a</sup> ed. Blackwell, Oxford. Cap. 19, p. 19.1-19.44.
- PANGBURN, M. K. 1988. Alternative pathway of complement. *Methods Enzymol.* **162**: 639-53.
- PARISH, C. R. e O'NEILL, E. R. 1997. Dependence of the adaptive immune response on innate immunity: some questions answered but new paradoxes emerge. *Immunol. Cell Biol.* **75**: 523-7.
- PELEG, D., HARIT-BUSTAN, H., KATZ, Y., PELLER, S., SCHLESINGER, M., e SCHONFELD, S. 1992. Inherited C3 deficiency and meningococcal disease in a teenager. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**: 401-4.
- PEPYS, M. B. 1974. Role of complement in induction of antibody production in vivo. *J. Exp. Med.* **140**: 126-45.
- PLATTS-MILLS, T. E. e ISHIZAKA, K. 1974. Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* **113**: 348-58.
- POZANSKY, M. C., CLISSOLD, P. M. e LACHMANN, P. 1989. The difference between human C3F and C3S results from a single amino acid change from an asparagine to an aspartate residue at position 1216 on the  $\alpha$ -chain of the complement component C3. *J. Immunol.* **43**: 1254-8.
- PUSSELL, B. A., NAYEF, M., BOURKE, E., MORRIS, S. e PETERS, D. K. 1980. Complement deficiency and nephritis: A report of a family. *Lancet* **i**: 675-7.
- RAY, C. G. e HICKS, M. J. 1989. Diagnóstico laboratorial dos vírus, rickettsias e chlamydias. Em: HENRY, J. B. ed. *Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais*, 16<sup>a</sup> ed. Manole, São Paulo. Cap. 52, p. 1951-2021.



- REICHERT, T., DEBRUYERE, M., DENEYS, V., TOTTERMAN, T., LYDYARD, P., YUKSEL, F. *et al.* 1991. Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **60**: 190-208.
- REID, K. B. M. 1988. The complement system. Em: HAMES, B. D. e GLOVER, D. M. eds. *Molecular Immunology*. IRL Press, Oxford. Cap. 5, p.189-241.
- RITTNER, C., e STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B. 1990. C3 Reference typing report and nomenclature revision. *Complement Inflamm.* **7**: 230-3.
- ROORD, J. J., DAHA, M., KUIS, W., VERBRUGH, H. A., VERHOEF, J., ZEGERS, B. J. *et al.* 1983. Inherited deficiency of the third component of complement associated with recurrent pyogenic infections, circulating immune complexes and vasculitis in a dutch family. *Pediatrics* **71**: 81-7.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- SANAL, Ö., LOOS, M., ERSOY, F., KANRA, G., SEÇMEER, G. e TEZCAN, I. 1992. Complement component deficiencies and infection: C5, C8 and C3 deficiencies in three families. *Eur. J. Pediatr.* **151**: 676-9.
- SANO, Y., NISHIMUKAI, H., KITAMURA, H., NAGAKI, K., INAI, S., HAMASAKI, Y. *et al.* 1981. Hereditary deficiency of the third component of complement in two sisters with systemic lupus erythematosus-like symptoms. *Arthritis Rheum.* **24**: 1255-60.
- SATO, T., ENDO, Y., MATSUSHITA, M. e FUJITA, T. 1994. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int. Immunol.* **6**: 665-9.
- SCHIFFERLI, J. A., NG, Y. C. e PETERS, D. K. 1986. The role of complement and its receptors in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* **315**: 488-95.
- SCHNEIDER, P. M. e WÜRZNER, R. 1999. Complement genetics: biological implications of polymorphisms and deficiencies. *Immunol. Today* **20**: 2-5.

- SCHREIBER, R. D. 1984. The chemistry and biology of complement receptors. *Springer Semin. Immunopathol.* **7**: 221-49.
- SCHUMAKER, V. N., ZÁVODSZKY, P. e POON, P. H. 1987. Activation of the first component of complement. *Annu. Rev. Immunol.* **5**: 21-42.
- SENGELOV, H., KJELDSEN, L., KROEZE, W., BERGER, M. e BORREGAARD, N. 1994. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J. Immunol.* **153**: 804-10.
- SIM, R. B., TWOSE, T. M., PATERSON, D. S. e SIM, E. 1981. The covalent binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.* **193**: 115-27.
- SIM, R. B., KÖLBLE, K. MCALEER, M. A., DOMINGUEZ, O, e DEE, V. M. 1993. Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Intern. Rev. Immunol.* **10**: 65-86.
- SINGER, L., COLTEN, H. R. e WETSEL, R. A. 1994a. Complement C3 deficiency: human, animal and experimental models. *Pathobiol.* **62**: 14-28
- SINGER, L., WHITEHEAD, W. T., AKAMA, H., KATZ, Y., FISHELSON, Z. e WETSEL, R. A. 1994b. Inherited human complement C3 deficiency. *J. Biol. Chem.* **269**: 28494-9.
- SINGER, L., VAN HEE, M., LOKKI, M. L., KRAMER, J., BORZY, M. S. e WETSEL, R. A. 1996. Inherited complement C3 deficiency: reduced C3 mRNA and protein levels in a laotian kindred. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**: 244-52.
- SPRINGER, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-14.
- STRUNK, R. C., WHITEHEAD, A. S. e COLE, F. S. 1985. Pretranslational regulation of the synthesis of the third component of complement in human mononuclear phagocytes by the lipid A portion of lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **76**: 985-90.
- STRYER, L. 1988. *Bioquímica*, 3<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 881 p.
- TEDDER, T. F., STEEBER, D. A., CHEN, A. e ENGEL, P. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**: 866-73.

- TENNER, A. J. 1999. Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 34-41.
- THIEL, S., VORUP-JENSEN, T., STOVER, C., SCHWAELEBE, W., LAURSEN, S. B., POULSEN, K. *et al.* 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* **386**: 506-10.
- THOMPSON, J. S. e THOMPSON, M. W. 1991. *Genetics in Medicine*, 3<sup>a</sup> ed. Saunders, Philadelphia. 339 p.
- THORN, G. W., ADAMS, R. D., BRAUNWALD, E., ISSELBACH, K. J. e PETERSDORF, R. G. eds. 1977. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 8<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Kogakusha.
- TILL, G. O. 1988. Chemotactic factors. Em: ROTHER, K. e TILL, G. O. eds. *The Complement System*. Springer-Verlag, Berlin. Cap. 2, p. 354-67.
- TODD *et al.* 1989. Em: HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica Por Exames Laboratoriais*, 16<sup>a</sup> ed. Manole, São Paulo.
- VIK, D. P., AMIGUET, P., MOFFAT, G. J., FEY, M., AMIGUET-BARRAS, F., WETSEL, R. A. *et al.* 1991. Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry* **30**: 1080-5.
- VOGEL, C. W., SMITH, C. A. e MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1984. Cobra venom factor: Structural homology with the third component of human complement. *J. Immunol.* **133**: 3235-41.
- VYSE, T. J., MORLEY, B. J., BARTÓK, I., THEODORIDIS, E. S., DAVIES, K. A. e WEBSTER, D. B. 1996. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J. Clin. Invest.* **97**: 925-33.
- WASHINGTON 1989. Em: HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica Por Exames Laboratoriais*, 16<sup>a</sup> ed. Manole, São Paulo.

- WATANABE, Y., MATSUI, N., YAN, K., NISHIMUKAI, H., TOKUNAGE, K., JUJI, T. *et al.* 1993. A novel C3 allotype C3'-F02' has an amino acid substitution that may inhibit iC3b synthesis and cause C3-hypocomplementemia. *Mol. Immunol.* **30**: 62.
- WESSELS, M. R., BUTKO, P., MA, M., WARREN, H. B., LAGE, A. L. e CARROLL, M. C. 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11490-4.
- WHALEY, K. e LEMERCIER, C. 1993. The complement system. Em: SIM, E. ed. *Humoral Factors*. Oxford University Press, Oxford. Cap. 5, p. 121-50.
- WILKINSON, P. C., HASTON, W. S. e SHIELDS, J. M. 1982. Some determinants of the locomotory behaviour of phagocytes and lymphocytes *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* **50**: 461-73.
- WILSON, J. G., RATNOFF W. D., SCHUR P. H. e FEARON, D. T. 1986. Decreased expression of the C3b/C4b receptor CR1 and the C3d receptor CR2 on B lymphocytes and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **29**: 739-47.
- WINKELSTEIN, J. A. 1981. Genetically determined deficiency of the third component of complement in the dog. *Science* **215**: 1169-70.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3<sup>a</sup> ed. Prentice-Hall, New Jersey. 662 pp.
- ZIEGLER, J. B., ALPER, C. A., ROSEN, F. S., LACHMANN, P. J. e SHERINGTON, L. 1975. Restoration by purified C3b inactivator of complement-mediated function *in vivo* in a patient with C3b inactivator deficiency. *J. Clin. Invest.* **55**: 668-72.
- ZIGMOND, S. H. e HIRSCH, J. G. 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new method for the evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* **137**: 387-410.
- ZIPFEL, P. F. e SKERKA, C. 1994. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol. Today* **15**: 121-6.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the immune functions dependent on the complement system in a Brazilian child (L.A.S.) victim of recurrent bacterial infections and vasculitis whose parents present second degree of consanguinity (uncle and niece).

Serum C3, C4, factors I, H and Ig classes concentrations were determined by radial immunodiffusion. The presence of C5, C6, C7, C8 and C9 was determined by double immunodiffusion. *Chemotactic assays*: Migration of normal human leukocytes through nitrocellulose filters in response to various treatments of serum was measured employing Boyden chambers. *Phagocytic assays*: Ingestion and killing of *C. albicans* by normal leukocytes were determined when the fungi were treated with L.A.S. serum or a pool of 46 normal sera (NHS). *C3 allotyping* involved amplification of genomic DNA with primers specific for C3 slow (S) and fast (F) alleles and the products were analysed after electrophoresis in agarose gel. *Metabolic labelling and immunoprecipitation*: Fibroblast culture from the proband, his mother and a normal individual were stimulated with LPS and incubated with 250  $\mu\text{Ci}$  of  $\text{S}^{35}$ -met and  $\text{S}^{35}$ -cys. After 3 and 24 h the culture supernatants were collected and immunoprecipitated with rabbit polyclonal  $\alpha$ -C3 (or  $\alpha$ -fB as a control). Products were analysed by SDS-PAGE.

C3 concentration in the mother's serum was less than 50% normal (429  $\mu\text{g/mL}$ ) while in L.A.S. it was undetectable by radial immunodiffusion, while by RIA 0.15  $\mu\text{g/mL}$  were detected. Classical and alternative pathways dependent hemolytic activities of the proband's serum were nule. When purified C3 was added to the proband's serum the hemolytic activity was restored.

All other complement proteins analysed were present at normal concentrations in all individuals studied. Total IgG and IgA were normal in L.A.S. and IgM was elevated in three different occasions. Among the IgG subtypes, IgG4 was undetectable. Other parameters studied such as number of LT, LB,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ , NK cells and DTH were also normal in the proband.

Leukocyte migration in response to the proband's serum activated with *E. coli* LPS was  $39.1 \pm 4.6 \mu\text{m}$  while in the presence of NHS it was  $53.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$ , rather this migration was comparable to that generated by NHS inactivated at  $56^\circ\text{C}$  ( $42.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ).

Ingestion and killing of *C. albicans* by normal phagocytes was diminished when the fungi were opsonized with the proband's serum in comparison to those opsonized with NHS. In one experiment the percentage of killing was statistically similar to that observed after treatment of *C. albicans* with Hank's medium alone while in the other two it was similar to that of heat-inactivated NHS.

C3 Allotyping revealed the presence of two C3S alleles in L.A.S. while his mother is C3S/F and his younger and healthy brother carries two C3S alleles.

C3 synthesized by the mother's fibroblasts showed  $\alpha$  and  $\beta$  chains of normal sizes compared to those seen in the control and purified protein (marker). No C3  $\alpha$  or  $\beta$  chains were observed in the proband's supernatants. The size of the single band observed in the autoradiography of the SDS-PAGE gel after immunoprecipitation with anti-fB was similar to the fB single chain.

We concluded that in consequence of primary C3 deficiency the proband cannot achieve normal immune functions dependent on complement activation. C3 allotyping was not informative of the pattern of inheritance of this deficiency. The molecular basis of this deficiency will be later investigated.

**Anexo 1:** Números totais de *C. albicans* vivas ou mortas, em fagócitos normais, após opsonização com soro normal e do probando

<i>Experimento</i>	<i>Tratamento</i>											
	SSBH			SHNi			SHN			LAS		
	vivas	mortas	total	vivas	mortas	total	vivas	mortas	total	vivas	mortas	total
1°	277	173	450	273	370	643	162	252	414	113	113	226
2°	313	186	499	394	383	777	381	560	941	304	303	607
3°	382	352	734	292	360	652	407	656	1063	314	363	677

**SSBH:** solução salina balanceada de Hank; **SHN:** mistura de 46 soros humanos normais; **SHNi:** mistura de soros inativada por aquecimento; **LAS:** probando.

## Anexo 2: Reagentes utilizados

Acrilamida - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Adjuvante completo de Freund - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Agarose, baixa e média eletroendosse - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Azul de bromofenol - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Azul de Coomassie - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Bis-acrilamida (N, N'-metileno-bis-acrilamida) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Brometo de etídio - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

BSA (albumina sérica bovina) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

C4, FH e FI humanos purificados - Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA EUA

Câmaras de Suta - Permutation Equipamentos e Produtos Químicos LTDA, Curitiba, Ind. Bras.

DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium")

- Cultilab-Materiais para Cultura de Células LTDA, Campinas, Ind. Bras.

- Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

DMEM sem metionina e cisteína - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

DMSO (dimetilsulfóxido) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

DOC (deoxicolato de sódio) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

DTT (ditiotretol) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

EGTA (ácido etileno glicol-bis[ $\beta$ -aminoetil éter]-N',N',N' N' tetraacético) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA



Entellan - E. Merck, Darmstadt, Alemanha

Fenol (equilibrado) - USB-United States Biochemicals, Cleveland, EUA

Filtros de nitrocelulose de 13 mm de diâmetro e poros de 5 µm - Millipore Co., Bedford, MA, EUA

Gelatina de pele bovina - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Glutamina - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Hemácias de carneiro em solução de Alsever - CECON-Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico LTDA, São Paulo, Ind. Bras.

Hemácias de coelho em Alsever - CECON-Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico LTDA, São Paulo, Ind. Bras.

HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Imunoglobulinas humanas: IgG, IgM e IgA - Behringwerke AG., Marburg, Alemanha

Iodoacetamida - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

LPS (lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli* - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Penicilina G (benzilpenicilina) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Persulfato de amônio - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Proteinase K de *Tritirachium album* - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Salicilato de sódio - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

SBF (soro bovino fetal) - Cultilab-Materiais para Cultura de Células LTDA, Campinas, Ind. Bras.

SDS (dodecil sulfato de sódio) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Soros de cabra anti-C4, C5, C6, C7, C8, C9, fH e fI - Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA, EUA

Soros de carneiro anti-IgG, IgM e IgA - Biolab Diagnóstica S. A., Jacarepaguá, Ind. Bras.

SPA (proteína A de *Staphylococcus aureus* acoplada a microesferas de sefarose) - Amershan Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia

Sulfato de estreptomicina - E. Merck, Darmstadt, Alemanha

TCA (ácido tricloroacético) - E. Merck, Darmstadt, Alemanha

TEA (trietanolamina) - Merck S. A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Ind. Bras.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Trans<sup>35</sup>S-label - ICN Pharmaceuticals, Inc. Costa Mesa, CA, EUA

Tripsina 1:250 - Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA

Tris [tris(hidroximetil)aminometano] - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA

Triton X-100 (iso-octilfenoxipolietoxietanol) - LKB-Produkter AB, Bromma, Suécia

Tween 20 (polioxietilenosorbitan, monolaurato) - Riedel-De Haën AG, Hannover, Alemanha

## Anexo 3: Soluções utilizadas

O diluente utilizado nas soluções, a não ser onde mencionado, foi água destilada.

**Azul de Coomassie:** 0,73 mM; 10% de ácido acético glacial e 45% de etanol absoluto.

- **Descorante:** 10% de ácido acético glacial e 25% de etanol absoluto.

**Azul de Turk:** 2% de ácido acético glacial e 0,02% (v/v) de azul de metileno a 1%.

**Corante Rosenfeld:** 0,097% de Giemsa (p/v) e 0,053% de May-Grünwald (p/v) em metanol.

**Cristal violeta:** 0,5% do corante (p/v) e 30% de ácido acético.

**Meio DMEM, pH=7,2:** meio comercial contendo HEPES a 25 mM; bicarbonato de sódio a 24 mM; L-glutamina a 2 mM e glicose a 25 mM em água milli-Q.

**Meio para descontaminação:** meio DMEM contendo 500 U/mL de penicilina G, sulfato de estreptomicina a 0,3 mM, anfotericina B a 0,03 mM e 20% de SBF inativado a 56°C por 30 min.

**Meio Sabouraud:** 1,5% de ágar (p/v); 1% de peptona (p/v); dextrose a 0,2 M e 0,01% de cloramfenicol a 0,1 M (v/v).

**Meio suplementado:** meio DMEM contendo, 50 U/mL de penicilina G, estreptomicina a 0,03 mM e 10-20% de SBF inativado.

**PBS (solução salina tamponada com fosfato), pH=7,2:** fosfato de potássio dibásico a 5 mM; fosfato de potássio monobásico a 1,2 mM e cloreto de sódio a 150 mM.

**PBS-Blotto-("bovine lacto transfer technique optimizer")tween:** fosfato de sódio monobásico a 10 mM; cloreto de sódio a 150 mM; 0,05% de tween 20; azida sódica a 7,7 mM e 5% de leite em pó desnatado.

**Solução de carbonato de lítio:** solução saturada, diluída a 1:100.

**Solução de lise para fibroblastos:** 0,5% de triton X-100; 0,25% de DOC; EDTA a 5 mM; 0,5% de SDS; iodoacetamida a 1 mM e PMSF a 2 mM (partindo de uma solução 115 mM em etanol absoluto) em PBS.

**Solução de lise para leucócitos, pH=7,5:** 1% de triton X-100 ; sacarose a 320 mM; Tris básico a 10 mM e cloreto de magnésio a 5 mM.

**Solução de TCA 100% (p/v):** 50 g em 113,5 mL de água destilada.

**Solução de tripsina, pH=7,8:** 0,08% de tripsina; glicose a 5,5 mM; cloreto de sódio a ; cloreto de potássio a ; bicarbonato de sódio a e EDTA a 0,5 mM em água milli-Q.

**Solução monomérica de acrilamida:** 29,2% de acrilamida (p/v) e 0,8% de bis-acrilamida (p/v).

**Solução salina:** cloreto de sódio a 0,15 M.

**SSBH (solução salina balanceada de Hank), pH=7,2:** cloreto de potássio a 5,37 mM; cloreto de sódio a 137 mM; cloreto de cálcio a 1,26 mM; fosfato de sódio dibásico a 0,34 mM; fosfato de potássio monobásico a 0,44 mM; dextrose a 5,55 mM; sulfato de magnésio a 0,81 mM e 0,001% de vermelho de fenol (p/v) em água milli-Q.

**Tampão de corrida, pH=6,8:** tris básico a 62,5 mM; 10% de glicerol; 2% de SDS e 0,1% de azul de bromofenol.

**Tampão de lavagem:** tampão IPP com 0,5% de BSA.

**Tampão IPP (imunoprecipitação):** 1% de triton X-100; 0,5% de DOC; EDTA a 10 mM; 1% de SDS; iodoacetamida a 1 mM e PMSF a 2 mM (partindo de uma solução 115 mM em etanol absoluto) em PBS.

**TBE (Tris-Borato-EDTA):** ácido bórico a 89 mM; tris a 89 mM e 0,4% de EDTA 0,5 M, pH=8,0.

**TE (Tris-EDTA):** Tris-HCl, pH=7,5 a 10 mM e EDTA a 1 mM.

**TEA-(Trietanolamina)EDTA, pH=7,2:** trietanolamina a 22,5 mM; cloreto de sódio a 128 mM; azida sódica a 7,7 mM; EDTA a 10 mM e 0,1% de gelatina.

**TEA-VA (Via Alternativa), pH=7,2:** trietanolamina a 22,5 mM; cloreto de sódio a 128 mM; azida sódica a 7,7 mM; sulfato de magnésio a 2 mM; EGTA a 8 mM e 0,1% de gelatina.

**TEA-VC (Via Clássica), pH=7,2:** trietanolamina a 22,5 mM; sulfato de magnésio a 0,5 mM; cloreto de cálcio a 0,15 mM; cloreto de sódio a 128 mM; azida sódica a 7,7 mM e 0,1% de gelatina.

**Tris-Glicina, pH=8,3:** tris básico a 25 mM; glicina a 250 mM e 0,1% de SDS.