

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Expressão de proteínas reguladoras do complemento
CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico**

Ana Paula Alegretti

Orientador: Prof. Ricardo Machado Xavier

Dissertação de Mestrado

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Expressão de proteínas reguladoras do complemento
CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico**

Ana Paula Alegretti

Orientador: Prof. Ricardo Machado Xavier

Dissertação de Mestrado

2008

Agradecimentos

Ao Prof. Ricardo M. Xavier pela sua orientação, dedicação, por confiar e acreditar no meu trabalho e no meu crescimento profissional.

Aos meus amigos e membros do grupo Tregs pela possibilidade de realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo, principalmente a Joice Merzoni e ao Gustavo Faulhaber.

A minha amiga e funcionária do grupo de pesquisa e pós-graduação do HCPA, Daniela Benzano, por todo o auxílio com as análises estatísticas deste trabalho.

A todos os colegas da unidade de Hematologia pela ajuda e compreensão.

A todos os funcionários do Serviço de Patologia Clínica que foram doadores voluntários para a pesquisa.

Ao grupo dos cientistas orientados do Prof. Ricardo M. Xavier pela amizade e cooperação.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos difíceis.

Sumário

Abreviatuas e Siglas	5
Introdução	7
Justificativa do trabalho	9
Resumo	10
Abstract	11
Revisão da Literatura: “Proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico: artigo de revisão”	12
Objetivos	36
Artigo Original: “Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients”	37
Considerações Finais	58
Anexos	
Termo de Consentimento	60

Abreviaturas e Siglas

AA: Anemia aplásica

AHAI: Anemia hemolítica auto-imune

ANCA: Anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilo

BD: *Becton Dickinson*

CD46: MCP (*membrane cofactor protein*) – proteína cofator de membrana

CD55: DAF (*Decay Accelerating Factor*) – Fator de decaimento da aceleração

CD59: MIRL: (*membrane inhibitor of reactive lysis*) – Inibidor da lise de membrana

C5b-9: Complexo lítico de membrana de C5b à C9 (MAC)

Células NK (*natural killers*) – células matadoras naturais

Cregs (complement regulatory proteins) – proteínas reguladoras do complemento

DAÍ: Doenças auto-imunes

FC : Fração constante da imunoglobulina

HPN: Hemoglobinúria Paroxística Noturna

Ig: Imunoglobulina

DLLG: Doença Linfoproliferativa de linfócitos granulares

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

MAC: (*membrane attack complex*) – Complexo de Ataque à Membrana

MASPs; (*MBL-associated serine protease*) – serino proteases ligadas a MBL

MBL: (*mannose-binding lectin*): lectina ligante da manose

MFI: (*mean fluorescence intensity*) – intensidade média de fluorescência

MG: Miastenia grave

SC: Sistema Complemento

SD: (*standard deviation*) – desvio-padrão

SLE: (*Systemic Lupus Erythematosus*) – Lúpus Eritematoso Sistêmico

SLEDAI: (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) – Índice de atividade da doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico

SMD: Síndrome Mielodisplásica

Introdução

O sistema complemento é uma importante ferramenta do sistema imune, sendo a primeira barreira de combate a patógenos invasores no nosso organismo; contudo, uma ativação exacerbada do complemento pode levar à formação do complexo de ataque a membrana das próprias células do organismo e a uma formação excessiva de mediadores da inflamação.

As proteínas de membrana celular CD55 e CD59 são glicoproteínas ancoradas pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) e são responsáveis pela regulação da ação do complemento nas células. A prevalência de deficiência de expressão destas proteínas reguladoras do complemento não é conhecida no nosso meio, principalmente em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que acometer múltiplos órgãos e apresenta alterações da resposta imunológica, com presença de anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo. Anormalidades hematológicas são comumente encontradas em pacientes com LES, sendo linfopenia e anemia as alterações mais frequentes. Recentes estudos sugerem que pacientes com LES possuem uma significativa deficiência destas proteínas nas células do organismo e isto pode estar associado às citopenias presentes nessa doença.

O projeto de pesquisa que originou este trabalho foi inicialmente desenvolvido na unidade de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) devido à necessidade de se obter

um valor de referência de CD55 e CD59 nas células do sangue periférico para auxiliar no diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna. Com o desenvolver do projeto, buscou-se novas patologias que poderiam estar associadas à deficiência destas proteínas reguladoras do complemento nas membranas celulares. Nesta ocasião foram encontrados estudos, principalmente nos casos de linfoma, que demonstravam que a expressão destas proteínas poderia influenciar no tratamento com terapia através de anticorpos monoclonais, como o Rituximabe - bastante utilizado em tratamento de linfomas e mais atualmente, em doenças auto-imunes. Com isso, estudar o padrão de expressão destas proteínas se fez necessário para explorar a possibilidade de se otimizar o uso dessa terapia.

Este projeto contou com o auxílio financeiro do FIPE (O Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA) e pela empresa FK-biotecnologia da fundação de ciência e tecnologia (CIENTEC) na cidade de Porto Alegre. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do HCPA, sob o número 06-508.

Justificativa do trabalho

O padrão de expressão das proteínas reguladoras do complemento CD55 e CD59 em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico ainda não está bem estabelecido. Definir esse padrão de expressão é importante para avaliação do seu potencial significado no desenvolvimento de citopenias no LES, bem como para otimizar o uso de terapias de depleção celular que envolvam ativação do sistema complemento.

Resumo

CD55 e CD59 são proteínas de membrana ancoradas pela glicosilfosfatidilinositol que apresentam propriedades reguladoras da ativação da cascata do complemento. Esta regulação ocorre através da inibição da C3 convertase e prevenção da etapa final de polimerização do complexo de ataque à membrana, respectivamente. Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico com anemia hemolítica e linfopenia parecem apresentar uma deficiência adquirida de CD55 e CD59. Contudo, os mecanismos que modulam essa diminuída expressão continuam desconhecidos e o seu impacto nas manifestações do Lúpus Eritematoso Sistêmico necessita ser melhor estudado.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico (LES), CD55, CD59, complemento.

Abstract

CD55 and CD59 are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins with complement inhibitory properties, which inhibit formation of the C3 convertases and prevent the terminal polymerization of the membrane attack complex, respectively. Systemic Lupus erythematosus patients seem to have an acquired deficiency of CD55 and CD59 proteins associated with secondary autoimmune hemolytic anemia and lymphopenia. But the mechanisms remain unknown and its impact on the clinical manifestation of Systemic Lupus erythematosus needs to be more explored.

Keywords: Systemic Lupus erythematosus (SLE), CD55, CD59, complement

Revisão da Literatura

1 Sistema complemento

O sistema complemento (SC) é definido tradicionalmente como uma cascata de proteínas séricas solúveis ativadas seqüencialmente, resultando em morte celular através da lise direta e/ou ativação de fagócitos. O SC de mamíferos consiste em mais de 30 proteínas séricas e constituintes de membranas celulares, sendo produzidas principalmente pelo fígado. Contudo, muitos tipos celulares como monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também podem sintetizar a maioria dos componentes do complemento (1, 2).

Evidências na literatura sugerem que o SC possui a capacidade de desempenhar função imunorregulatória importante através do seu papel na imunidade humoral (3), modulação da imunidade de células T (4) e regulação da tolerância para antígenos próprios nucleares (5). Consagrado pelo papel altamente eficiente na defesa contra patógenos como bactérias, células infectadas por vírus e parasitas, o complemento também está sendo avaliado pela capacidade em mediar dano às células do próprio organismo (6-10).

O complemento pode ser ativado através da via clássica (dependente de anticorpo), via alternativa (espontânea), ou via da lectina (mediada pela ligação da lectina-manose). Após a sua ativação, os fragmentos gerados do complemento atuam modulando as reações humorais e celulares, principalmente quimiotaxia e anafilaxia,

através da interação destes fragmentos de ativação com receptores celulares ou pela deposição dos complexos protéicos na membrana celular (8, 10, 11).

A via clássica, um potente mecanismo efetor da imunidade humoral, é ativada através da interação do componente C1 do complemento aos domínios da fração constante (FC) das imunoglobulinas (Ig) IgM ou IgG complexadas ao antígeno (complexo imune antígeno-anticorpo). O C1 é formado por três proteínas (C1q, C1r, C1s), e para que ocorra a ativação do complexo C1, pelos menos dois dos seus seis sítios globulares devem ligar-se às moléculas de Ig ligadas ao patógeno. Após esta ligação, o C1q sofre uma mudança conformacional que gera ativação do C1r e clivagem do C1s que, por sua vez, é capaz de clivar C4 e C2. O fragmento C4b liga-se a membrana celular do patógeno e permite a ligação de C2a; o complexo formado C4b2a é a C3 convertase da via clássica. Quando uma molécula adicional de C3b é inserida na C3 convertase, é formado o complexo C4b2a3b (C5 convertase da via clássica) (12, 13).

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo diretamente por partículas ricas em carboidratos presentes na superfície do microorganismo invasor, envolvendo a ligação de C3b (presente de forma solúvel no plasma) e demais componentes da via alternativa: o fator B, o fator D e a properdina (fator P) (14). O fator B consiste em uma serina protease, homóloga a C2. O fator B, após sua clivagem pelo fator D, liga-se ao C3b formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). A properdina tem a capacidade de estabilizar o complexo C3bBb, que pode clivar outras moléculas de C3. Quando uma molécula adicional de C3b é inserida na C3 convertase, é formado o complexo C3bBb3b (C5 convertase da via alternativa) (15).

A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante da manose (MBL - *mannose-binding lectin*), um componente solúvel no nosso organismo, com carboidratos presentes na superfície do microrganismo alvo. A MBL é membro da família das lectinas dependentes de cálcio e possui a estrutura semelhante ao C1q. Após sua ativação ocorre a interação com serino-proteases associadas à MBL (MASPs - *MBL-associated serine protease*), que incluem MASP-1, MASP-2 e MASP-3, que clivam estruturas do complemento C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a) e C5 convertase (C4b2a3b) de maneira semelhante ao que ocorre na via clássica) (16-18).

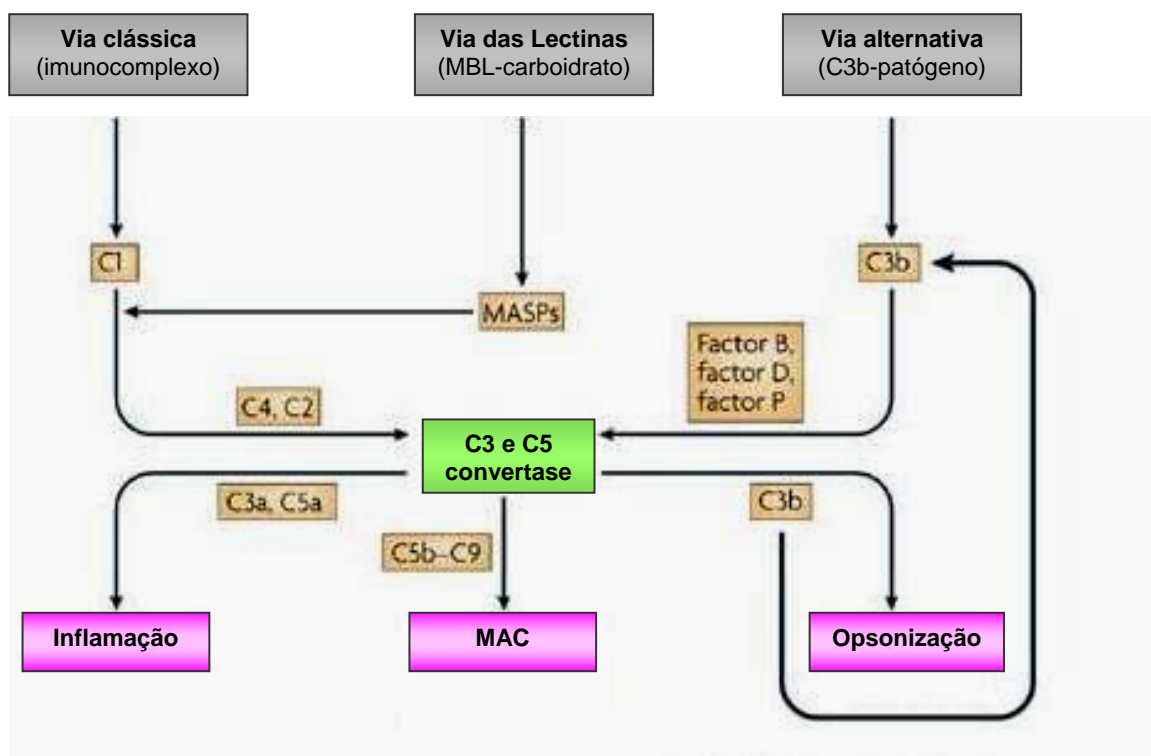


Figura 1. O complemento pode ser ativado através da via clássica, via das lectinas e da via alternativa. O componente C1 é composto de C1q, C1r e C1s e reconhece o imunocomplexo ligado à membrana celular; a lectina ligante da manose (MBL) reconhece certos carboidratos na membrana de alguns patógenos específicos; e

o C3b reconhece carboidratos presentes na membrana dos patógenos. Todas as vias de ativação originam a formação da C3 e C5 convertase, que geram anafilatoxinas C3a e C5a, a opsonina C3b e o complexo de ataque à membrana (MAC). O C3b também amplifica a via alternativa. Figura adaptada de Nature Reviews Immunology 7, 9-18: 2007 (19).

Portanto, as três vias de ativação convergem para a geração de enzimas proteolíticas, denominadas C3 convertases, que clivam a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b gerado se combina com a C3-convertase dando origem à C5-convertase, a qual cliva C5 em C5a e C5b. Os fragmentos C3a e C5a são potentes anafilatoxinas. O fragmento C5b se agrega com C6 e C7 para formar o complexo de inserção C5b-7; após esta etapa ocorre o recrutamento de C8 e múltiplas unidades de C9 na membrana da célula-alvo, formando o complexo de ataque à membrana (MAC - *membrane attack complex*) (8, 20, 21), (Figura 1). A unidade funcional do MAC é um poro inserido na bicamada fosfolipídica que interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada de água, íons e pequenas moléculas para o citosol da célula-alvo, levando à sua ruptura (22).

O complemento possui outras atividades biológicas no organismo como: opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de complexos imunes e de células apoptóticas, interface entre a imunidade inata e adaptativa, e efeito pró-inflamatório. Estes efeitos ocorrem através da ligação dos produtos de ativação com receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células (8, 11, 20, 23).

Quando o complemento é ativado por anticorpos direcionados a antígenos de origem externa, mas também eventualmente a antígenos próprios, a ativação explosiva

e inespecífica da via comum final e a formação excessiva de mediadores da inflamação pode causar danos a tecidos e células autólogas. Para proteger ou conter estes danos, o complemento é fortemente regulado por substâncias solúveis ou ligadas a membrana celular (24).

2 Proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59

As células normais que são resistentes à lise autóloga mediada pelo complemento, possuem um sistema regulador do complemento na membrana celular constituído por proteínas, sendo as principais o CD55, Fator acelerador de degradação (DAF – *decay accelerating factor*), e o CD59, Inibidor da lise de membrana (MIRL – *membrane inhibitor of reactive lysis*). O CD55 inibe a clivagem de C3 e C5 por prevenir a formação de novas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas (25). A proteína CD59 é o único regulador de membrana que interfere diretamente na estruturação do MAC através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8 (26-28), (Figura 2).

O CD55, revisado por Mikesch *et al* (29), é uma glicoproteína globular ancorada pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) que possui peso molecular que varia de 50 a 100 kDa em diferentes tipos celulares que o expressam (30). É detectado de forma solúvel no plasma, lágrima, saliva, urina, líquido sinovial e líquor (31). Além de regulador do complemento, o CD55 parece proteger as células contra a lise mediada por células matadoras naturais (células NK - *natural killers*) (32). O CD55 pode também agir como

um ligante de adesão intercelular, interagindo com CD97 nos leucócitos(33), e como um receptor para certos vírus e microorganismos (34, 35).

O CD59, revisado em Kimberley *et al* (24), é uma glicoproteína globular pequena, também ancorada pelo GPI, de aproximadamente 20 kDa e pertencente à família antígeno leucocitário 6 (Ly-6) (36, 37). Devido ao papel crucial na prevenção de danos ao próprio organismo através da deposição inapropriada do complexo lítico MAC, esta proteína é amplamente expressa na maioria dos tecidos e em todas as células circulantes (28, 38).

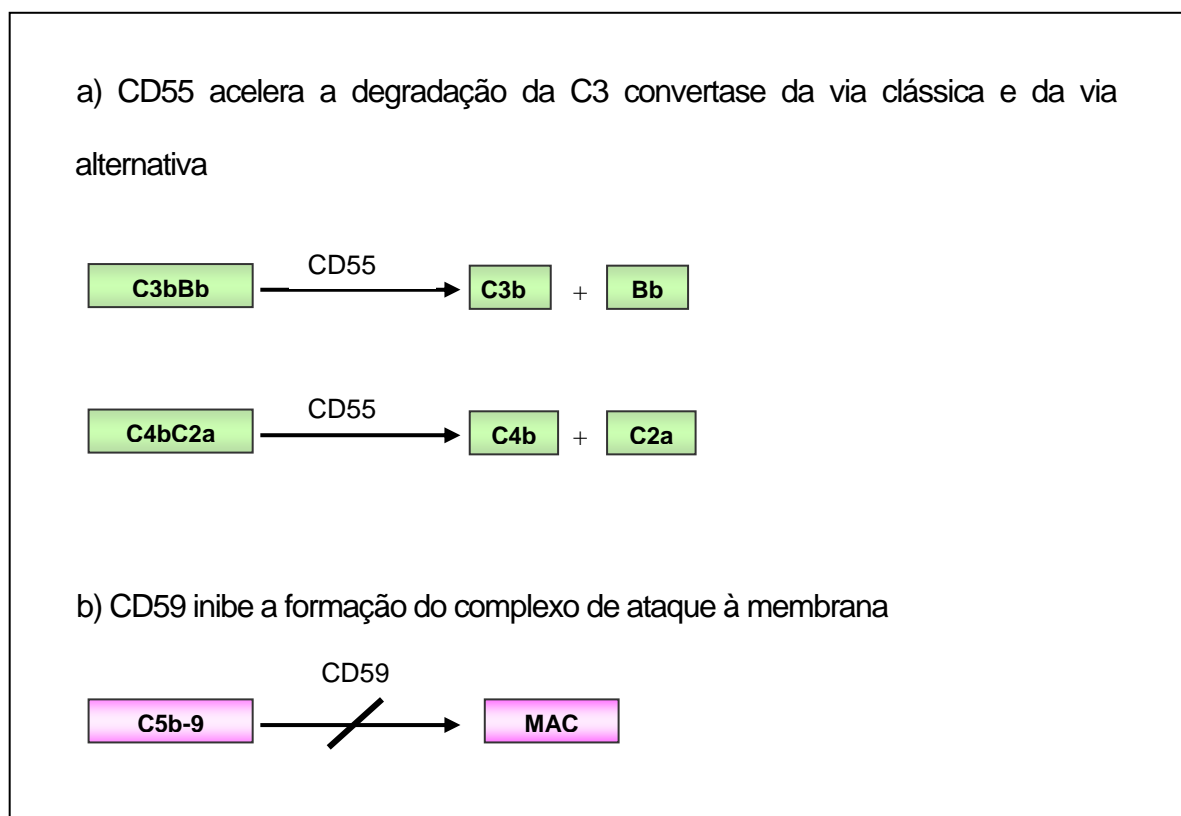


Figura 2. As glicoproteínas de membrana CD55 e CD59 regulam o sistema complemento do ataque às células do próprio organismo: CD55 promove a degradação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb) e da via clássica e da via das lectinas

(C4bC2a), e também a degradação das C5 conversases (não apresentadas); o CD59 inibe a formação do MAC (C5b-9) através da inserção da molécula durante a junção dos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9 na membrana celular. Figura adaptada de Nature Reviews Immunology 7, 9-18: 2007 (19).

A consequência patológica da deficiência de reguladores de membrana do complemento foi inicialmente reconhecida na Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN). Esta doença hematológica foi primeiramente descrita em 1866, por William Gull, e por Paul Strubing, em 1882, como uma forma distinta de anemia hemolítica rara, associada à hemoglobinúria durante a noite (39). A HPN é uma doença adquirida caracterizada pelo aumento da lise dos eritrócitos devido à diminuição de proteínas de membrana ligada a GPI, principalmente CD55 e CD59, responsáveis por inibir a lise celular autóloga do complemento (40).

A HPN é uma desordem clonal na qual ocorre uma mutação no gene PIG-A (*fosfatidilinositolglican A*) do cromossomo X, acarretando a biossíntese anormal da âncora GPI para membrana lipídica (41-44). Por se tratar de uma desordem clonal nas células tronco hematopoéticas, todas as linhagens celulares do sangue são afetadas, sendo que nos pacientes com HPN normalmente são encontradas subpopulações de células deficientes e normais (40, 44). Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão as regulatórias do complemento, como CD55, CD59 e CD46 (proteína cofator de membrana); e outras proteínas envolvidas na função imune (45, 46), como o receptor FC (CD16) em granulócitos e células NK, receptor lipopolissacarídeo (CD14) em monócitos, molécula de adesão celular (CD58) em todas as células hematopoéticas e o CD24 em linfócitos, com atividade ainda desconhecida (44).

Há poucos relatos na literatura sobre o padrão de expressão normal dessas proteínas nas células sanguíneas. Araten *et al* (47), em 1999, e Hu *et al* (48), em 2005, demonstraram que clones com mutação no gene da PIG-A são encontrados em indivíduos normais. Oelschlaegel *et al* (40), em 2001, analisaram por citometria de fluxo (CF) amostras de sangue de 52 doadores saudáveis e obtiveram um valor de referência de 3% de deficiência de CD55/CD59 nos eritrócitos e granulócitos normais. A deficiência isolada de CD55 em humanos não foi associada com hemólise intravascular ou com outra evidência de falha na regulação do complemento (49, 50). Contudo, a deficiência isolada de CD59 esteve associada com sinais e sintomas semelhantes à HPN (51), devido ao fato do CD59 ser um inibidor mais efetivo do complemento, pois bloqueia a formação do complexo de ataque à membrana.

A deficiência de CD55 e CD59 tem sido estudada em outras doenças e correlacionada com sua gravidade (52-59). Yamaguchi *et al* (60) demonstraram que 28,6% dos pacientes com anemia aplásica (AA) e 27,8% dos pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) apresentaram uma população deficiente de CD59 nos eritrócitos. Wang *et al* (61) observaram uma diminuição significativa de CD55 e CD59 em 52% nos neutrófilos de pacientes com AA não tratados. Esta deficiência acarreta processos hemolíticos mediados pelo complemento semelhantes aos encontrados na HPN.

Isoda *et al* (62), em 2007, avaliaram 40 indivíduos controles saudáveis por citometria de fluxo como controle para avaliar se pacientes com DLLG (Doença Linfoproliferativa de linfócitos granulares) compartilhavam um fenótipo HPN. O valor de corte (*cutoff*) obtido para a proporção de células negativas em indivíduos saudáveis foi abaixo de 0,04% em granulócitos e abaixo de 0,07% nos eritrócitos, tanto para CD55 como para CD59. As células dos pacientes com DLLG não demonstraram alteração da

expressão de CD55 e CD59, com exceção dos linfócitos granulares com fenótipo CD16+CD56-, os quais apresentaram deficiência destas proteínas.

A resistência de células cancerígenas à lise mediada pelo complemento é uma das estratégias adquiridas por estas células, caracterizando um obstáculo no desenvolvimento de imunoterapias baseadas em anticorpos anti-tumor que fixam complemento (63). Recentemente, estudos avaliaram a super-expressão de proteínas reguladoras do complemento em células e tecidos como um mecanismo de defesa celular contra um ataque exacerbado do sistema complemento (64-68). Esse mecanismo pode gerar resistência a drogas utilizadas na imunoterapia com ação mediada pelo complemento, como é o caso do rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico direcionado à molécula CD20, que promove a depleção de linfócitos B. Acredita-se que um dos mecanismos de ação seja a sinalização e indução de apoptose da célula B mediada pelo complemento. Esta droga tem sido cada vez mais utilizada como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B (especialmente linfomas) e doenças auto-imunes (69-75).

3 Proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em doenças auto-imunes;

Recentes estudos em modelos animais de doenças auto-imunes concomitante com a remoção de proteínas reguladoras do complemento, através da adição de anticorpos monoclonais ou da deleção gênica, (76-79) têm avaliado o papel destas proteínas nas células do organismo. Contudo, os mecanismos de ação destas proteínas ainda não estão totalmente elucidados (80).

A Esclerose Múltipla (EM) é uma das doenças que acomete o sistema nervoso central (SNC) mais comuns em adultos jovens. Sua etiologia é ainda desconhecida, mas há evidências de formação de auto-anticorpos contra antígenos presentes na camada de mielina. Na EM, a perda de mielina (desmielinização) interfere na transmissão dos impulsos, provocando sintomas variados da doença (81). Alguns experimentos com deficiência gênica de CD55 e CD59 (76, 77) em modelo de encefalomielite auto-imune experimental (modelo animal para estudos de EM) têm demonstrado que esses animais apresentaram um grau mais grave da doença quando comparado aos controles. Mead et al também reportaram que ratos deficientes de C6, incapazes de formar o MAC, não apresentaram dano de axônio nem desmielinização e que as manifestações clínicas foram menos intensas (82).

Os auto-anticorpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA - anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies) são anti-proteínas citoplasmáticas específicas de neutrófilos e monócitos, sendo a mieloperoxidase e a proteinase 3 os principais antígenos-alvo em pacientes com vasculites e glomerulonefrites. Xiao *et al* (83) sugerem que a estimulação de neutrófilos por ANCA causa a liberação de fatores que ativam o complemento através da via alternativa, levando a amplificação inflamatória da doença. Matsuo *et al* (84) relataram que a neutralização com anticorpos monoclonais de CD55 em células renais de ratos confere uma exacerbação da doença em modelos experimentais de glomerulonefrite.

Na miastenia grave (MG), o sistema imune produz anticorpos contra os receptores nicotínicos de acetilcolina localizados na junção neuromuscular, impedindo a ativação muscular. Sugere-se que o papel do complemento na patologia da MG tem base na identificação de produtos de ativação do complemento no plasma e depósito na

placa motora dos pacientes (85). Kaminski *et al* demonstraram em estudos com camundongos que a expressão de CD55 e CD59 protege contra a perda de receptores de acetilcolina e diminui o sintomas de fraqueza muscular (54).

4 O papel do complemento e das proteínas CD55/CD59 em citopenias secundárias ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente mulheres jovens, caracterizado por acometer múltiplos órgãos e apresentar alterações da resposta imunológica, com presença de anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo (86). Anormalidades hematológicas são comumente encontradas em pacientes com LES, sendo linfopenia e anemia as alterações mais freqüentes (87-89). A anemia de doença crônica, por deficiência de ferro e anemia hemolítica auto-imune (AHA) são as formas mais comuns em pacientes com LES, podendo ocorrer ainda mielotoxicidade induzida por drogas e anemia devido à falência renal crônica (90). A linfopenia está presente particularmente durante a doença ativa e é fortemente associada com crioglobulinas IgM, fixação do complemento e anticorpos anti-linfócitos. Auto-anticorpos direcionados contra as células sanguíneas podem causar lise celular por mecanismos de citotoxicidade dependente de anticorpo, opsonização, bloqueio de receptores e apoptose, entre outros (65).

Os anticorpos produzidos nas doenças auto-imunes podem se ligar a antígenos de superfícies celulares ou formar complexos imunes após a ligação com

antígenos circulantes. Estes complexos imunes tendem a se depositar em órgãos como o glomérulo renal, com subsequente ativação do sistema complemento através da via clássica, causando dano aos tecidos (11). Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos órgãos em doenças auto-imunes, pouco se conhece sobre o mecanismo das proteínas reguladoras de membrana do complemento na modulação da gravidade desse dano (91).

Miwa *et al* (92) demonstraram que a deleção do gene *Daf-1*, que codifica a molécula CD55, em camundongos MRL/lpr, modelo experimental amplamente utilizado para estudar LES, exacerbou a gravidade da doença auto-imune. Estes animais apresentaram linfadenopatia e esplenomegalia acentuada, maiores níveis de anticorpos anticromatina e dermatite mais grave do que os controles.

Pouco se tem estudado até hoje sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 nos linfócitos e eritrócitos de pacientes com LES (93) e nenhum estudo avaliou nos granulócitos e monócitos. Richaud-Patin *et al* (94) avaliaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 na membrana de eritrócitos de pacientes com AHAI, e foi encontrada uma redução destas proteínas nos eritrócitos de pacientes lúpicos que apresentam AHAI secundária. Neste estudo, os autores avaliaram a presença de anticorpos antifosfolípidios IgG e IgM e não foi encontrada nenhuma correlação entre a presença destas imunoglobulinas e a expressão de CD55 e CD59.

Posteriormente, os mesmos autores (65) investigaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 em linfócitos T e B de pacientes com LES com e sem linfopenia e demonstraram que as células de pacientes com linfopenia apresentavam diminuição de expressão de CD55 e CD59 quando comparados com os controles. De maneira interessante, encontraram que nos pacientes com LES que não apresentaram

linfopenia, os linfócitos apresentavam uma maior intensidade dessas proteínas do que os controles. Outro achado do estudo foi que a titulação dos auto-anticorpos testados (anti-SSA, anti-dsDNA e anti-P ribossomal), foi maior nos pacientes linfopênicos. Contudo, a prevalência de positividade dos anticorpos foi igual, com exceção do anti-SSA, que foi significativamente maior no grupo dos pacientes com linfopenia, achados que corroboram os relatados previamente na literatura (89, 95).

Com o objetivo de avaliar a apoptose *in vitro* nas doenças auto-imunes, Tsunoda *et al* (96) observaram uma expressão diminuída de CD59 nos linfócitos T CD8+, mas não em linfócitos T CD4+, tanto nos pacientes com LES quanto nos pacientes com síndrome de Sjögren, e de forma predominante nas células T CD8+ ativadas expressando CD45RO+ e HLADR+. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que células T CD8+CD59^{dim} (baixa expressão) foram mais suscetíveis à apoptose *in vitro*. De acordo com os dados encontrados nesse estudo, os autores sugerem que a diminuição da expressão de CD59 em células T CD8+ ativadas poderia se relacionar com a atividade da doença e a ativação ou indução da apoptose nesses pacientes.

Arora *et al* (66) avaliaram a expressão de CR1 (receptor 1 do complemento), CD55 e CD59 em eritrócitos e células do glomérulo de pacientes com LES que apresentam glomerulonefrite proliferativa difusa (GPD); a expressão de CR1 estava diminuída nos pacientes com LES e GPD tanto nos eritrócitos quanto nas células do glomérulo e, de forma interessante, CD55 e CD59 estavam aumentados nestas células. Os autores sugerem que este aumento de CD55 e CD59 acontece por compensação da expressão reduzida de CR1 (regulador do complemento a nível de C3 e C5 convertase) e como uma tentativa da célula para se proteger contra a ação do complemento.

5 Conclusão

Poucos estudos sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 em pacientes com LES são encontrados na literatura. A deficiência adquirida destas proteínas não parece ser dependente de mutações genéticas como ocorre na HPN e também não foi correlacionada com a produção de auto-anticorpos. Por outro lado, parece haver uma associação com a atividade da doença. Além disso, o papel destas proteínas na indução de citopenias secundárias ao LES não está ainda bem definido. Contudo, estudos sugerem que níveis de expressão celular de CD55 e CD59 abaixo do normal conferem uma baixa proteção à lise exacerbada do complemento e, conseqüentemente, maior suscetibilidade à morte celular mediada pelo complemento. De maneira interessante, células que expressam níveis elevados dessas proteínas parecem estar envolvidas com mecanismo de proteção às ações citolíticas do complemento.

6 Referências Bibliográficas:

1. Petry F, Reid KB, Loos M. Gene expression of the A- and B-chain of mouse C1q in different tissues and the characterization of the recombinant A-chain. *J Immunol* 1991;147(11):3988-93.
2. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol* 1997;107(1):1-7.
3. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, et al. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(8):3357-61.
4. Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, Dohmen KM, Schlichting J, Tretter T, et al. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat Immunol* 2001;2(8):739-45.
5. Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 2000;74:61-88.
6. Welch TR. Complement in glomerulonephritis. *Nat Genet* 2002;31(4):333-4.
7. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 1998;43(4):465-71.
8. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(14):1058-66.
9. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991;12(9):322-6.
10. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997;38(1-2):51-62.
11. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(15):1140-4.
12. Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* 1987;5:21-42.
13. Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt* 1993(93):138-47.

14. Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem J* 1988;252(1):47-54.
15. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002;13(2):119-25.
16. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 2001;15(1):127-35.
17. Rossi V, Cseh S, Bally I, Thielens NM, Jensenius JC, Arlaud GJ. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 2001;276(44):40880-7.
18. Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27(4):413-9.
19. Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):9-18.
20. Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 2000;49(1-2):187-98.
21. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol* 2002;23(2):61-4.
22. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989;264(1):1-14.
23. Morgan BP. The complement system: an overview. *Methods Mol Biol* 2000;150:1-13.
24. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol* 2007;44(1-3):73-81.
25. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 1989;7:35-58.
26. Rollins SA, Sims PJ. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* 1990;144(9):3478-83.

27. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol* 2002;539(Pt 2):537-45.
28. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 1990;71(1):1-9.
29. Mikesch JH, Buerger H, Simon R, Brandt B. Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766(1):42-52.
30. Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* 1994;123(4):485-91.
31. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* 1987;165(3):848-64.
32. Finberg RW, White W, Nicholson-Weller A. Decay-accelerating factor expression on either effector or target cells inhibits cytotoxicity by human natural killer cells. *J Immunol* 1992;149(6):2055-60.
33. Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 1996;184(3):1185-9.
34. Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(13):6245-8.
35. Pham T, Kaul A, Hart A, Goluszko P, Moulds J, Nowicki S, et al. dra-related X adhesins of gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* recognize SCR-3 and SCR-4 domains of recombinant decay-accelerating factor. *Infect Immun* 1995;63(5):1663-8.
36. Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, et al. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the

action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 1989;170(3):637-54.

37. Kieffer B, Driscoll PC, Campbell ID, Willis AC, van der Merwe PA, Davis SJ. Three-dimensional solution structure of the extracellular region of the complement regulatory protein CD59, a new cell-surface protein domain related to snake venom neurotoxins. *Biochemistry* 1994;33(15):4471-82.

38. Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest* 1991;65(5):532-7.

39. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455(2-3):269-86.

40. Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainty D, Nowak R, Naumann R, et al. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(2):81-90.

41. Bessler M, Hillmen P. Somatic mutation and clonal selection in the pathogenesis and in the control of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1998;35(2):149-67.

42. Bocconi P, Del Vecchio L, Di Noto R, Rotoli B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;33(1):25-43.

43. Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am J Hematol* 1999;62(3):175-82.

44. Richards SJ, Hillmen P. Advances in the laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2001;1(6):315-330.

45. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989;84(1):7-17.

46. Blanchard D, Navenot JM, Petit-Le Roux Y, Willem C, Loirat MJ. Flow cytometry and immunoblotting analysis of monoclonal antibodies directed to complement regulatory proteins. *Transfus Clin Biol* 1997;4(1):131-4.
47. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(9):5209-14.
48. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005;105(10):3848-54.
49. Reid ME, Mallinson G, Sim RB, Poole J, Pausch V, Merry AH, et al. Biochemical studies on red blood cells from a patient with the Inab phenotype (decay-accelerating factor deficiency). *Blood* 1991;78(12):3291-7.
50. Lublin DM, Mallinson G, Poole J, Reid ME, Thompson ES, Ferdman BR, et al. Molecular basis of reduced or absent expression of decay-accelerating factor in Cromer blood group phenotypes. *Blood* 1994;84(4):1276-82.
51. Motoyama N, Okada N, Yamashina M, Okada H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol* 1992;22(10):2669-73.
52. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Konstantopoulos K, Komninaka V, et al. Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia (Budap)* 2001;31(1):7-16.
53. Azenishi Y, Ueda E, Machii T, Nishimura J, Hirota T, Shibano M, et al. CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1999;104(3):523-9.
54. Kaminski HJ, Kusner LL, Richmonds C, Medof ME, Lin F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Exp Neurol* 2006;202(2):287-93.
55. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V, et al. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol* 2002;75(1):40-4.

56. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V, et al. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001;2(1):33-7.
57. Ruiz P, Wepler D, Tryphonopoulos P, Nishida S, Moon J, Kato T, et al. CD55 and CD59 deficiency in transplant patient populations: possible association with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-like symptoms in Campath-treated patients. *Transplant Proc* 2006;38(6):1750-2.
58. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107(4):1308-14.
59. Yang LB, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2000;20(20):7505-9.
60. Yamaguchi M, Machii T, Azenishi Y, Nishimura J, Shibano M, Kanakura Y, et al. Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26(3):247-54.
61. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H, et al. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 2001;66(3):200-5.
62. Isoda A, Tsukamoto N, Mitsui T, Yamane A, Hatsumi N, Matsushima T, et al. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29(1):52-7.
63. Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2000;26(4):269-86.
64. Li SH, Szmítko PE, Weisel RD, Wang CH, Fedak PW, Li RK, et al. C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 2004;109(7):833-6.

65. Garcia-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jakez-Ocampo J, Soto-Vega E, Elias-Lopez D, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus* 2006;15(9):600-5.
66. Arora M, Arora R, Tiwari SC, Das N, Srivastava LM. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis. *Lupus* 2000;9(2):127-31.
67. Cuida M, Legler DW, Eidsheim M, Jonsson R. Complement regulatory proteins in the salivary glands and saliva of Sjogren's syndrome patients and healthy subjects. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(6):615-23.
68. Qin C, Cai XY. [Research progression on complement regulatory proteins CD46, CD55, and CD59 in tumor immunotherapy]. *Ai Zheng* 2006;25(11):1450-3.
69. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000;95(12):3900-8.
70. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001;98(12):3383-9.
71. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res* 2006;30(5):625-31.
72. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Esteve J, Campo E, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001;98(9):2771-7.
73. Fierro MT, Savoia P, Quaglino P, Novelli M, Barberis M, Bernengo MG. Systemic therapy with cyclophosphamide and anti-CD20 antibody (rituximab) in

relapsed primary cutaneous B-cell lymphoma: a report of 7 cases. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(2):281-7.

74. Thatayatikom A, White AJ. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006;5(1):18-24.

75. Pickartz T, Ringel F, Wedde M, Renz H, Klein A, von Neuhoff N, et al. Selection of B-cell chronic lymphocytic leukemia cell variants by therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Exp Hematol* 2001;29(12):1410-6.

76. Mead RJ, Neal JW, Griffiths MR, Linington C, Botto M, Lassmann H, et al. Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 2004;84(1):21-8.

77. Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD, et al. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med* 2005;201(4):567-77.

78. Tuzun E, Saini SS, Morgan BP, Christadoss P. Complement regulator CD59 deficiency fails to augment susceptibility to actively induced experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006;181(1-2):29-33.

79. Lin F, Salant DJ, Meyerson H, Emancipator S, Morgan BP, Medof ME. Respective roles of decay-accelerating factor and CD59 in circumventing glomerular injury in acute nephrotoxic serum nephritis. *J Immunol* 2004;172(4):2636-42.

80. Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP. Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria. *Blood* 2001;98(2):442-9.

81. Lutterotti A, Berger T, Reindl M. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2007;14(18):1956-65.

82. Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002;168(1):458-65.

83. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007;170(1):52-64.

84. Matsuo S, Nishikage H, Yoshida F, Nomura A, Piddlesden SJ, Morgan BP. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats. *Kidney Int* 1994;46(1):191-200.
85. Chamberlain-Banoub J, Neal JW, Mizuno M, Harris CL, Morgan BP. Complement membrane attack is required for endplate damage and clinical disease in passive experimental myasthenia gravis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):278-86.
86. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369(9561):587-96.
87. Keeling DM, Isenberg DA. Haematological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Blood Rev* 1993;7(4):199-207.
88. Nossent JC, Swaak AJ. Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1991;80(291):605-12.
89. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Tueting T, Bieber T. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: close in vivo association to autoantibodies targeting nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2004;150(5):994-8.
90. Voulgarelis M, Kokori SI, Ioannidis JP, Tzioufas AG, Kyriaki D, Moutsopoulos HM. Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis* 2000;59(3):217-22.
91. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006;118(2-3):127-36.
92. Miwa T, Maldonado MA, Zhou L, Sun X, Luo HY, Cai D, et al. Deletion of decay-accelerating factor (CD55) exacerbates autoimmune disease development in MRL/lpr mice. *Am J Pathol* 2002;161(3):1077-86.
93. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007;6(3):155-61.
94. Richaud-Patin Y, Perez-Romano B, Carrillo-Maravilla E, Rodriguez AB, Simon AJ, Cabiedes J, et al. Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2003;88(2):95-9.

95. Bohm I. Apoptosis: the link between autoantibodies and leuko-lymphocytopenia in patients with lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2004;33(6):409-16.
96. Tsunoda S, Kawano M, Koni I, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T, et al. Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2000;51(3):293-9.

Objetivos

Definir o perfil de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55 e CD59 em eritrócitos e leucócitos de pacientes com LES.

Objetivos secundários

1. Definir a proporção de eritrócitos e leucócitos que expressam CD55 e CD59 na membrana celular (porcentagem de células positivas).
2. Definir a intensidade de expressão CD55 e CD59 na membrana celular de eritrócitos e leucócitos que expressam estas proteínas.
3. Comparar os resultados obtidos com controles pareados por idade e sexo
4. Associar a proporção de células positivas e a intensidade de expressão destes marcadores com a presença de citopenias nos pacientes com LES.

**EXPRESSION OF CD55 AND CD59 ON PERIPHERAL BLOOD CELLS
FROM SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) PATIENTS**

A. P. Alegretti, T. Mucenic, J. C. T. Brenol, R. M. Xavier*

Division of Clinical Pathology and Rheumatology. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

J. Merzoni, L. M. Silla

Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

G. A. M. Faulhaber,

Division of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author*: Ricardo Machado Xavier

Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre—HCPA,

Rua Ramiro Barcelos, 2350—2° andar,

Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil

e-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

1. Summary

CD55 and CD59 are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins with complement inhibitory properties. CD55 inhibits the formation of C3 convertases, and CD59 prevents the terminal polymerization of the membrane attack complex. It has been reported that SLE patients have an acquired deficiency of CD55 and CD59 proteins associated with secondary autoimmune haemolytic anaemia and lymphopenia. The mechanisms of this disorder remain unclear and its impact on the clinical manifestation of SLE needs more study. The aim of this study was to evaluate the presence of altered CD55 and CD59 expression on peripheral blood cells from SLE patients. Flow cytometric analyses were performed on CD55 and CD59 stained red and white blood cells from 23 SLE patients and 23 sex-and age-matched healthy controls. There were no significant statistical differences in CD55+ and CD59+ cell proportions when monocytes and red cells were compared between the groups. However, we observed more CD55- and CD59- lymphocytes ($p=0.005$ and $p=0.019$, respectively), and CD59- granulocytes ($p=0.045$) in SLE patients than in controls. The CD55 membrane intensity on SLE red cells ($p<0.001$) and granulocytes ($p=0.044$) were significantly reduced when compared to the controls; while on other blood cells there were no significant differences in the membrane intensity. In SLE patients with lymphopenia a higher proportion of CD55- or CD59- lymphocytes was found. These results suggest that there is an altered pattern of CD55 and CD59 expression on the peripheral blood cells of

SLE patients, and it may play a role in the pathophysiology of cytopenias in these patients.

2. Introduction

The complement system is an important component of the immune [process](#) for the control of infectious agents; it acts by facilitating the phagocytosis of immune complexes, pathogens and apoptotic cells and by forming the membrane attack complex (MAC) resulting in cell lysis. It is activated through three pathways: the classical, the lectin, and the alternative pathways. These three pathways use different proteins to produce C3 and C5 convertases, which involves cleavage of C2 and C4 (classical and lectin pathway) or serine proteases factor B and factor D (alternative pathway); and all [results](#) in the formation of the MAC (C5b-9) (1, 2). On the other hand, inappropriate and excessive activation of the complement system [are](#) involved in numerous pathological conditions, because its activation leads to tissue injury through the generation of chemotactic factors and damage of the resident cells following C5b-9 insertion. Some complement components appear to mediate tissue damage initiated by autoantibodies in many immune diseases (3, 4).

Normal cell membranes express many proteins that regulate activation of the complement system and provide essential protection against damage to self (5). These proteins are known as complement regulatory (Creg) proteins. There are three major human cell surface Creg proteins: CD46 (membrane cofactor protein), which facilitates C3b and C4b inactivation (6), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis - MIRL), which is a complement membrane inhibitor that blocks assembly of the MAC by binding to C8 and C9 (7); and CD55 (decay accelerating factor - DAF), that accelerates the disassembly of preformed C3

and C5 convertases (8). It has been reported that the production and the expression of some of the regulatory proteins are altered in autoimmune diseases and that inherited deficiencies of the complement system components are associated with a high prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE), glomerulonephritis, and vasculitis (9-11).

SLE is a multisystem autoimmune connective tissue disorder with variable clinical presentations (12), where B cells produce antibodies directed against self-antigens, which form immune complexes that are deposited on tissues (13, 14). The complement system is integrally involved in the pathogenesis of tissue injury in SLE. Tissue deposition of immunoglobulin is a characteristic feature of SLE and can cause continued complement activation by the classical pathway (10).

Some SLE patients seem to have an acquired deficiency of CD55 and CD59 proteins and it has been associated with secondary autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) and lymphopenia (15, 16). Richaud-Patin et al (15) found a diminished expression of CD55 and CD59 on red cells from several SLE patients with secondary AIHA. Garcia-Valladares (16) demonstrated that T and B cells from lymphopenic SLE patients showed a decreased MFI (mean fluorescence intensity) CD55 and CD59 expression. Lymphopenia and anaemia are the most frequent haematological findings in this disease (17, 18). Although the cause is unclear, autoantibodies against lymphocyte and red cell surface molecules and consequent cell lysis by complement unspecific activation could be an explanation for these manifestations (15, 16, 19). Otherwise, the over expression of these regulatory proteins may exert a protective effect against

complement-mediated injury (20). Neutropenia is also common in SLE patients but there are no studies evaluating CD55/CD59 expression on these cells.

Previous studies analyzed only the MFI of CD55 and CD59 on the cell membrane and did not present any data on the proportion of cells with negative expression of these proteins. Studies evaluating potential differences on the proportions of CD55- and CD59- blood cells could be clinically significant. This study assessed the MFI and the proportion of blood cells with CD55 and CD59 expression on peripheral blood cells from SLE and healthy controls using flow cytometry.

3. Material and methods

Subjects

Twenty-three patients that fulfilled at least four of the American College of Rheumatology classification criteria (21) for SLE and 23 age-and sex-matched healthy controls with no history of autoimmune diseases were included in the present study. These patients were seen during their routine follow-up visits in the SLE clinics of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The exclusion criteria were concomitant presence of leukaemia, primary lymphoproliferative diseases, overlap with an autoimmune disease other than Sjögren's syndrome, and refusal to consent. Peripheral blood samples were collected in Na-EDTA Vacutainer tubes, and all SLE patients were receiving an

immunosuppressive drug at the time of blood collection. Lymphopenia was defined as <1500 cells/ μL , anaemia was defined as the reduction of hemoglobin below 12.0 g/dL, and thrombocytopenia was defined as the reduction of platelets below 200.000/ μL .

This study was performed with approval of the ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and all subjects were informed about the objectives and procedures of the study and gave their written informed consent.

Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 membrane in leukocytes

For red cell staining, 100 μL of whole blood was placed into polystyrene tubes (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Diego, CA, USA) and was subjected to two-colour staining with 3 μL /test of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD55FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil) and CD59PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). After 20 min incubation at room temperature, samples were re-suspended in 0.5 mL of phosphate buffered saline (PBS); and cells were analysed on the cytometer.

For leukocyte staining, 100 μL of whole blood (with an optimal dilution to achieve 10000 cells/ μL) was placed into polystyrene tubes and was subjected to two-colour staining with 3 μL of each antibody of fluorochrome-conjugated MoAbs against CD55FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil), CD59PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD14PE and anti-CD45FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil). After 15 min incubation at room temperature,

1.0 ml of FACSlyse (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was added and lysis was allowed for 10 min at room temperature. Samples were washed once and re-suspended in 0.5 mL of PBS..

Cells were analysed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Membrane intensity of CD55 and CD59, which is proportional to the number of CD55 and CD59 epitopes on the membrane, was estimated in the gated subpopulations by one-parameter histograms and the relative mean fluorescence intensity (MFI) was recorded. The negative expression of CD55 (CD55-) and CD59 (CD59-) was defined when cells in the gated subpopulations had FITC and PE fluorescence lower than 10^1 .

Statistics

Data were compared using Mann–Whitney U-test, Fisher's exact test, Student t-test and Spearman correlation coefficient when appropriate. The level of statistical significance was established at $P < 0.05$. The sample size calculation was based on the comparison of MFI and the proportion of positive cells from SLE patients versus healthy controls. Assuming a difference of more than 1SD (standard deviation) for the means, 23 patients per group ($\alpha = 0.05$, two-sided test) were necessary to detect a difference between the groups, with a 90% statistical power.

4. Results

The description of the 23 patients and 23 healthy controls is summarized on Table 1. Eleven of the 23 SLE patients (47,8%) had lymphopenia (lymphocytes <1500 cells/uL); and seven of the 23 SLE patients (30,4%) had anaemia (hemoglobin <12.0 g/dL), five of the 23 SLE patients (21,7%) had thrombocytopenia (platelets <200.000/uL) and one of the 23 SLE patients (4,3%) showed granulopenia (granulocytes <1500/uL).

Table 1. Description of SLE patients and healthy controls

Group	SLE patient (n=23)	Healthy control (n=23)
Age (year)		
Median	35	36
(25-75 percentiles)	(19-52)	(22-52)
Sex		
(M:F)	1:22	1:22
Disease duration		
Median	8	----
(25-75 percentiles)	(1.5-14.5)	----
SLEDAI* (index)		
Median	4	----
(25-75 percentiles)	(0-16)	----
Disease manifestations		
n (%)		
- Cutaneous	15 (65.2%)	----
- Kidney disease	10 (43.5%)	
- Arthritis	18 (78.3%)	
- Haematological	13 (56.5%)	
- Serositis	4 (17.4%)	

* SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

To evaluate the proportion of CD55+ and CD59+ cells and the membrane intensity of CD59 and CD55 expression in SLE patients and healthy controls, CellQuest software was used and the histograms of resultant analysis were obtained as shown in the representative graph (Figure 1).

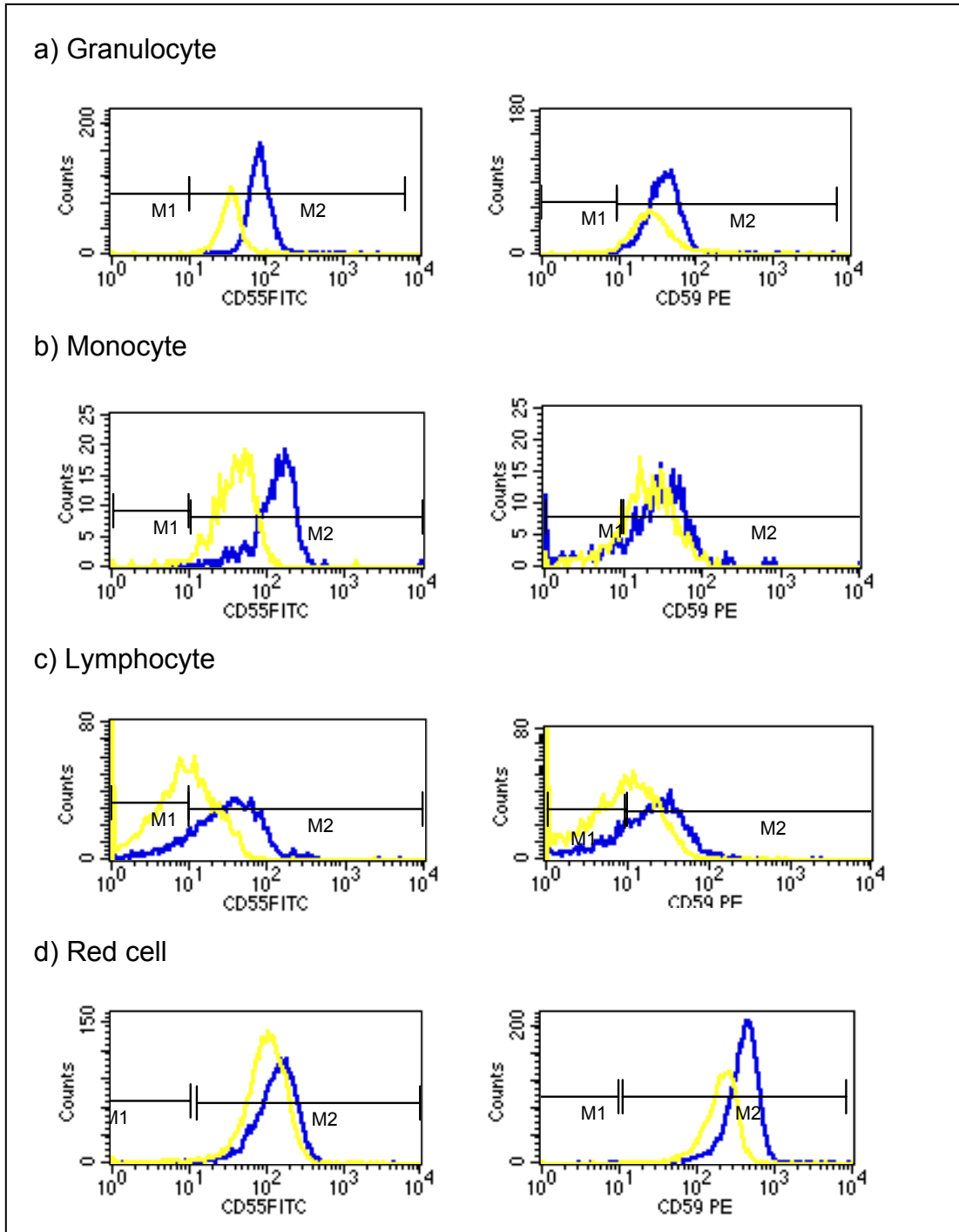


Figure 1. Typical patterns of histogram MFI CD55FITC and CD59PE expressions on specific peripheral blood cells versus counted cells from a control (black line) and SLE patient (grey line).

Red cell analyses

The proportion of CD55+ (97.88%) and CD59+ (98.84%) red cells from SLE patients showed no significant differences with controls (96.83% and 99.90%, respectively); (Table 2). Nevertheless, the MFI of CD55 on SLE red cells was significantly reduced when compared to the expression on red cells from controls (124.27 versus 181.90), ($p < 0.001$) (Table 3). This reduction was observed both in anemic (7/23) and non-anemic patients; and in both SLE AIHA (6/23) and SLE patients with no AIHA. The MFI of CD59 on red cells showed no significant differences between the groups (Table 3). There was no association of the CD55 and CD59 expression on red cells and the SLEDAI scores.

Lymphocyte analyses

In SLE patients, the proportions of CD55+ (72.71%) and CD59+ (63.96%) lymphocytes were significantly lower than that of healthy controls (85.86% and 73.49%, $p = 0.005$ and $p = 0.019$, respectively) (Table 2). Patients with lymphopenia (11/23) had a significantly lower proportion of CD55+ and

CD59+ lymphocyte when compared to respective controls ($p= 0.022$ and $p= 0.029$, respectively), while the non-lymphopenic patients had no difference ($p=0.090$ and $p=0.180$), (data not shown). Otherwise the CD55 and CD59 MFI on lymphocytes showed no significant differences between SLE and controls; as shown in the Table 3. There was no association of the CD55 and CD59 expression and SLEDAI scores.

Granulocyte and Monocyte analyses

The proportion of CD59+ granulocytes in the SLE patients (94.5%) was significantly reduced compared to controls (97.26%) ($p=0.045$). There was an inverse correlation between the proportion of CD59+ granulocytes and the SLEDAI scores ($r=-0.48$, $p=0.028$), in which a lower proportion of CD59+ granulocytes was shown in patients with higher disease activity. The CD55 MFI was also significantly reduced on granulocytes when compared to the expression from controls ($p=0.044$). In the single SLE patient with granulopenia a reduced proportion of CD59 on the granulocytes was found (76,74%) when compared to respective control (99,98%), and that result was 8 standard deviations below the mean of the controls (97,27%).

The proportion of CD55+ and CD59+ monocytes and the MFI of CD55 and CD59 expression showed no significant differences between the groups.

Table 2. Proportion (mean percentage) of CD55+ and CD59+ cells (FITC and PE fluorescence lower than 10^1) in SLE patients and controls.

	Blood Cell	SLE patient (n=23)	Controls (n=23)	Sig. (2-tailed)
CD55+ (%)	red cell	97.88	96.83	p=0.243
	lymphocyte	72.71	85.86	p=0.005*
	granulocyte	99.01	99.93	p=0.827
	monocyte	98.98	99.69	p=0.167
CD59+ (%)	red cell	98.84	99.90	p=0.089
	lymphocyte	63.96	73.49	p=0.019*
	granulocyte	94.50	97.26	p=0.045*
	monocyte	90.22	90.72	p=0.806

* significant statistical difference (p<0.05)

Table 3. The mean of membrane fluorescence intensity (MFI) of CD55 and CD59 on the blood cells of SLE patients and controls.

	Blood Cell	SLE patient (n=23)	Controls (n=23)	Sig. (2-tailed)
CD55 (MFI)	red cell	124.27	181.90	p<0.001*
	lymphocyte	40.72	42.04	p=0.844
	granulocyte	66,10	83,95	p=0.044*
	monocyte	122.95	125.45	p=0.866
CD59 (MFI)	red cell	291.72	393.45	p=0.671
	lymphocyte	18.13	19.50	p=0.694
	granulocyte	29.50	34.72	p=0.338
	monocyte	32.77	33.09	p=0.941

* significant statistical difference (p<0.05)

There was no correlation between the use of glucocorticoids or immunosuppressors with CD55 and CD59 expression on the different cell types, (data not shown).

5. Discussion

In autoimmune diseases like SLE, the complement system produces tissue damage because it is activated under non-specific conditions, inducing various pro-inflammatory mechanisms, including the generation of chemotactic factors and complement-mediated cell lysis (22). Host cells present a family of complement regulatory proteins which appear to act in consort to protect host tissues from autologous complement mediated damage, among them are CD55 and CD59 proteins. Their deficiency leads to complement-mediated hemolytic processes such as those seen in PNH (Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria) (23).

This study was set out to examine the pattern of expression of the Creg proteins CD55 and CD59 in SLE and healthy control blood samples. The MFI of CD55 on SLE patient red cells was significantly reduced when compared to the expression of controls, but this deficiency does not seem to be associated with anaemia or with AIHA in these patients, since the non-anaemic and no-AIHA patients also demonstrated reduced CD55 MFI on the red cells. It was also found that the proportion of CD55+ and CD59+ red cells in SLE patients

showed no significant differences compared to controls and this has not been previously studied.

Richaud-Patin et al evaluated the MFI of CD55 and CD59 on red cells from patients with AIHA, they found a diminished expression of CD55 and CD59 on red cells from several SLE patients with secondary AIHA (15). However, SLE patients with no AIHA exhibited a normal expression of these molecules. They hypothesized that the diminished expression of these proteins on red cells in these patients might be due either to the impaired synthesis of the GPI anchor, or to the abnormal coupling of the protein to the membrane on red blood cell precursors. However our data do not support that there is a constitutive impaired synthesis of the GPI anchor, since in that case, CD55 and CD59 would be uniformly reduced on all other blood cells, and different patterns of diminished expression depending on each cell type were observed. Moreover, monocyte CD14 expression, marker that is also GPI-anchored membrane protein, was not reduced on the SLE blood cells (data not shown). Therefore, further studies are needed to address the possible causes of this deficiency.

We observed a diminished CD55 MFI on red cells in SLE patients with (4/23) and without nephritis (Type IV), (data not shown). In contrast with our results, Arora et al (20) analyzed fifteen diffuse proliferative glomerulonephritis (DPGN) SLE patients and found that the expression of CD55 and CD59 was increased on both erythrocytes and the glomeruli of these patients, suggesting a protective response against complement-mediated injury in patients with severe disease. Supporting the notion of a protective role, Daf-1 (CD55) knockout mice were demonstrated to develop more severe glomerulonephritis

than similarly treated wild-type mice, and there was an increased C3 deposition in the glomeruli, suggesting that deficiency of Daf-1 led to increased complement activation in the glomeruli (24).

In this study, the CD55 and CD59 MFI on the lymphocyte showed no significant differences between SLE and controls. In 2006, Garcia-Valladares (16) investigated the MFI of CD55 and CD59 in T and B lymphocytes from SLE patients with lymphopenia. Both T and B cells from lymphopenic patients showed decreased membrane expression of CD55 and CD59 when compared to controls. These differences were unrelated to disease activity or therapy. Another interesting observation was that lymphocytes from non-lymphopenic SLE patients had increased expression of both molecules when compared to controls. They concluded that the altered expression of CD55 and CD59 seems to be associated to the disease manifestation.

In our study it was found that the proportion of CD55+ and CD59+ lymphocytes in SLE patients was significantly reduced compared to controls. This decrease of CD55+ and CD59+ lymphocytes was associated with lymphopenia in SLE patients and we do not find any [other](#) report [on](#) the literature. The reason by which these Creg are not expressed in more lymphocytes from SLE patients, and the possible correlation with lymphopenia need to be further explored.

Tsunoda et al (25) suggested that decreased expression of SLE patients CD59 antigen on activated CD8+ T cells may be correlated with disease activity and may be involved in induced apoptosis of these cells. Anti-lymphocyte antibodies are believed to be responsible for the decreased cell numbers,

probably through antibody-dependent cellular cytotoxicity, opsonization, surface receptor-blockade, and apoptosis. Complement-mediated lysis is perhaps the most plausible explanation by which antibodies against lymphocyte self antigens cause cellular depletion (19).

To the authors' knowledge this is the first study to investigate the proportion of CD55+ and CD59+ granulocytes and monocytes in SLE patients. The new finding of this study was that the proportion of granulocytes with CD59 expression (but not of CD55) in SLE patients was significantly reduced compared to the expression on granulocytes from controls and this was associated with disease activity measured by the SLEDAI. Moreover, the CD55 MFI (but not of CD59) on the granulocytes was decreased when compared to the controls. On the other hand, the proportion of monocytes with positive CD55 and CD59 expression and the MFI showed no significant differences between the groups.

In this study it was evident that there are differences in the patterns of expression of CD55 and CD59 on the peripheral blood cells from SLE patients, because the diminished MFI expression or a decreased proportion of CD55+ and CD59+ cells were not found on all blood cells of the same patient. In SLE patients with lymphopenia a higher proportion of CD55- or CD59- lymphocytes were found, but the MFI of these proteins showed similar expression. These results suggest there was a difference in the CD55 and CD59 expression pattern on the cells of SLE patients, and it may play a role in the pathophysiology of cytopenia in SLE patients. More studies involving a larger

number of patients are needed to confirm these results and to study the possible mechanisms involved.

6. Reference

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(14):1058-66.
2. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(15):1140-4.
3. Song H, He C, Knaak C, Guthridge JM, Holers VM, Tomlinson S. Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation. *J Clin Invest* 2003;111(12):1875-85.
4. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 2006;176(3):1305-10.
5. Morgan BP. The complement system: an overview. *Methods Mol Biol* 2000;150:1-13.
6. Kawano M, Seya T, Koni I, Mabuchi H. Elevated serum levels of soluble membrane cofactor protein (CD46, MCP) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):542-6.
7. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol* 2007;44(1-3):73-81.
8. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology* 2006;119(4):522-8.
9. Sleasman JW. The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease. *Adv Dent Res* 1996;10(1):57-61.

10. Alahlahi A, Wordsworth P, Wojnarowska F. Activation/inactivation of the classical pathway of complement in non-lesional skin of patients with systemic lupus erythematosus. *J Cutan Pathol* 2005;32(8):537-40.
11. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002;13(2):119-25.
12. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369(9561):587-96.
13. Tsokos GC, Liossis SN. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* 1999;20(3):119-24.
14. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34(2):501-37.
15. Richaud-Patin Y, Perez-Romano B, Carrillo-Maravilla E, Rodriguez AB, Simon AJ, Cabiedes J, et al. Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2003;88(2):95-9.
16. Garcia-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jakez-Ocampo J, Soto-Vega E, Elias-Lopez D, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus* 2006;15(9):600-5.
17. Vila LM, Alarcon GS, McGwin G, Jr., Bastian HM, Fessler BJ, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort, XXXVII: association of lymphopenia with clinical manifestations, serologic abnormalities, disease activity, and damage accrual. *Arthritis Rheum* 2006;55(5):799-806.

18. Giannouli S, Voulgarelis M, Ziakas PD, Tzioufas AG. Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. *Ann Rheum Dis* 2006;65(2):144-8.
19. Winfield JB, Fernsten PD, Czyzyk JK. Anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1997;108:127-35.
20. Arora M, Arora R, Tiwari SC, Das N, Srivastava LM. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis. *Lupus* 2000;9(2):127-31.
21. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
22. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1265-75.
23. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455(2-3):269-86.
24. Sogabe H, Nangaku M, Ishibashi Y, Wada T, Fujita T, Sun X, et al. Increased susceptibility of decay-accelerating factor deficient mice to anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Immunol* 2001;167(5):2791-7.
25. Tsunoda S, Kawano M, Koni I, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T, et al. Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2000;51(3):293-9.

Considerações Finais

As proteínas CD55 e CD59 são os principais inibidores do complemento presente na membrana das células do nosso organismo. Nosso estudo demonstrou que, em geral, pacientes com LES possuem diminuição da expressão destas proteínas nas células do sangue periférico; contudo, a deficiência não ocorre de maneira igual em todas as células do mesmo paciente. Pacientes que possuem, por exemplo, diminuição de expressão de CD55 nos linfócitos, muitas vezes não a apresentam nos eritrócitos, monócitos, granulócitos. Da mesma maneira, esta diminuição pode ocorrer no nível de quantidade de epítomos da molécula na membrana celular (FMI – fluorescence membrane intensity, densidade de fluorescência da molécula na membrana celular), ou por uma maior quantidade de células que não expressam esta molécula (a célula é negativa para o marcador).

Neste mesmo estudo, também foi demonstrado que aparentemente a diminuição de expressão de CD55 nos eritrócitos não parece ser a causa direta de anemia, pois mesmo os pacientes com LES que não apresentaram anemia possuíam diminuição de expressão destas proteínas nos seus eritrócitos. Por outro lado, pacientes LES com linfopenia apresentaram uma forte associação com a quantidade de células CD55 e CD59 negativas, enquanto que os não linfopênicos não apresentaram esta deficiência.

Para o melhor conhecimento da causa da deficiência destes marcadores de membrana e para avaliar a possibilidade destas alterações serem as possíveis causa das citopenias geralmente encontradas no LES, são

necessários estudos em populações maiores, estudos genéticos (alteração dos genes que codificam estas proteínas ou expressão dos respectivos RNAs mensageiros), pesquisa de anticorpos anti-CD55 e anti-CD59 nas células destes pacientes e se a expressão destas proteínas está correlacionada à ativação celular.

Anexo 1

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone 2101-8304.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Perfil de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em doadores voluntário do banco de sangue do HCPA e em pacientes com Lupus Eritrematoso Sistêmico.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Telefone para contato: (51) 2101-8315

O objetivo do estudo

Comparar as estruturas celulares de pacientes com Lúpus e pacientes sem Lúpus. Essa informação pode ser bastante importante para o cuidado dos pacientes com Lúpus. Em primeiro lugar, se poderiam identificar pacientes com maior risco de desenvolver certas complicações da doença, como anemia,

permitindo a tomada de medidas preventivas ou tratamento em fases bem iniciais. Essa informação também pode ter impacto na escolha de medicações que sejam mais apropriadas para cada paciente.

Vantagens em participar do estudo

Não podemos assegurar que você se beneficie diretamente com o estudo. Entretanto, as informações obtidas neste estudo poderão contribuir maior conhecimento sobre a doença.

Procedimentos

Os pesquisadores poderão buscar uma série de informações sobre a sua doença no seu prontuário do hospital. A sua concordância em participar desse estudo inclui a permissão para buscar essas informações. Em relação à coleta de sangue, não haverá uma coleta especial para o estudo, pois será utilizada uma pequena parte da sua amostra de sangue (que restar) quando o seu médico solicitar seus exames laboratoriais como parte de seu acompanhamento no hospital. Além desta coleta, não será feito nenhum outro procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida.

Você poderá ter todas as informações que desejar e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento e acompanhamento ambulatorial, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese nenhuma.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, n.º de prontuário _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Perfil de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em doadores voluntário do banco de sangue do HCPA e em pacientes com Lupus Eritrematoso Sistêmico”. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu **consentimento** a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Porto Alegre ___ de _____ de 200_.

Nome e Assinatura do paciente ou responsável:

Nome e Assinatura do pesquisador:
