

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

AMANDA KIRCHNER PICCOLI

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO
COMPLEMENTO CD55/CD59/CD35/CD46 EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATÓIDE**

Porto Alegre, 2011

AMANDA KIRCHNER PICCOLI

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO
COMPLEMENTO CD55/CD59/CD35/CD46 EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito final da obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Porto Alegre, 2011

1. P591E PICCOLI, AMANDA KIRCHNER

Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com artrite reumatóide / Piccoli ; orient. Ricardo Machado Xavier. – 2011.

71 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Artrite reumatóide 2. Proteínas do sistema de complemento 3. Antígenos CD55 4. Antígenos CD59 5. Antígenos CD46 6. Receptores do complemento 3b I. Xavier, Ricardo Machado II. Título.

NLM: WE 346

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Aos **meus pais** por seus exemplos, e em especial para **Gregório**, pela compreensão, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Ricardo Machado Xavier** pela orientação e confiança no meu trabalho. Agradeço também a sua acolhida e dedicação em momentos decisivos para realização deste.

À amiga e colega **Ana Paula Alegretti**, pelo carinho, apoio e valiosa colaboração científica imprescindível para a realização deste.

À amiga **Priscila Schmidt Lora** pela amizade, companheirismo e auxílio com a análise estatística deste trabalho.

À acadêmica de Biomedicina, **Laiana Schneider** pelo seu empenho e trabalho.

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

As acadêmicas de medicina, **Laura Corso Cavalheiro e Priscilla Martinelli** pela dedicação na busca de dados clínicos dos pacientes.

Ao meu amigo **Felipe Carvalho**, pela edição nos histogramas do citômetro de fluxo.

A minha irmã **Rafaela** pelo auxílio durante a realização deste.

Aos **meus pais** pelos valores ensinados, pelo afeto, apoio, carinho e compreensão de sempre.

Ao meu marido **Gregório** por seu carinho, compreensão e indispensável estímulo nos momentos difíceis e na conclusão desta dissertação.

“Ninguém é digno do oásis se não aprender a atravessar o deserto”.

Augusto Cury

RESUMO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença autoimune associada a poliartropatia inflamatória que acomete principalmente as articulações periféricas. Cerca de 1% da população mundial é afetada, sendo duas a três vezes mais prevalente em mulheres. Apresenta uma patogênese complexa e multifatorial. A sinóvia das articulações afetadas é infiltrada por linfócitos T e B, macrófagos e granulócitos. A sinóvia reumatóide adquire características proliferativas, formando o *pannus*, e invade a cartilagem articular e o osso, levando à destruição da arquitetura normal da articulação e perda de função. Em vários modelos de doenças autoimunes, a ausência ou diminuição da expressão de proteínas reguladoras do complemento tem sido observada, associada com o agravamento dos sintomas clínicos, sendo que, muitos destes casos, a superativação do sistema complemento pode ser a causa da exacerbação da doença. O presente artigo tem por objetivo revisar os principais aspectos relacionados à regulação do sistema complemento na artrite reumatóide, a fim de propiciar uma melhor compreensão do potencial papel desse sistema na fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide, Sistema Complemento e Proteínas Reguladoras do Complemento.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease associated with polyarticular inflammatory synovitis that affects mainly the peripheral joints. About 1% of the world population is affected, and it is two to three times more prevalent in women. RA has a complex and multifactorial pathogenesis. The rheumatoid synovium acquires proliferative characteristics, forming the pannus, and invades cartilage and bone, leading to the destruction of normal architecture and loss of function. In several models of autoimmune diseases, the absence or decreased expression of complement regulatory proteins has been observed, associated with worsening of the clinical symptoms, and many of these cases the over-activation of the complement system is the cause of disease exacerbation. This article aims to review the main aspects related to regulation of the complement system in rheumatoid arthritis in order to provide a better understanding of the potential role of this system in the pathophysiology of the disease.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, Complement System, Complement Regulatory Protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Esquema da articulação normal e na artrite reumatóide (Adaptado de Smolen, 2003).....17
- Figura 2** - Esquema das vias de ativação do sistema complemento e suas proteínas inibitórias. Adaptado de (Okroj, 2007).....18
- Figura 3** - Esquema das possíveis contribuições do sistema complemento no desenvolvimento da AR na articulação. (Adaptado de Okroj, 2007).....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais funções inibidoras das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR - Colégio Americano de Reumatologia

AHAI - Anemia Hemolítica Autoimune

AR - Artrite Reumatóide

CAA - Célula Apresentadora de Antígeno

CC - Cascata do Complemento

CD35 - Receptor do Complemento tipo - 1

CD46 - Proteína Cofator de Membrana

CD55 - Fator Acelerador de Degradação

CD59 - Inibidor da Lise de Membrana ou Protectina

CF - Citometria de Fluxo

CR - Receptor do Complemento

DAS28 - Escore da atividade da doença 28

EM - Esclerose Múltipla

EULAR – Liga Européia de Combate ao Reumatismo

FHA - fitohemaglutinina

FR - Fator Reumatóide

GPD - Glomerulonefrite Proliferativa Difusa

GPI – Glicofosfatidilinositol

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HLA-DR - Antígeno Leucocitário Humano - DR

HPN - Hemoglobinúria Paroxística Noturna

IC - Imunocomplexos

IFN- γ - Interferon – γ

Ig – Imunoglobulina

IgA – Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IL-10 – Interleucina -10

kDa - kilo Daltons

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

LPS - lipopolissacarídeos

LS - Líquido Sinovial

MAC - Complexo de Ataque à Membrana

MBL - Lectina Ligadora de Manose

MFI - Intensidade Média de Fluorescência

MHC - complexo de histocompatibilidade maior

NK - Natural Killers ou matadoras naturais

PIG-A - Fosfatidilinositolglican-A

PRC - Proteínas Regulatórias do Complemento

RNA - receptores nicotínicos de acetilcolina

SC - Sistema Complemento

sCD35 - CD35 solúvel

sCD46 - CD46 solúvel

sCD59 - CD59 recombinante solúvel

sCD59-APT542 - derivado de CD59 membrana-alvo

SF - Sinoviócitos tipo Fibroblastos

SMD - Síndrome Mielodisplásica

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - Sangue Periférico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1.	ARTRITE REUMATÓIDE	16
2.2.	SISTEMA COMPLEMENTO	18
2.2.1.	Ativação inicial do complemento	19
2.2.2.	C3 convertase e amplificação	19
2.2.3.	C5 convertase	20
2.2.4.	Formação do complexo de ataque à membrana	20
2.3.	PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55, CD59, CD46 E CD35	21
2.4.	PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO EM DOENÇAS AUTOIMUNES	26
2.5.	PAPEL DO COMPLEMENTO E DAS PROTEÍNAS CD55/CD59/CD46/CD35 NA ARTRITE REUMATÓIDE (AR)	29
3.	CONCLUSÃO	34
4.	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	35
5.	OBJETIVOS	36
6.	REFERÊNCIAS	37
7.	ARTIGO CIENTÍFICO: "Expression of CD55, CD59, CD46 and CD35 in peripheral blood cells from Rheumatoid Arthritis patients"	47
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
9.	ANEXOS	68

2. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica das articulações com alterações na resposta imunológica, com presença de uma ampla variedade de anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo. É associada à sinovite poliarticular inflamatória persistente, e como resultado, a articulação torna-se inflamada, deformada e instável. Tanto a cartilagem como o osso são afetados, com consequente destruição da arquitetura normal e perda de função.

Há uma forte evidência que ativação descontrolada do complemento esteja envolvida no desenvolvimento e/ou aumento da artrite. Com base nos dados disponíveis, o consumo acelerado e uma resposta de hiperprodução de componentes do complemento são vistos no líquido sinovial de pacientes com AR. Desta forma, proteínas que regulam o complemento desempenham importante papel no controle de sua ativação.

O sistema complemento é uma parte da imunidade inata capaz de remover patógenos invasores do organismo humano, sem exposição prévia; contudo, a ativação exacerbada do complemento contribui para o processo patológico de inúmeras doenças inflamatórias e autoimunes, como AR. Esta ativação leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) das próprias células do organismo e a uma formação excessiva de mediadores da inflamação.

As proteínas de membrana celular CD55, CD59, CD35 e CD46 são proteínas responsáveis pela regulação da ação do complemento nas células. A prevalência de alteração de expressão destas proteínas reguladoras do complemento (PRC) não está elucidada ainda na literatura, principalmente em pacientes com AR.

O projeto de pesquisa que originou este trabalho foi inicialmente desenvolvido devido aos achados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico. Com o desenvolver do projeto, buscou-se novas patologias que poderiam estar associadas às alterações destas proteínas reguladoras do complemento nas membranas celulares. Nesta ocasião, foram encontrados poucos estudos em pacientes com AR, que

motivaram a realização deste trabalho; além do desenvolvimento de outro projeto incluindo pacientes com AR tratados com Rituximabe – que recentemente passou a ser utilizado em alguns pacientes. 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 [(Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)]. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do HCPA, sob o número 07-169.

3. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ARTRITE REUMATÓIDE

A AR é uma doença crônica de caráter inflamatório que acomete, predominantemente, articulações diartrodiais e estruturas periarticulares, podendo adquirir caráter sistêmico. A AR acomete cerca de 1% da população mundial, afetando duas a três vezes mais frequentemente as mulheres [1].

A etiologia da doença não é ainda completamente esclarecida. Entretanto, sabe-se que fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento da AR. Nos estágios precoces da doença, há proliferação e edema das células na camada sinovial, com infiltração de células B e T, macrófagos e granulócitos. A sinóvia torna-se densa, tornando a articulação edemaciada e dolorosa. Com a progressão, a proliferação sinovial leva à formação do *pannus*, tecido com características invasivas da cartilagem articular e do osso [2]. A destruição da articulação é irreversível. Osteoclastos reabsorvem o osso, há liberação de enzimas proteolíticas, como metaloproteinases, agrecanases e catepsinas, responsáveis pela destruição de constituintes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos do osso e cartilagem [3]. A neovascularização da camada sinovial circundante à articulação e do *pannus* é evidente [4]. Como resultado, a cartilagem e o osso perdem sua arquitetura normal e função, tornando a articulação deformada, instável, dolorosa e inflamada (Figura 1) [5].

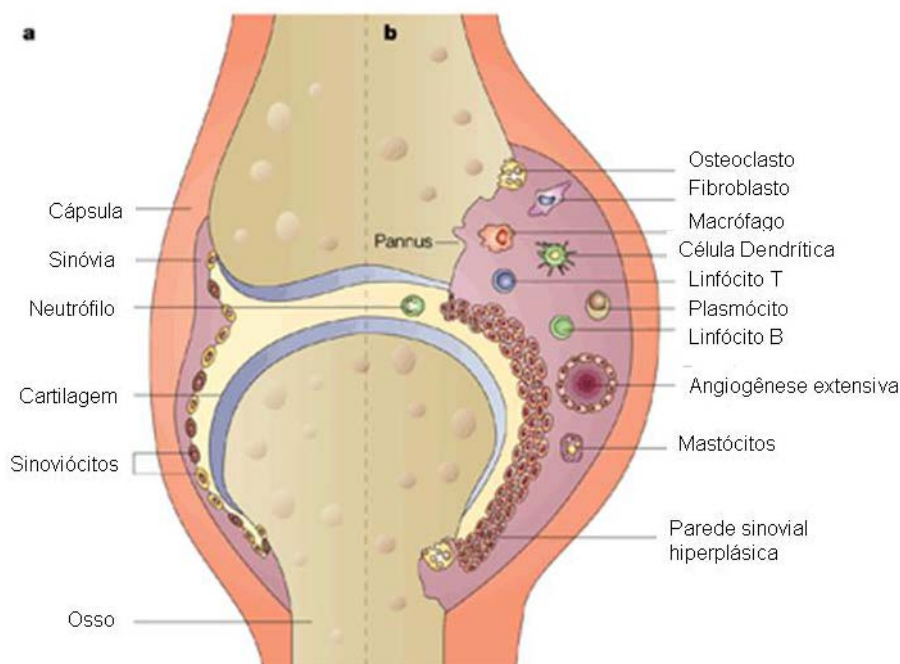


Figura 1: Esquema da articulação normal (a) e na artrite reumatóide (b), (Adaptado de Smolen, 2003) [6].

A hiperplasia sinovial é uma característica marcante destes pacientes, com membranas proeminentes, projeções de vilosidades na sinóvia e edema tecidual [7]. A presença de autoanticorpos como fator reumatóide (FR) e o anticorpo contra proteínas citrulinadas no soro dos pacientes com AR é uma das características do efeito sistêmico desta doença.

Certos genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) estão associados à predisposição para AR. A terceira região hipervariável da cadeia DR beta, especialmente a sequência dos aminoácidos entre as posições 70 a 74, tem sido associada à doença. Esta sequência de aminoácidos é conhecida como epítipo de susceptibilidade ou epítipo reumatóide e é encontrada nos múltiplos genes HLA-DR associados com a doença, incluindo diversos genes HLA-DR4, DR14, e DR1 [8, 9].

Tradicionalmente, o diagnóstico da AR baseia-se na presença de pelo menos 4 de 7 critérios definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) [10]. Estes critérios incluem a presença de rigidez matinal prolongada, artrite de três ou mais articulações, artrite simétrica, artrite das articulações das

mãos, nódulo reumatóide presente, FR positivo e alterações radiográficas. Embora estes critérios auxiliem no diagnóstico, cada caso deve ser analisado individualmente [11]. Mais recentemente, com objetivo de se permitir a identificação da doença em estágios mais precoces, novos critérios foram propostos por uma comissão conjunta do ACR e da Liga Européia de Combate ao Reumatismo (EULAR) [12].

2.2. SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC) é composto por receptores e reguladores ligados à membrana celular e diversas proteínas plasmáticas que interagem com várias células e mediadores do sistema imune (figura 2). Compreende mais de 30 proteínas que agem em sinergia para promover inflamação e dano direto a células, a microrganismos e a tecidos identificados como anormais por um anticorpo específico [13]. A maioria das proteínas são sintetizadas no fígado, entretanto células mielóides, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais podem produzi-las [14, 15].

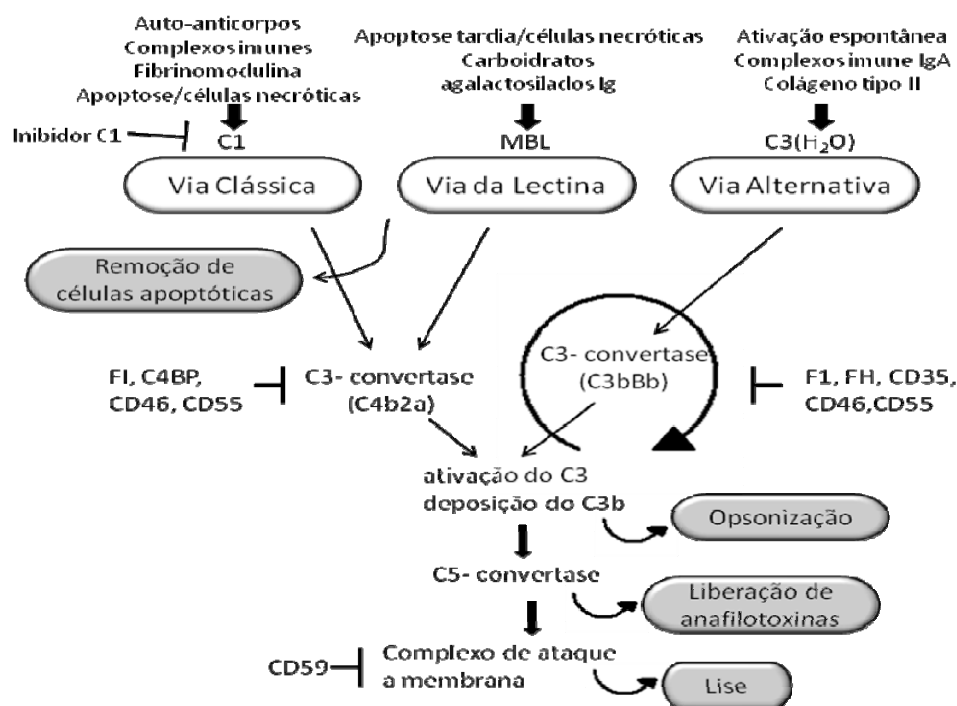


Figura 2 - Esquema das vias de ativação do sistema complemento e suas proteínas inibitórias. Adaptado de (Okroj, 2007) [1]

As funções do sistema complemento são essenciais e centrais para a resposta imune inata, bem como para conexão da imunidade inata com a adaptativa [16]. O complemento é visto como um sistema que orchestra e conecta várias respostas durante reações imunes e inflamatórias, e não apenas como um sistema bactericida, como considerado anteriormente [17, 18].

A cascata do complemento (CC) pode ser dividida em 4 fases principais: ativação inicial do complemento; ativação e amplificação da C3 convertase; ativação da C5 convertase; e formação do MAC. Uma vez ativada, a CC gera moléculas efetoras que interagem com receptores celulares de uma maneira indiscriminada. Entretanto a progressão da cascata é regulada por múltiplas moléculas reguladoras e inibidoras em todos os níveis da cascata [19].

2.2.1. Ativação inicial do complemento

O complemento é ativado por 3 diferentes vias. A via alternativa é espontaneamente e constantemente ativada na membrana celular, no plasma e em outros fluídos. A via clássica é desencadeada por um anticorpo ligado ao antígeno alvo. A via da lectina é iniciada através da ligação da lectina ligadora de manose (MBL - mannose-binding lectin), um componente solúvel do organismo, com carboidratos presentes na superfície do microrganismo alvo. Huber-Lang e cols, em 2006, relataram uma via adicional de ativação do complemento independente da ação da C3, mediada pela ação da trombina sobre a C5 convertase [20]. Outras rotas de ativação do complemento ocorrem através de proteases, como a plasmina, a calicreina plasmática e a elastase, que clivam e ativam C3 [18]. A ativação de cada uma destas vias resulta na primeira enzima da cascata, a C3 convertase.

2.2.2. C3 convertase e amplificação

A C3 convertase cliva o componente central do complemento C3 em C3a, um peptídeo anafilático e antimicrobiano, e na opsonina C3b. Nas vias clássica e da lectina, a C3 convertase é formada por um fragmento de C4b e C2a (C4b2a), ao passo que na via alternativa, o C3b e fator Bb fazem parte

desta enzima (C3bBb) [18]. A clivagem é seguida por uma reação de amplificação que gera convertases de C3 adicionais, levando ao depósito de mais C3b nas proximidades do local onde são geradas [18]. Os fragmentos de C3b revestem superfícies microbianas ou de restos celulares em apoptose e marcam essas partículas para rápida fagocitose. Na superfície de membrana das células próprias intactas, sob condições normais, o depósito de C3b é prevenido pelas proteínas reguladoras do complemento, impedindo a progressão da cascata. Subsequentemente, o C3b é inativado e degradado. Seus produtos de degradação intermedeiam outras importantes funções efetoras [17-19].

2.2.3. C5 convertase

Se a ativação progride, uma nova enzima, a C5 convertase (C4b2a3b para as vias clássica e da lectina e C3bBbC3b – para a via alternativa) é gerada. Esta enzima cliva C5, liberando o poderoso peptídeo anafilático C5a e o fragmento indutor da fase terminal, C5b [18, 19].

2.2.4. Formação do complexo de ataque à membrana

O C5b recruta os componentes C6, C7, C8 e C9 para a superfície alvo. A mudança de conformação destas proteínas solúveis e hidrofílicas e a sua agregação induzem a formação de um complexo, onde a unidade funcional é um poro inserido na bicamada fosfolipídica. Esse poro 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 lise celular [21]. Estudos recentes tem reportado funções adicionais ao MAC, incluindo atividade estimulatória sobre as células T helper e na ativação plaquetária [22-24].

Em uma reação inflamatória aguda o complemento atua em todas as fases: através da ativação de mediadores pró-inflamatórios, produção de peptídeos anafiláticos, componentes citolíticos e antimicrobianos, no recrutamento de células efetoras e na indução de respostas efetoras [25]. Apresenta ainda outras atividades biológicas no organismo como: opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de imunocomplexos (IC) e células

apoptóticas; ação como interface entre a imunidade inata e adaptativa. Participa ainda da angiogênese, mobilização de células progenitoras hematopoéticas, regeneração tecidual e no metabolismo de lipídeos. Estes efeitos ocorrem através da ligação dos produtos de ativação com receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células [18, 26-29].

A intensidade da resposta é moderada e auto-controlada, permitindo uma resposta imune inata apropriada, necessária para o reconhecimento e remoção dos agentes infecciosos e células próprias alteradas [30, 31]. Os aspectos benéficos dessa resposta moderada inclui: vigilância imunológica, remoção de debris celulares, regeneração de órgãos e neuroproteção [19]. Esta resposta moderada é fortemente regulada por substâncias solúveis ou ligadas à membrana celular, denominadas PRC [32].

2.3. PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55, CD59, CD46 E CD35

Para prevenir a injúria mediada pelo complemento, as células normais possuem mecanismos regulatórios constituídos por proteínas categorizadas em 2 grandes classes: solúveis nos líquidos biológicos, como a properdina e o fator H; e ancoradas à membrana celular, como o CD55 (ou Fator acelerador de degradação - DAF – Decay Accelerating Factor), o CD59 (ou Inibidor da lise de membrana ou protectina - MIRL – Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) [32], o CD46 (ou Proteína cofator de membrana - MCP – Membrane Cofactor Protein) e o CD35 (ou Receptor do complemento tipo 1 - CR1 – Complement Receptor type 1) (Tabela 1) [19, 33].

Tabela 1. Principais funções inibidoras das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD46/CD35:

<i>Proteína</i>	<i>Função regulatória do complemento</i>
CD55	Inibe a clivagem de C3 e C5 através da inibição da formação de novas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas.
CD59	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.
CD46	Liga-se as opsoninas C3b e C4b, agindo como um cofator na sua degradação proteolítica através da serino protease fator I.
CD35	Interage com o C3b e C4b para promover a fagocitose mediada por neutrófilos. Atua como cofator para inativar o C3b e C4b a iC3b e iC4b através do fator I. Auxilia na remoção de IC.

As proteínas reguladoras ancoradas à membrana celular controlam as 3 vias de ativação do complemento. Já os reguladores solúveis são mais específicos e controlam ou a via alternativa ou a via clássica ou a da lectina, agindo quase que exclusivamente sobre C3 ou C4. Nesta revisão abordaremos, exclusivamente, as proteínas reguladoras ancoradas à membrana celular.

O mecanismo de ação e a maneira como estas proteínas fixam-se na membrana celular são diferentes entre si. O CD55 inibe a clivagem de C3 e C5 através da inibição da formação de novas convertases de C3 e C5, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas [34]. A proteína CD59 interfere diretamente na estruturação do MAC através de sua incorporação física no complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8 [35]. Já o CD46 e CD35 atuam na inativação de C3b e C4b

[33, 36, 37]. O CD35 atua também, no processamento e limpeza dos IC [33, 37]

O CD55 é uma glicoproteína globular de peso molecular que varia entre 50 a 100 kDa, sendo expressa em diferentes tipos celulares, ancorada à membrana pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) [38]. É expressa em diferentes tipos celulares e encontrada sob forma solúvel na lágrima, saliva, urina, líquido sinovial, líquido e plasma [39]. Em adição a sua função de regulação do complemento, o CD55 atua como um modulador negativo da resposta da célula T [40, 41] e parece proteger as células contra a lise mediada por células matadoras naturais (células NK - natural killers) [42]. Na mucosa epitelial, o CD55 regula o movimento dos neutrófilos através das camadas do epitélio [43]. Atua ainda como um ligante de adesão intercelular, interagindo com CD97 nos leucócitos [44] e como um receptor para certos vírus e microorganismos [45, 46].

O CD59 é uma glicoproteína globular pequena de aproximadamente 20 kDa, ancorada a membrana pela GPI [32]. Pelo fato de desempenhar papel crucial na prevenção de danos as células próprias pela deposição inapropriada do MAC, esta proteína é amplamente expressa na maioria dos tecidos e em todas as células circulantes, como na sinóvia, nos eritrócitos e leucócitos [32, 47]. O papel do CD59 na regulação do complemento é bem definido. Entretanto, tem-se evidenciado propriedades de sinalização celular devido a sua localização dentro das camadas de lipídeos - centrais para a formação da sinapse imunológica - e a sua âncora de GPI [32]. O CD59 parece estar envolvido na adesão e ativação das células T [48], ativação de neutrófilos via tirosina quinase [49, 50], interação entre monócitos e células T [51] e na indução da morte celular [52]. Além do mais, Kimberley e cols [32] descreveram que para a proliferação das células B de camundongos é necessário uma interação do CD59 com um ligante desconhecido nas células B. Já Omidvar e cols [53], avaliando o significado do CD59 nas células-alvo na modulação da citotoxicidade, encontraram uma suscetibilidade aumentada das células-alvo que expressavam CD59 à lise mediada por células NK.

O MCP, ou CD46, é uma proteína transmembrana expressa em todas as células, exceto nos eritrócitos [33]. Sua função primordial é proteger as células autólogas do ataque do complemento, através da degradação de C3. O CD46 liga-se às opsoninas C3b e C4b, agindo como um cofator na sua degradação proteolítica através da serina-protease fator I [33, 36, 54, 55]. Além de seu papel na imunidade inata, o CD46 também regula a resposta imune adquirida. A co-estimulação de células T CD4+ com CD46 induz à proliferação destas células e a diferenciação a uma classe específica de células T reguladoras, chamadas de Tr1 [55-58] e caracterizadas pela expressão de Interferon - γ (IFN - γ), interleucina - 10 (IL - 10), granzima - B e outras moléculas [57, 59, 60].

Alterações nas moléculas de superfície durante a apoptose, pela perda de CD46 e CD59, permitem a morte celular devido a ativação do complemento e consequente opsonização por C3b e C4b, seguida pela fagocitose celular [19, 61, 62]. CD46 é um receptor para uma lista crescente de patógenos humanos, como o Herpes Vírus Humano 6, o vírus do sarampo, *Streptococcus pyogenes*, adenovírus e a bactéria patogênica *Neisseria sp* [56, 63-68]. A ubiquidade da expressão de superfície, a atividade regulatória e a sinalização celular contribuem para o CD46 ser alvo de múltiplos patógenos [36].

A formação e acúmulo de IC é um dos mecanismos imunes que ocorrem na AR e demais doenças autoimunes. Em condições fisiológicas estes complexos podem ser removidos da corrente sanguínea através de receptores do complemento (CR), como o CR1 ou CD35. O CD35 é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples de aproximadamente 200 kDa [69]. Interage com o C3b e C4b para promover a fagocitose mediada por neutrófilos e age como um cofator para inativar o C3b e C4b a iC3b e iC4b através do fator I [70, 71]. É expresso em diferentes tipos celulares, tais como eritrócitos, células mielóides e linfóides [72, 73]. Sua função biológica varia conforme a célula em que é expresso [74].

Nas células fagocíticas, o CD35 medeia a adesão e ingestão de partículas revestidas por C3b e C4b, enquanto nos linfócitos B e células dendríticas foliculares promove a localização e processamento do antígeno [73]. Em humanos, 90% do total de CD35 circulante é encontrado nos

eritrócitos, onde liga-se a microrganismos ou IC opsonizados por C3b ou C4b, processando e transportando-os, através de fagócitos, até o fígado e baço [74]. Microrganismos como *Leishmania*, micobactérias e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ao tornarem-se revestidos por C3b, utilizam o CD35 para entrar na célula hospedeira [75, 76]. Mais recentemente, o CD35 em eritrócitos não infectados por *Plasmodium falciparum* foram identificados como sendo receptores para os infectados [77]. O CD35 liga-se a adesina malárica major, levando ao fenômeno chamado de “rosetting” em que eritrócitos parasitados ligam-se aos não parasitados [78].

A relevância das PRC em humanos pode ser vista em estudos da desordem hemolítica adquirida, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN). Inicialmente, a HPN foi descrita como uma forma de anemia hemolítica associada à hemoglobinúria durante a noite [79]. Na HPN, mutações adquiridas na célula tronco hematopoética dão origem a uma linhagem de células com bloqueio precoce da síntese de âncoras de GPI - responsáveis por manter dezenas de proteínas com funções específicas, aderidas à membrana plasmática. A falência em sintetizar uma molécula madura de GPI gera ausência de todas as proteínas de superfície normalmente ancoradas por ela [80]. As mutações são do tipo deleções ou inserções no gene fosfatidilinositolglicana classe A (PIG-A) do cromossomo X [81]. Como resultado, eritrócitos e outras células sanguíneas derivadas destas células clonais, perdem o CD55 e CD59. Conseqüentemente, estas células tornam-se mais suscetíveis a lise mediada pelo complemento, resultando em hemoglobinúria, anemia e ocasionalmente, trombose [32]. Pacientes com deficiência isolada de CD55 não apresentam hemólise e eventos trombóticos, indicando a perda de CD59 como um fator-chave na patogênese da HPN [82, 83].

Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão as regulatórias do complemento, CD55, CD59 e CD46; e outras proteínas envolvidas na função imune [84, 85] - 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 a molécula de adesão celular CD24, nos linfócitos B e inúmeros tumores [86].

Há poucos relatos na literatura sobre o perfil de expressão normal dessas proteínas nas células sangüíneas. Em 2001, Oelschlaegel e cols [87] analisaram, por citometria de fluxo (CF) amostras de sangue de 52 doadores de sangue saudáveis e obtiveram um valor de referência de 3% de deficiência de CD55/CD59 nos eritrócitos e granulócitos normais. Christmas e cols relataram alterações nos níveis de expressão das proteínas regulatórias CD46, CD55 e CD59 em monócitos e subpopulações de linfócitos após ativação com fitohemaglutinina (FHA) e lipopolissacarídeos (LPS). Apenas os monócitos apresentaram uma elevação uniforme dos reguladores após ativação com FHA e, com exceção do CD46, usando os LPS. Estes dados reforçam o conceito de que a regulação da expressão destas proteínas regulatórias não é coordenada e nem uniforme nas diferentes subpopulações leucocitárias [88].

A deficiência isolada de CD55, CD46 e CD35 em humanos não é associada com hemólise intravascular ou com outra evidência de falha na regulação do complemento [83, 89, 90]. Contudo, a deficiência isolada de CD59 é associada a sinais e sintomas semelhantes à HPN, pelo fato do CD59 ser um inibidor mais efetivo do complemento, visto que bloqueia a formação do MAC [82].

2.4. PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO EM DOENÇAS AUTOIMUNES

Anticorpos produzidos nas doenças autoimunes ligam-se a antígenos de superfície celular ou formam IC após a ligação com antígenos circulantes. Estes IC tendem a se depositar em órgãos, com subsequente ativação do sistema complemento, causando dano aos tecidos [26]. Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos órgãos em doenças autoimunes, pouco se conhece sobre o mecanismo das PRC na modulação da gravidade desse dano [33].

Tem sido demonstrado o papel das PRC no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), uma doença autoimune sistêmica que acomete o tecido conjuntivo. Kawano e cols [91] demonstraram níveis elevados de CD46 no soro de pacientes com LES ativo. Uma possível fonte deste CD46 solúvel (sCD46) são linfócitos e outras células sanguíneas que expressam CD46 nas suas superfícies, pelo fato de estarem ativas nesta doença [91]. Estudos demonstram uma redução na intensidade de expressão de CD55 e CD59 na membrana de eritrócitos de pacientes lúpicos com anemia hemolítica autoimune (AHAI) [92, 93]. O mesmo foi observado nos linfócitos T e B dos pacientes com linfopenia quando comparados com os controles [94]. De maneira interessante, pacientes com LES não linfopênicos apresentaram uma maior intensidade dessas proteínas nos linfócitos em relação aos controles [94]. Miwa cols [95] 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 autoimune. Estes animais apresentaram linfadenopatia e esplenomegalia acentuada, maiores níveis de anticorpos anticromatina e dermatite mais grave do que os controles.

Arora cols [96] avaliaram a expressão de CD35, CD55 e CD59 em eritrócitos e células do glomérulo de pacientes com LES que apresentam glomerulonefrite proliferativa difusa (GPD); a expressão de CD35 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 CD35, característica do LES, e como uma tentativa da célula para se proteger contra a ação do complemento.

Várias hipóteses são vistas na literatura sobre a baixa expressão de CD35 nos eritrócitos. Estudos genéticos apontam para a perda adquirida desta molécula, possivelmente devido a sua síntese na medula óssea e/ou aumento do catabolismo intravascular [97-100]; entretanto, não há relação com a presença de autoanticorpos contra epítopos do CD35 [101]. Também tem sido

reportado baixos níveis desta molécula nos leucócitos [102-104]. Vale ressaltar que níveis elevados de CD35 solúvel (sCD35) são vistos em diferentes patologias devido a secreção direta ou clivagem proteolítica na superfície celular [105].

Com o objetivo de avaliar a apoptose in vitro nas doenças autoimunes, Tsunoda e cols [106] observaram uma expressão diminuída de CD59 nos linfócitos T CD8+, mas não em linfócitos T CD4+ e de forma predominante nas células T CD8+ ativadas expressando CD45RO+ e HLADR+, tanto nos pacientes com LES quanto nos pacientes com síndrome de Sjögren. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que células T CD8+CD59dim (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.

A esclerose múltipla (EM), uma desordem neurodegenerativa inflamatória crônica, possui etiologia ainda desconhecida, entretanto há fortes evidências da formação de autoanticorpos contra antígenos presentes na camada de mielina. A perda da mielina interfere na transmissão dos impulsos nervosos, provocando sintomas variados na EM [107]. Alguns experimentos com deficiência gênica de CD55 e CD59 [40, 108] em modelo de encefalomielite autoimune experimental (modelo animal para estudos de EM) tem demonstrado que esses animais apresentaram um grau mais grave da doença quando comparado aos controles. Mead e cols [109] também reportaram que camundongos deficientes de C6, incapazes de formar o MAC, não apresentaram dano de axônio nem desmielinização e as manifestações clínicas foram menos intensas.

A diferenciação das células Tr1 é defeituosa na EM devido à produção diminuída de IL-10, sugerindo uma possível desregulação na transdução de sinal a partir do receptor CD46 [110]. Adicionalmente, o CD46 nas células dendríticas mielóides obtidas de pacientes com EM induz a produção de interleucina-23 (IL-23) [111], responsável pela diferenciação e manutenção dos

linfócitos pró-inflamatórios T CD4+ TH17, possíveis contribuintes no desenvolvimento da autoimunidade [112-115].

Na miastenia gravis (MG), por exemplo, o sistema imune produz autoanticorpos IgG contra os receptores nicotínicos de acetilcolina (RNA) localizados na junção neuromuscular, causando a perda do receptor e acelerando sua degradação pela ativação do complemento e, conseqüentemente, impedindo a ativação muscular [116-118]. Kaminski e cols. [119] demonstraram em estudos com camundongos que a expressão de CD55 e CD59 protege contra a perda de receptores de acetilcolina e diminui os sintomas de fraqueza muscular. A maioria dos pacientes com MG possuem anormalidades tímicas, como hiperplasia ou timoma [120]. O timo apresenta um pequeno número de células mióides - células de expressão do receptor de acetilcolina fora do músculo. Estas células são atacadas por células T autoimunizadas, criando um centro germinativo infiltrado e a deposição de complemento [121]. Um estudo caso-controle realizado por Leite cols [122] avaliou a expressão de CD55, CD46, CD35 e CD59 nas células mióides do timo. Os autores detectaram baixa expressão das PRC CD55, CD46 e CD35 e nenhuma de CD59. Indicando vulnerabilidade ao dano mediado pelo complemento, fato que pode ocasionar o desencadeamento das anormalidades tímicas nestes pacientes.

2.5. PAPEL DO COMPLEMENTO E DAS PROTEÍNAS CD55/CD59/CD46/CD35 NA ARTRITE REUMATÓIDE (AR)

À AR é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente as articulações devido à resposta imunológica, com presença de anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo. Sua patogênese envolve uma ampla variedade de anticorpos reagindo com antígenos nas articulações e com a potente habilidade de formar IC dentro da cartilagem e no tecido sinovial[1] (Figura 3).

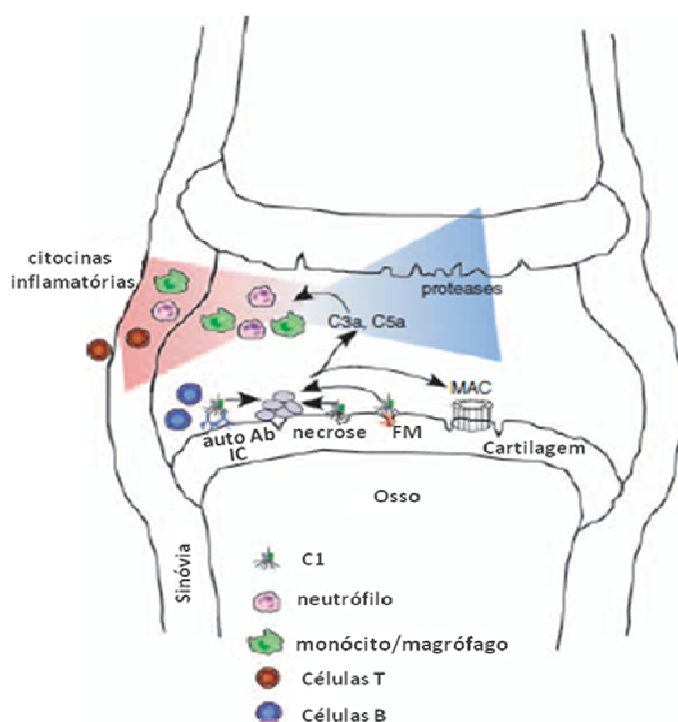


Figura 3- Esquema das possíveis contribuições do sistema complemento no desenvolvimento da AR na articulação. (Adaptado de Okroj, 2007) [1].

A ativação do complemento na AR ocorre inicialmente pela via clássica, devido a presença de autoanticorpos, IC e células apoptóticas na articulação. Entretanto, tem se evidenciado o envolvimento da via alternativa devido à presença fragmentos de Bb no líquido sinovial [123]. Esta via pode tornar-se ativa através do fator reumatóide tipo Imunoglobulina A (IgA), presente em alguns pacientes com AR [124] e/ou colágeno tipo-II, específico para a cartilagem, o qual é exposto como resultado da proteólise durante o curso da doença [125]. Níveis elevados de produtos de ativação do complemento, como o MAC [123], liberação de anafilotoxinas C3a e C5a [126, 127] e o aumento do consumo de C3 e C4 pode ser detectado no líquido sinovial dos pacientes [123, 126-131]. Portanto, a superativação do sistema complemento e a ausência ou diminuição na expressão de proteínas reguladoras do complemento fatores que contribuem para a exacerbação da doença [132].

Possivelmente para controlar a excessiva ativação do complemento na articulação, o tecido sinovial expressa as PRC. Análises da expressão das

PRC na sinóvia reumatóide revelaram um aumento de CD55 [133, 134] e diminuição do CD59 quando comparada com a sinóvia não inflamada [135]. Estes achados sugerem que o CD59 possa ser a chave da proteção da membrana sinovial e a sua perda poderia estar associada à maior suscetibilidade ao dano pelo MAC [136].

Williams e cols [137] investigaram o papel do CD59 na proteção do tecido articular em modelo murino de artrite induzida por antígeno (AIA). Camundongos deficientes em CD59 apresentaram uma maior deposição de MAC e maior dano articular em relação aos controles CD59+. Para confirmar se a exacerbação da doença foi devido à ausência de CD59 na articulação, a expressão de CD59 foi reconstituída utilizando CD59 membrana-alvo recombinante (sCD59-APT542). Foi observada melhora no grupo tratado com sCD59-APT542 em relação ao grupo que recebeu CD59 recombinante não-alvo (sCD59). Desta forma, os dados demonstram que o MAC é um dos maiores efetores do dano articular no modelo AIA.

Hoeck e cols. [132] identificaram em camundongos com deficiência de CD55, diferente do que ocorre em outras doenças, uma redução na atividade da artrite. O CD55, presente nos sinoviócitos tipo fibroblastos (SF), liga-se ao receptor helicoidal de adesão, CD97, presente nos macrófagos que estão migrando para a articulação, exacerbando a inflamação [132]. Segundo os autores, camundongos deficientes em CD55, CD97 ou o bloqueio da interação utilizando um anticorpo anti-CD97, diminui a atividade da artrite [44, 132, 138-141].

Análises da articulação reumatóide revelam um ambiente hipóxico [142, 143], relacionado com a proliferação das células sinoviais e aumento da demanda metabólica, combinados a oclusões periódicas nos microvasos e ciclos de hipóxia-reoxigenação. Kinderlerer e cols. [144] reportaram que as estatinas têm, além de efeitos antiinflamatórios na AR, efeitos citoprotetores, destacando a melhora na regulação da expressão das PRC nas células endoteliais em situações de hipóxia após o uso de atorvastatina, prevenindo assim a deposição de C3, C9 e a lise celular.

Na AR, a inflamação não é restrita a articulação, mas ocorre de forma sistêmica. Em 1992, Gadd e cols [145] publicaram um estudo que avaliou, através da CF, a expressão de 16 diferentes moléculas de membrana, incluindo CD35, nos monócitos do sangue periférico (SP) e do líquido sinovial (LS) de 15 pacientes com AR, 9 com artrite reativa e 9 com doença articular degenerativa. Foi observado significativo aumento na expressão de CD35 nos monócitos do SP de pacientes com AR em relação aos controles. Em contraste a estes dados, a expressão de CD35 nos monócitos do LS foi significativamente menor a dos monócitos do SP. Segundo os autores, estes dados indicam uma mudança sistêmica no imunofenótipo dos monócitos de pacientes com AR permitindo, assim, o recrutamento aos locais de inflamação.

Torsteinsdóttir e cols. [146], ao avaliar a ativação dos monócitos do SP em 22 pacientes com AR, identificaram, por CF, uma elevada expressão de CD35 nessas células em relação aos controles, estando em concordância com o encontrado nos trabalhos de Mc Carthy e cols. [147] e Gadd e cols. [145]. Após 4 – 6 semanas de tratamento com baixas doses de prednisolona a expressão foi normalizada. Segundo os autores, os monócitos dos pacientes com AR mostraram sinais de ativação na circulação periférica, relacionada com adesão e fagocitose e conseqüente infiltração da sinóvia.

A infiltração da sinóvia por leucócitos envolve, além de células mononucleares, neutrófilos. Jones e cols [148], com o objetivo verificar se alterações na expressão de certas proteínas atuam na migração dos neutrófilos para a articulação, e na sua subsequente ativação e capacidade de sobreviver ao ataque do complemento, avaliaram a expressão de CD59, CD55, CD46 e CD35 nos neutrófilos do SP e LS em 18 pacientes com AR e indivíduos saudáveis, através de CF. Os autores identificaram expressão diminuída nos neutrófilos do SP dos pacientes em relação a dos controles de CD55, CD46 e CD35 e nenhuma diferença significativa para CD59. Os neutrófilos do LS expressaram significativamente mais CD55 e CD35 em comparação com neutrófilos do SP, sendo a expressão de CD46 menor e CD59 sem diferença entre os grupos. Segundo os autores, a diferença na expressão destas

moléculas conduz ao aumento na adesividade, resistência ao complemento e uma maior capacidade dos neutrófilos na remoção de IC.

Não está claro se estas alterações contribuem com a doença ou são consequência do estado inflamatório crônico. Entretanto, os dados sugerem que as PRC possam atuar sistematicamente para suprimir a atividade da doença associada à descontrolada ativação do complemento na AR.

4. CONCLUSÃO

Poucos estudos sobre o perfil de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD46, CD35 e CD59 em pacientes com AR são encontrados na literatura, sendo alguns controversos. A deficiência adquirida ou a superexpressão destas proteínas em algumas doenças autoimunes, não parece estar associada a mutações genéticas como ocorre na HPN. E também não se correlaciona com a produção de auto-anticorpos. Por outro lado, parece haver uma associação com a atividade da doença. Na AR, a maioria dos estudos mostraram que o CD35 está aumentado nos monócitos do sangue periférico. Apenas um estudo descreveu uma redução de CD55, CD35 e CD46 nos neutrófilos do SP. As principais hipóteses descritas nestes estudos, com o intuito de explicar as alterações na expressão destas moléculas, são ou estão vinculadas a ação principal como inibidoras da ativação exacerbada do complemento, como funções imunorregulatórias ou de adesão celular, fatores estimulatórios ou inibitórios que regulam a sua expressão, ou até mesmo a presença de enzimas específicas que clivam a ligação destas proteínas na membrana da célula.

Entretanto mais estudos são necessários para confirmar estas hipóteses e definir o real mecanismo pelos quais ocorrem estas alterações na AR.

5. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A justificativa para a realização deste trabalho é definir o perfil de expressão das proteínas regulatórias do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 em pacientes com AR e comparar com a expressão em indivíduos saudáveis. O padrão de expressão destas proteínas na AR não está bem estabelecido e definir o perfil de intensidade, superexpressão ou deficiência de CD55, CD59, CD35 e CD46 é importante para estudos posteriores com a finalidade de avaliar o significado clínico e tratamento.

Além disso, recentes estudos mostram que essas proteínas podem estar correlacionadas com resistência em terapia com anticorpos monoclonais que atuam via ativação do complemento, como por exemplo, o Rituximab (anti-CD20), recentemente utilizada para tratar pacientes com AR. Este estudo pode auxiliar, em médio prazo, a prever a resposta a esse tipo de tratamento através da medida dos níveis de expressão dessas proteínas.

6. OBJETIVOS

Objetivo principal:

1. Comparar o perfil de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 na superfície de leucócitos por citometria de fluxo em indivíduos saudáveis e em pacientes com Artrite Reumatóide.

Objetivos secundários:

1. Determinar o percentual de células positivas para as proteínas de membrana CD55/CD59/CD35/CD46 nos leucócitos de pacientes com AR .

2. Determinar a intensidade média de expressão (MFI) das proteínas de membrana CD55/CD59/CD35/CD46.

3. Correlacionar o perfil de expressão destas proteínas regulatórias com atividade da doença, utilizando o critério clínico Disease Activity Score 28 (DAS28).

7. REFERÊNCIAS

- [1] Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of medicine*. 2007;39(7):517-30.
- [2] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 1996 May 3;85(3):307-10.
- [3] Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerrner LA, Hutchinson NI, et al. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest*. 1997 Jul 1;100(1):93-106.
- [4] Szekanecz Z, Gaspar L, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci*. 2005;10:1739-53.
- [5] Schett G. Rheumatoid arthritis: inflammation and bone loss. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*. 2006 Jan;156(1-2):34-41.
- [6] Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature reviews*. 2003 Jun;2(6):473-88.
- [7] Akahoshi T. [Interleukin-8 in pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Nippon Rinsho*. 2005 Jan;63 Suppl 1:163-6.
- [8] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):356-61.
- [9] Ioannidis JP, Tarassi K, Papadopoulos IA, Voulgari PV, Boki KA, Papasteriades CA, et al. Shared epitopes and rheumatoid arthritis: disease associations in Greece and meta-analysis of Mediterranean European populations. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2002 Jun;31(6):361-70.
- [10] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.
- [11] Ngian GS. Rheumatoid arthritis. *Australian family physician*. 2010 Sep;39(9):626-8.
- [12] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2569-81.
- [13] Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nature reviews*. 2010 Jan;9(1):43-56.
- [14] 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 Dec 1;147(11):3988-93.
- [15] Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol*. 1997 Jan;107(1):1-7.
- [16] Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology*. 2004 Oct;5(10):981-6.
- [17] Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol*. 2007 Sep;171(3):715-27.
- [18] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010 Sep;11(9):785-97.

- [19] Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):729-40.
- [20] Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine*. 2006 Jun;12(6):682-7.
- [21] Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J*. 1989 Nov 15;264(1):1-14.
- [22] Chen Y, Yang C, Jin N, Xie Z, Tang Y, Fei L, et al. Terminal complement complex C5b-9-treated human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization. *Eur J Immunol*. 2007 Jan;37(1):167-76.
- [23] Bossi F, Rizzi L, Bulla R, Debeus A, Tripodo C, Picotti P, et al. C7 is expressed on endothelial cells as a trap for the assembling terminal complement complex and may exert anti-inflammatory function. *Blood*. 2009 Apr 9;113(15):3640-8.
- [24] Bossi F, Fischetti F, Pellis V, Bulla R, Ferrero E, Mollnes TE, et al. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):6921-7.
- [25] Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):48-58.
- [26] Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1140-4.
- [27] Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
- [28] Morgan BP. The complement system: an overview. *Methods Mol Biol*. 2000;150:1-13.
- [29] Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):187-98.
- [30] Kohl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol*. 2006;586:71-94.
- [31] Ogden CA, Elkon KB. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Current directions in autoimmunity*. 2006;9:120-42.
- [32] Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol*. 2007 Jan;44(1-3):73-81.
- [33] Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.
- [34] Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.
- [35] 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. *The Journal of physiology*. 2002 Mar 1;539(Pt 2):537-45.
- [36] Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):496-503.

- [37] Khera R, Das N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol*. 2009 Feb;46(5):761-72.
- [38] Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med*. 1994 Apr;123(4):485-91.
- [39] 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 Mar 1;165(3):848-64.
- [40] 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 Feb 21;201(4):567-77.
- [41] Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, et al. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med*. 2005 May 16;201(10):1523-30.
- [42] 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 Sep 15;149(6):2055-60.
- [43] Lawrence DW, Bruyninckx WJ, Louis NA, Lublin DM, Stahl GL, Parkos CA, et al. Antiadhesive role of apical decay-accelerating factor (CD55) in human neutrophil transmigration across mucosal epithelia. *J Exp Med*. 2003 Oct 6;198(7):999-1010.
- [44] 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 Sep 1;184(3):1185-9.
- [45] 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 May;63(5):1663-8.
- [46] 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 Jun 21;91(13):6245-8.
- [47] Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest*. 1991 Nov;65(5):532-7.
- [48] Deckert M, Kubar J, Bernard A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T cell adhesion and activation. *J Immunol*. 1992 Feb 1;148(3):672-7.
- [49] van den Berg CW, Cinek T, Hallett MB, Horejsi V, Morgan BP. Exogenous CD59 incorporated into U937 cells through its glycosyl phosphatidylinositol anchor becomes associated with signalling molecules in a time dependent manner. *Biochemical Society transactions*. 1995 May;23(2):269S.
- [50] van den Berg CW, Cinek T, Hallett MB, Horejsi V, Morgan BP. Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent. *The Journal of cell biology*. 1995 Nov;131(3):669-77.

- [51] Korty PE, Brando C, Shevach EM. CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation. *J Immunol.* 1991 Jun 15;146(12):4092-8.
- [52] Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, et al. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1078-87.
- [53] Omidvar N, Wang EC, Brennan P, Longhi MP, Smith RA, Morgan BP. Expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 on target cells enhances human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2915-23.
- [54] Seya T, Atkinson JP. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J.* 1989 Dec 1;264(2):581-8.
- [55] Cardone J, Le Friec G, Vantourout P, Roberts A, Fuchs A, Jackson I, et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature immunology.* 2010 Sep;11(9):862-71.
- [56] Karsten CM, Kohl J. The complement receptor CD46 tips the scales in T(H)1 self-control. *Nature immunology.* 2010 Sep;11(9):775-7.
- [57] Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 2003 Jan 23;421(6921):388-92.
- [58] Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, Lamouille B, Roubourdin-Combe C. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6091-5.
- [59] Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2840-8.
- [60] Barchet W, Price JD, Cella M, Colonna M, MacMillan SK, Cobb JP, et al. Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood.* 2006 Feb 15;107(4):1497-504.
- [61] Cole DS, Hughes TR, Gasque P, Morgan BP. Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Mol Immunol.* 2006 May;43(12):1953-64.
- [62] Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology.* 2007;212(4-5):363-70.
- [63] Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cellular microbiology.* 2001 Mar;3(3):133-43.
- [64] Santoro F, Greenstone HL, Insinga A, Liszewski MK, Atkinson JP, Lusso P, et al. Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J Biol Chem.* 2003 Jul 11;278(28):25964-9.
- [65] Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *Journal of virology.* 2003 Apr;77(8):4992-9.

- [66] Greenstone HL, Santoro F, Lusso P, Berger EA. Human Herpesvirus 6 and Measles Virus Employ Distinct CD46 Domains for Receptor Function. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39112-8.
- [67] Giannakis E, Jokiranta TS, Ormsby RJ, Duthy TG, Male DA, Christiansen D, et al. Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4585-92.
- [68] Katayama Y, Hirano A, Wong TC. Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of alpha/beta interferon. *Journal of virology*. 2000 Feb;74(3):1252-7.
- [69] Erdei A, Prechl J, Isaak A, Molnar E. Regulation of B-cell activation by complement receptors CD21 and CD35. *Curr Pharm Des*. 2003;9(23):1849-60.
- [70] Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol*. 1989;46:183-219.
- [71] Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:112-22.
- [72] Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:157-66.
- [73] Krych-Goldberg M, Hauhart RE, Subramanian VB, Yurcisin BM, 2nd, Crimmins DL, Hourcade DE, et al. Decay accelerating activity of complement receptor type 1 (CD35). Two active sites are required for dissociating C5 convertases. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Oct 29;274(44):31160-8.
- [74] Pham BN, Kisserli A, Donvito B, Duret V, Reveil B, Tabary T, et al. Analysis of complement receptor Type 1 expression on red blood cells in negative phenotypes of the Knops blood group system, according to CR1 gene allotype polymorphisms. *Transfusion*. 2010 Jul;50(7):1435-43.
- [75] Thieblemont N, Haeffner-Cavaillon N, Ledur A, L'Age-Stehr J, Ziegler-Heitbrock HW, Kazatchkine MD. CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell lines with complement-opsonized HIV independently of CD4. *Clin Exp Immunol*. 1993 Apr;92(1):106-13.
- [76] Cooper NR. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunology today*. 1991 Sep;12(9):327-31.
- [77] Krych-Goldberg M, Moulds JM, Atkinson JP. Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin. *Trends in molecular medicine*. 2002 Nov;8(11):531-7.
- [78] Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*. 1997 Jul 17;388(6639):292-5.
- [79] Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8;1455(2-3):269-86.
- [80] Arruda MM, Rodrigues CA, Yamamoto M, Figueiredo MS. [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: from physiopathology to treatment]. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992). Mar-Apr;56(2):214-21.
- [81] Hernandez-Campo PM, Almeida J, Sanchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the

- diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006 Mar;70(2):71-81.
- [82] 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 Oct;22(10):2669-73.
- [83] 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 Dec 15;78(12):3291-7.
- [84] 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 Jul;84(1):7-17.
- [85] 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.
- [86] Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of molecular histology.* 2004 Mar;35(3):255-62.
- [87] 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 Apr;23(2):81-90.
- [88] Moutabarrik A, Nakanishi I, Namiki M, Hara T, Matsumoto M, Ishibashi M, et al. Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells. *Lymphokine and cytokine research.* 1993 Jun;12(3):167-72.
- [89] 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 Aug 15;84(4):1276-82.
- [90] Barros MM, Yamamoto M, Figueiredo MS, Cancado R, Kimura EY, Langhi DM, Jr., et al. Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-alpha,beta on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion.* 2009 Jan;49(1):154-60.
- [91] 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 Jun;116(3):542-6.
- [92] 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 Aug 5;88(2):95-9.
- [93] Alegretti AP, Mucenic T, Merzoni J, Faulhaber GA, Silla LM, Xavier RM. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Cell Immunol.* 2010;265(2):127-32.
- [94] 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.

- [95] 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 Sep;161(3):1077-86.
- [96] 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.
- [97] Lach-Trifilieff E, Marfurt J, Schwarz S, Sadallah S, Schifferli JA. Complement receptor 1 (CD35) on human reticulocytes: normal expression in systemic lupus erythematosus and HIV-infected patients. *J Immunol.* 1999 Jun 15;162(12):7549-54.
- [98] Walport MJ, Ross GD, Mackworth-Young C, Watson JV, Hogg N, Lachmann PJ. Family studies of erythrocyte complement receptor type 1 levels: reduced levels in patients with SLE are acquired, not inherited. *Clin Exp Immunol.* 1985 Mar;59(3):547-54.
- [99] Kumar A, Kumar A, Sinha S, Khandekar PS, Banerjee K, Srivastava LM. Hind III genomic polymorphism of the C3b receptor (CR1) in patients with SLE: low erythrocyte CR1 expression is an acquired phenomenon. *Immunology and cell biology.* 1995 Oct;73(5):457-62.
- [100] Cohen JH, Lutz HU, Pennaforte JL, Bouchard A, Kazatchkine MD. Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 1992 Mar;87(3):422-8.
- [101] Sadallah S, Hess C, Trendelenburg M, Vedeler C, Lopez-Trascasa M, Schifferli JA. Autoantibodies against complement receptor 1 (CD35) in SLE, liver cirrhosis and HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 2003 Jan;131(1):174-81.
- [102] Marquart HV, Svendsen A, Rasmussen JM, Nielsen CH, Junker P, Svehag SE, et al. Complement receptor expression and activation of the complement cascade on B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 1995 Jul;101(1):60-5.
- [103] Wilson JG, Ratnoff WD, Schur PH, Fearon DT. 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.* 1986 Jun;29(6):739-47.
- [104] Arora V, Verma J, Dutta R, Marwah V, Kumar A, Das N. Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. *Mol Immunol.* 2004 Jun;41(4):449-56.
- [105] Pascual M, Duchosal MA, Steiger G, Giostra E, Pechere A, Paccaud JP, et al. Circulating soluble CR1 (CD35). Serum levels in diseases and evidence for its release by human leukocytes. *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1702-11.
- [106] 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 Mar;51(3):293-9.
- [107] Lutterotti A, Berger T, Reindl M. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem.* 2007;14(18):1956-65.
- [108] 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 Jan;84(1):21-8.
- [109] 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 Jan 1;168(1):458-65.
- [110] Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3252-7.
- [111] Vaknin-Dembinsky A, Murugaiyan G, Hafler DA, Astier AL, Weiner HL. Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2008 Mar;195(1-2):140-5.
- [112] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology.* 2005 Nov;6(11):1133-41.
- [113] Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1317-26.
- [114] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology.* 2007 Apr;8(4):345-50.
- [115] Awasthi A, Rioll-Blanco L, Jager A, Korn T, Pot C, Galileos G, et al. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):5904-8.
- [116] Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):797-804.
- [117] Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, Self SG. Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis. *N Engl J Med.* 1982 Sep 23;307(13):769-75.
- [118] Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clinic proceedings.* 1977 May;52(5):267-80.
- [119] Kaminski HJ, Kusner LL, Richmonds C, Medof ME, Lin F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Experimental neurology.* 2006 Dec;202(2):287-93.
- [120] Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med.* 1994 Jun 23;330(25):1797-810.
- [121] Willcox N, Leite MI, Kadota Y, Jones M, Meager A, Subrahmanyam P, et al. Autoimmunizing mechanisms in thymoma and thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008;1132:163-73.
- [122] Leite MI, Jones M, Strobel P, Marx A, Gold R, Niks E, et al. Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol.* 2007 Sep;171(3):893-905.
- [123] Brodeur JP, Ruddy S, Schwartz LB, Moxley G. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991 Dec;34(12):1531-7.

- [124] van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort EA, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis*. 1992 Sep;51(9):1029-35.
- [125] Hanauske-Abel HM, Pontz BF, Schorlemmer HU. Cartilage specific collagen activates macrophages and the alternative pathway of complement: evidence for an immunopathogenic concept of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1982 Apr;41(2):168-76.
- [126] Moxley G, Ruddy S. Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1985 Oct;28(10):1089-95.
- [127] Jose PJ, Moss IK, Maini RN, Williams TJ. Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. *Ann Rheum Dis*. 1990 Oct;49(10):747-52.
- [128] Morgan BP, Daniels RH, Williams BD. Measurement of terminal complement complexes in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1988 Sep;73(3):473-8.
- [129] Swaak AJ, Van Rooyen A, Planten O, Han H, Hattink O, Hack E. An analysis of the levels of complement components in the synovial fluid in rheumatic diseases. *Clinical rheumatology*. 1987 Sep;6(3):350-7.
- [130] Corvetta A, Pomponio G, Rinaldi N, Luchetti MM, Di Loreto C, Stramazzotti D. Terminal complement complex in synovial tissue from patients affected by rheumatoid arthritis, osteoarthritis and acute joint trauma. *Clinical and experimental rheumatology*. 1992 Sep-Oct;10(5):433-8.
- [131] Hogasen K, Mollnes TE, Harboe M, Gotze O, Hammer HB, Oppermann M. Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Rheumatol*. 1995 Jan;22(1):24-8.
- [132] Hoek RM, de Launay D, Kop EN, Yilmaz-Elis AS, Lin F, Reedquist KA, et al. Deletion of either CD55 or CD97 ameliorates arthritis in mouse models. *Arthritis Rheum*. 2010 Apr;62(4):1036-42.
- [133] Tarkowski A, Trollmo C, Seifert PS, Hansson GK. Expression of decay-accelerating factor on synovial lining cells in inflammatory and degenerative arthritides. *Rheumatology international*. 1992;12(5):201-5.
- [134] Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 1999 Apr;42(4):650-8.
- [135] Kontinen YT, Ceponis A, Meri S, Vuorikoski A, Kortekangas P, Sorsa T, et al. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann Rheum Dis*. 1996 Dec;55(12):888-94.
- [136] Mizuno M. A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(14):1707-17.
- [137] Williams AS, Mizuno M, Richards PJ, Holt DS, Morgan BP. Deletion of the gene encoding CD59a in mice increases disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):3035-44.

- [138] Hamann J, van Zeventer C, Bijl A, Molenaar C, Tesselaar K, van Lier RA. Molecular cloning and characterization of mouse CD97. *Int Immunol*. 2000 Apr;12(4):439-48.
- [139] Leemans JC, te Velde AA, Florquin S, Bennink RJ, de Bruin K, van Lier RA, et al. The epidermal growth factor-seven transmembrane (EGF-TM7) receptor CD97 is required for neutrophil migration and host defense. *J Immunol*. 2004 Jan 15;172(2):1125-31.
- [140] Kop EN, Adriaansen J, Smeets TJ, Vervoordeldonk MJ, van Lier RA, Hamann J, et al. CD97 neutralisation increases resistance to collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R155.
- [141] de Groot DM, Vogel G, Dulos J, Teeuwen L, Stebbins K, Hamann J, et al. Therapeutic antibody targeting of CD97 in experimental arthritis: the role of antigen expression, shedding, and internalization on the pharmacokinetics of anti-CD97 monoclonal antibody 1B2. *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):4127-34.
- [142] Distler JH, Wenger RH, Gassmann M, Kurowska M, Hirth A, Gay S, et al. Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 Jan;50(1):10-23.
- [143] Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2005 May;17(3):293-8.
- [144] Kinderlerer AR, Steinberg R, Johns M, Harten SK, Lidington EA, Haskard DO, et al. Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R130.
- [145] Gadd SJ, Felzmann T, Majdic O, Maurer D, Petera P, Chen WJ, et al. Phenotypic analysis of functionally associated molecules on peripheral blood and synovial fluid monocytes from arthritis patients. *Rheumatology international*. 1992;12(4):153-7.
- [146] Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc gamma and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. 1999 Mar;115(3):554-60.
- [147] McCarthy D, Taylor MJ, Bernhagen J, Perry JD, Hamblin AS. Leucocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leucocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1992 Mar;51(3):307-12.
- [148] Jones J, Laffafian I, Cooper AM, Williams BD, Morgan BP. Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*. 1994 Aug;33(8):707-12.

7. ARTIGO CIENTÍFICO

**“EXPRESSION OF CD55, CD59, CD46 AND CD35 IN PERIPHERAL BLOOD
CELLS FROM RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS”**

**Amanda Kirchner Piccolli⁽¹⁾, Ana Paula Alegretti⁽²⁾, Laiana Schneider⁽³⁾,
Priscila Schmidt Lora⁽⁴⁾, Laura Corso Cavalheiro⁽⁵⁾, Priscilla Martinelli⁽⁵⁾,
Ricardo Machado Xavier⁽⁶⁾.**

1. Postgraduate student: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Msc, Division of Clinical Pathology. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
3. Graduate study, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
4. Msc, Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
5. Graduate study, UFRGS.
6. PhD Associate Professor, Internal Medicine Department, UFRGS.

Correspondence to:

Ricardo Machado Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 645
Zip code 90035-003 - Porto Alegre, Brazil
Fone: +55 51 3359 8340
E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

SUMMARY

Regulation of the complement system can be a useful strategy to control inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (RA). Expression of the complement regulatory (CReg) proteins CD35, CD46, CD55 and CD59 was investigated on monocytes, lymphocytes and granulocytes from peripheral blood of 30 patients with RA and 30 healthy controls. Using monoclonal antibodies (anti-CD35, anti-CD46, anti-CD55 and anti-CD59) and immunofluorescence flow cytometric analyses the percentages of positively labeled cells and the relative fluorescence intensities (MFI) - as a measure of receptor number - were determined. These CReg were found to be present in the majority (>67.82%) of circulating leukocytes of normal subjects and RA patients. We found that the CD59 MFI was increased in all the peripheral blood cells from RA patients: in lymphocytes MFI was 36.8 and 27.07 ($p=0.0054$); in monocytes, 32.0 and 21.37 ($p<0.005$); and in granulocytes, 84.6 and 66.1 ($p<0.005$), respectively in RA and controls. Interestingly, no difference was observed on the MFI to CD55, CD46 and CD35 in these cells. This indicates that there are differences in the patterns of expression of CD55, CD59, CD46, and CD35 in the peripheral blood cells from RA patients. We found that all the peripheral blood cells of RA patients showed a significant increase of CD59 MFI than controls, perhaps due to an increased synthesis for compensatory mechanisms because of complement activation, inflammatory status or other factors associated with the disease.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, complement system, CD55, CD59, CD46 and CD35.

8. INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects 1% of the adult human population with females affected three times more than males [1]. RA is associated with persistent inflammatory polyarticular synovitis affecting mainly peripheral joints [2]. In addition to inflammation in the synovium, which is the joint lining, the aggressive front of tissue called pannus invades and destroys local articular structures [3].

The thin synovium is normally a delicate intimal lining. In RA, it becomes thicker, resulting in swollen and tender joints because of the inflammatory infiltration that consists of macrophages, CD4+ T cells, B cells, dendritic cells, plasma cells, mast cells and granulocytes [4]. Many locally expressed proteolytic enzymes, such as metalloproteinases, serine proteases and aggrecanases, lead to the degradation of the extracellular matrix constituents and destroy the articular structures [3]. As a result of these processes, the joint becomes deformed, unstable, inflamed, and painful, leading to great disability [4].

The pathogenesis of RA is not yet fully understood. RA is called a complex genetic disease, which means that several genes, environmental factors, and stochastic factors act in concert to cause pathological events [5]. Part of the disease development is contributed by HLA-DR alleles within the major histocompatibility complex (MHC) [3].

The complement system, when not regulated, produces tissue damage. This condition can be induced by pro-inflammatory mechanisms, such as cytokines and chemokines. These are usually up-regulated in RA, indicating that these patients are at increased risk to damage mediated by the complement system. To counteract or contain self-damage, the complement system has a variety of regulators which can be membrane-bound or secretory proteins, which appear to be more or less efficient in distinct conditions. Normal cells resist complement-mediated lysis by several mechanisms such as specific membrane-bound proteins. Examples of these are the decay accelerating factor (CD55), the membrane inhibitor of reactive lysis or protectin (CD59) and the

membrane cofactor protein (CD46). The complement receptor type I (CD35) is also involved in the regulation of C3 fragment deposition [6, 7].

Previous studies have analyzed only the expression of CD55, CD59, CD46 and CD35 in peripheral blood granulocytes and synovial fluid granulocytes [8-10], as well as CD35 expression in monocytes and lymphocytes from the peripheral blood and synovial fluid of patients with RA [10-12]. The aim of this study is to analyze the expression profile of CD55, CD59, CD46, and CD35 complement regulatory (CReg) proteins on the surface of leukocytes by flow cytometry in blood donors and patients with RA.

9. MATERIALS AND METHODS

2.1. SUBJECTS

Thirty consecutive patients that fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria [13] for RA were included. The controls were blood donors and healthy individuals without history of autoimmune disease, from the urban population of Porto Alegre/RS (Brazil), the same geographic area of the patients. The RA patients were seen during their routine follow-up visits in the RA clinics of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a large tertiary care university hospital. The exclusion criteria were concomitant presence of leukaemia, primary lymphoproliferative diseases, overlap with an autoimmune disease, and refusal to consent. Disease severity was measured by the Disease Activity Score 28 (DAS28), calculated at the moment of blood collection in all but 5 patients, in whom not all variables were available for the calculation. The DAS28 was assessed on a scale of ≤ 2.6 (remission), ≤ 3.2 (low activity), ≤ 5.1 (moderate activity) and > 5.1 (high activity) [14].

Patients were receiving different treatments with corticosteroids; disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), such as: leflunomide, methotrexate, sulphasalazine, chloroquine, hydroxychloroquine; non-steroidal anti-inflammatory drugs (AINEs); and immunobiological medications such as:

etanercept, adalimumab, infliximab, tocilizumab and abatacept, as shown in table I.

Peripheral blood samples were collected in Na-EDTA Vacutainer tubes. A complete blood count was performed. Presence of leucopenia was defined as <3500 cells/ μL and leucocytosis as >10000 cells/ μL , lymphopenia as <1500 cells/ μL , lymphocytosis as >4000 cells/ μL , monocytopenia as <200 cells/ μL , monocytosis as >1000 cells/ μL , granulocytopenia as <1800 cells/ μL , granulocytocytosis as >7500 cells/ μL .

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

2.2. FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF CD55, CD59, CD46 AND CD35 MEMBRANE IN LEUKOCYTES

For leukocyte staining, 100 μL of whole blood with an optimal dilution to achieve 5000 cells/ μL was placed into polystyrene tubes and was subjected to two-colour staining with 8 μL of each fluorochrome-conjugated monoclonal antibody (MoAb) (FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: Phycoerythrin) against CD55PE, CD59FITC, CD35PE and CD46FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). 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 150 μL of PBS.

Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Membrane fluorescence intensity of CD55, CD59, CD46 and CD35, which is proportional to the number of CD55, CD59, CD46 and CD35 epitopes on the membrane, was estimated in the gated subpopulations by one-parameter histograms, and the relative mean fluorescence intensity (MFI) was recorded. Thus, MFI is an estimate of the number of receptors present on the cells. Absence of expression of CD55

(CD55-), CD59 (CD59-), CD46 (CD46-) and CD35 (CD35-) was defined when cells in the gated subpopulations had FITC and PE fluorescence lower than 10^1 . The definition of positive and negative cells was set when staining with isotype control was performed, in order to set the gates and distinguish positive staining from autofluorescence and non-specific antibody binding. Cells labeled with isotype-controls were used to set the fluorescence thresholds for positivity such that $> 10^1$ of cells labeled with isotype-control antibodies were positive.

2.3. STATISTICS

For all parameters under study, their mean and standard deviation, median and percentiles were calculated. The statistical significance of the differences observed between the distinct subsets of leukocytes was calculated using Student's t-test. P values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance. Correlation of disease activity (DAS28) and CReg expression was evaluated using Spearman correlation coefficient.

10. RESULTS

The description of the 30 patients and 30 healthy controls is summarized on Table I. Twelve of the 30 RA patients (40%) had leukocytosis whereas seven of the 30 RA patients (23.3%) had monocytosis, four (13.3%) had granulocytosis and two (6.7%) had lymphocytosis. Seven of the 30 RA patients (23.3%) showed lymphopenia.

Table I: Description of RA patients and healthy controls

		RA Patients (n=30)	Matched controls (n=30)	P value
Sex				
	Man	(%; x/x) 16.7% (5/30)	16.7% (5/30)	
	Woman	(%; x/x) 83.3% (25/30)	83.3% (25/30)	
Age (year)	$\xi \pm SD$	53 \pm 12	53 \pm 12	0.960
DAS-28 ^a				
	Remission	N 9/30	-	
	Low activity	N 6/30	-	
	Moderate activity	N 5/30	-	
	High activity	N 5/30	-	
	Missed	N 5/30	-	
Treatments				
	BT ^b + DMARDs ^c	N 4/30	-	
	BT + DMARDs + Corticosteroids	N 1/30	-	
	BT + Corticosteroids	N 1/30	-	
	DMARDs + Corticosteroids + AINEs ^d	N 5/30	-	
	DMARDs + Corticosteroids	N 8/30	-	
	DMARDs	N 9/30	-	
	AINEs	N 1/30	-	
Leukocytes (x10 ³ / μ L)	$\xi \pm SD$	8.102 \pm 2.836	7.300 \pm 1.858	0.201
Mono (x10 ³ / μ L)	$\xi \pm SD$	0.769 \pm 0.339	0.599 \pm 0.180	0.020*
Granu (x10 ³ / μ L)	$\xi \pm SD$	4.843 \pm 2.119	4.185 \pm 1.362	0.159
Lympho (x10 ³ /uL)	$\xi \pm SD$	2.262 \pm 1.009	2.266 \pm 0.756	0.989

*Statistically significance, p<0.05

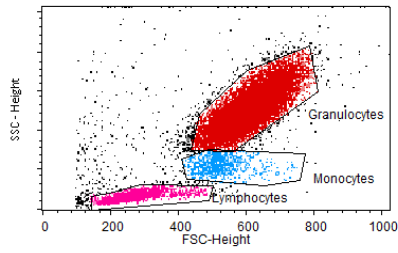
^a DAS28: Disease Activity Score 28

^b BT: Biologic Therapy

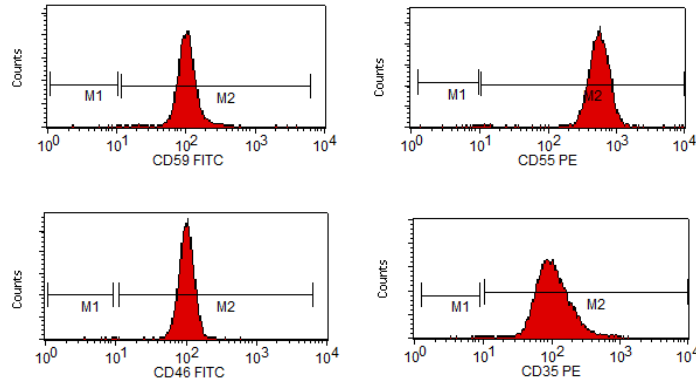
^c DMARDs: Disease-Modifying Antirheumatic Drugs

^d AINEs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

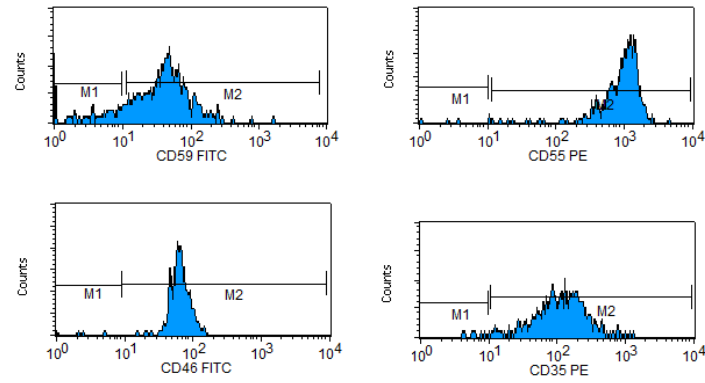
To evaluate the proportion and MFI of CD55+, CD59+, CD46+ and CD35+ cells in RA patients and healthy controls, CellQuest software was used and the histograms of the resultant analysis were obtained as shown in the representative graphs (Figures 1 and 2).



a) Granulocytes



b) Monocytes



c) Lymphocytes

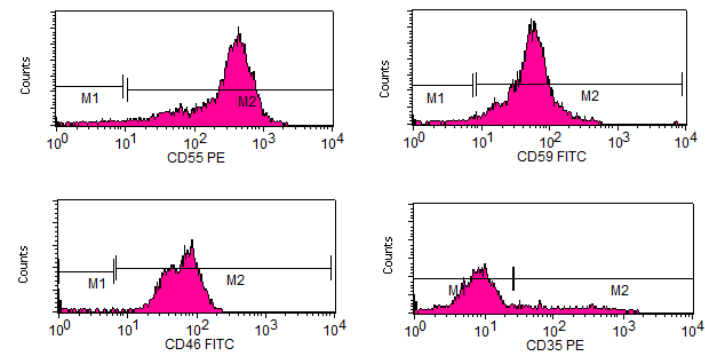
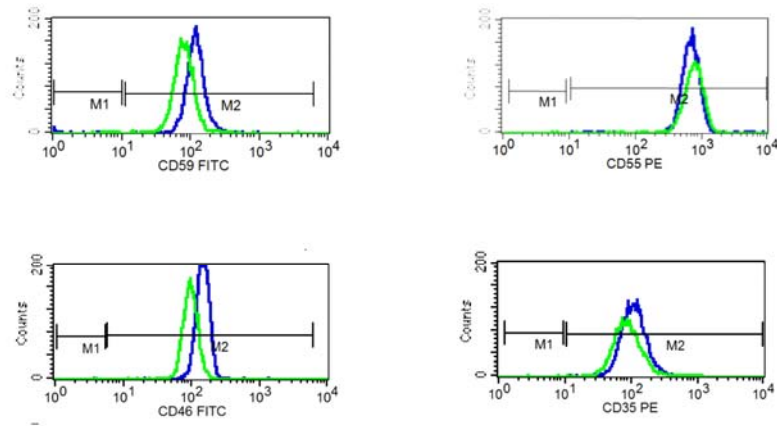
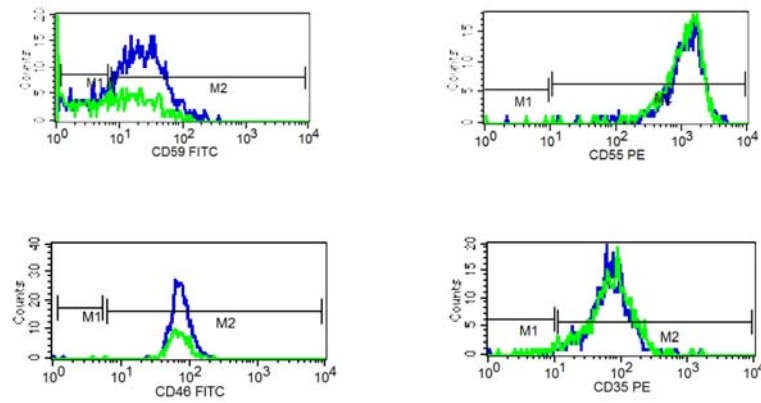


Figure 1: A pattern of flow cytometry assay from a control. The first histogram shows cells distribution by Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC). Red population: granulocytes cell; blue population: monocytes cells; pink population: lymphocytes cells. (a) Histogram CD55PE, CD59FITC, CD46FITC and CD35PE MFI expressions versus counted cells from granulocytes gate. (b) Histogram CD55PE, CD59FITC, CD46FITC and CD35PE MFI expressions versus counted cells from monocytes gate. (c) Histogram CD55PE, CD59FITC, CD46FITC and CD35PE MFI expressions versus counted cells from lymphocytes gate.

a) Granulocytes



b) Monocytes



c) Lymphocytes

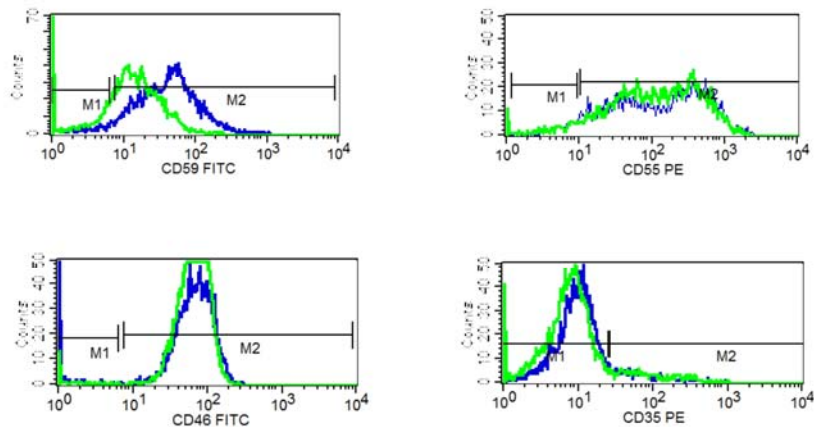


Figure 2: Typical patterns of histogram MFI CD55 PE, CD59 FITC, CD46 FITC and CD35 PE expressions on specific peripheral blood cells versus counted cells from a control (green line) and RA patient (blue line). CD55, CD59, CD46 and CD35 expression on (a) granulocytes, (b) monocytes and (c) lymphocytes as indicated.

3.1. GRANULOCYTE ANALYSES

The MFI of CD59+ granulocytes in the RA patients (84.60) was significantly increased compared to controls (66.10). Meanwhile, the CD55, CD46 and CD35 proportion and MFI on granulocytes showed no significant differences between RA and controls, as summarized on Table II.

3.2. MONOCYTE ANALYSES

The MFI of CD59+ monocytes in the RA patients (32.00) was significantly increased compared to controls (21.37). The proportions of CD59+ (91.84%), CD46+ (99.78%), CD35+ (98.50%) monocytes were significantly increased when compared to that of controls ($p=0.0144$; $p=0.0046$; $p=0.0267$, respectively) (Table II).

3.3. LYMPHOCYTE ANALYSES

In RA patients, the proportion and the MFI of CD59+ in the lymphocytes were significantly higher than those of healthy controls (88.25%, 27.07), respectively. Nevertheless, the CD55, CD46 and CD35 proportion and MFI on lymphocytes showed no significant differences between RA and controls ($p>0.05$), as described on Table II.

Table II: Expression of the CReg in the Patients and Controls.

		Patients (n=30)	Controls (n=30)	T-Test (p<0.05)
		Mean +/-SD	Mean +/-SD	
CD55	<i>Lymphocytes</i>			
	MFI ^a	353.43 ± 116.42	294.67 ± 132.26	0.0730
	Percentage ^b	97.09 ± 2.18	96.64 ± 1.84	0.3854
	<i>Monocytes</i>			
	MFI	1058.00 ± 321.80	1096.70 ± 273.48	0.6177
	Percentage	99.73 ± 0.27	99.66 ± 0.40	0.4178
	<i>Granulocytes</i>			
	MFI	605.33 ± 166.83	605.33 ± 184.71	1.000
	Percentage	99.92 ± 0.08	99.85 ± 0.20	0.0750
CD59	<i>Lymphocytes</i>			
	MFI	36.80 ± 14.78	27.07 ± 10.90	0.0054*
	Percentage	91.84 ± 6.17	88.25 ± 4.42	0.0125*
	<i>Monocytes</i>			
	MFI	32.00 ± 15.51	21.37 ± 12.42	0.0049*
	Percentage	77.81 ± 15.61	67.82 ± 15.04	0.0144*
	<i>Granulocytes</i>			
	MFI	84.60 ± 26.65	66.10 ± 14.93	0.0018*
	Percentage	99.76 ± 0.33	99.67 ± 0.27	0.2566
CD46	<i>Lymphocytes</i>			
	MFI	69.03 ± 13.23	69.87 ± 16.38	0.8292
	Percentage	98.50 ± 2.31	98.81 ± 1.26	0.5270
	<i>Monocytes</i>			
	MFI	67.07 ± 10.99	66.07 ± 10.69	0.7221
	Percentage	99.73 ± 0.35	99.57 ± 0.31	0.0691
	<i>Granulocytes</i>			
	MFI	97.97 ± 25.29	101.87 ± 16.75	0.4846
	Percentage	99.97 ± 0.02	99.94 ± 0.09	0.0593
CD35	<i>Lymphocytes</i>			
	MFI	104.13 ± 115.22	96.43 ± 93.28	0.7771
	Percentage	14.01 ± 5.16	14.33 ± 4.46	0.7985
	<i>Monocytes</i>			
	MFI	149.97 ± 98.72	127.37 ± 80.48	0.3353
	Percentage	98.50 ± 0.66	97.89 ± 1.30	0.0267*
	<i>Granulocytes</i>			
	MFI	128.23 ± 72.23	110.40 ± 58.82	0.2989
	Percentage	99.97 ± 0.04	99.93 ± 0.13	0.1172

Subtitle:

^aMFI: mean fluorescence intensity.^bPercentage: percentage of positive cells for the studied marker.

Regarding association with disease activity (DAS28), we observed increased CD59 expression on lymphocytes, monocytes and granulocytes from

patients with higher activity (data not shown), however there was no significance correlation (CD59MFI Lymphocytes, $p=0.288$; CD59MFI Monocytes, $p=0.757$; CD59MFI Granulocytes, $p=0.208$).

11. DISCUSSION

RA is considered to be an autoimmune disease that involves a wide range of antibodies reacting with antigens in the joints and with the potential ability to form immune complexes (IC) within cartilage and in the synovial pannus tissue [2]. Several lines of evidence have implicated complement in triggering or propagating the joint inflammation of RA. Complement activation products, including C3 fragments and the Membrane Attack Complex (MAC), are present in the synovium, and serum of patients at levels which correlate with the severity of disease [15]. It is worth mentioning that the synovial membrane is especially vulnerable not only to damage mediated by attracted immune cells, but also by MAC formation and lysis of synovial cells [2].

Many autoimmune diseases such as RA course with exacerbated activation of complement and the CReg acts to regulate the cell damage and the complement overactivation [16]. We therefore set out to examine the expression of CReg CD55, CD59, CD46 and CD35 on leukocytes isolated from peripheral blood in RA. Our main finding was the increase of CD59 MFI in all cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: on lymphocytes, monocytes and granulocytes.

Our observation of CD59 upregulation in peripheral blood leukocytes is controversial in relation to the only other study in the literature. Jones et al.[9] observed no difference between MFI of CD59 on granulocytes from peripheral blood of RA patients compared with healthy controls. However they evaluated a rather small number of patients ($n=18$), and the study might not have had enough power to detect a difference. These authors did not evaluate monocytes and lymphocytes.

The mechanisms involved in the upregulation of CD59 expression are still unclear. CD59, a 18 kDa glycoprotein anchored to the cell membrane by

glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage, is constitutively expressed on haematopoietic and resident tissue cells throughout the human body. The main function of CD59 derives from its capacity to interact with the C8 and C9 components of the cytolytic MAC to block the conversion of C9 from a hydrophilic to an amphipathic molecule, thus preventing insertion of C9 into the membrane [17]. It is suggested that CD59 may be involved in several immunological phenomena, such as: interaction with proteins of lymphocytes, monocytes and granulocytes, necessary for activation of these cells [18, 19]; exert synergic function in T cell adhesive interactions [20]; plays a role in cell interaction between monocytes and T cells [21]; and may suppress the production of pathogenic antibodies [22].

Kontinen et al. [23] have described that RA synovial cells do not express CD59, and that CD59 expression is weak in many synovial stromal and endothelial cells. In addition, CD59 expression seems to be partially lost in many acute arthritides in these cells. The finding of a lack of CD59 expression in synovial cells in RA and acute arthritides implies an inefficient control of MAC activation in synovial tissue. This could predispose to synovial cell damage or to various stimulatory effects by MAC. Factors inducing this low expression are not known. Several studies suggest that cytokines may be involved [24], and that CD59 may be shed by exocytosis [25] or detached from its GPI anchor by GPI specific phospholipase C [26], or by proteolytic enzymes [27], which might be responsible for the observations on the aberrant expression of CD59 in diseased synovium.

Corroborating these findings, Mizuno et al [28], studying the role of CD59 in the synovial tissue by neutralization of CD59 in normal rat synovium, observed induction of acute arthritis. Later, when investigating changes in the distribution patterns of CReg during the development of type II collagen-induced arthritis, they found that the synovial expression of complement receptor 1-related gene/protein y (Crry), CD55 and CD59 decreased in parallel to the increased inflammation. Therefore the double suppression of Crry and CD59 worsened inflammation in rat collagen-induced arthritis much more than the suppression of either single CReg. So the CD59 seem to play critical roles in

the protection of synovial tissues against MAC-mediated injury and in maintaining the normal integrity of the joint.

Similarly to our findings, Crockard et al. [8], when investigating the expression of CD35 in granulocytes from peripheral blood and synovial fluid of patients with inflammatory joint disease, including RA, found that it is present on the majority (more than 85%) of circulating granulocytes from normal subjects and RA patients, and no statistically significant difference in MFI between patients and healthy controls was seen. In our study, we found that CD35 is present in approximately 99% of circulating granulocytes, without difference in the MFI between patients and controls. McCarthy et al. [10] studied leukocyte integrins and CD35 expression on peripheral blood cells of patients with RA and also showed no significant increase of CD35 expression in granulocytes from the peripheral blood. In addition, Crockard et al [8] have noted that CD35 expression was upregulated on synovial fluid granulocytes compared with that observed on the corresponding peripheral blood cells and they concluded that upregulation of CD35, reflecting granulocytes activation within the inflamed joint, is a consistent finding in patients with inflammatory arthropathies. McCarthy et al. showed that when granulocytes are activated in vitro the surface expression of CD35 increased. These results indicate that altered expression is consistent with activation within the circulation.

On the other hand, Jones et al. [9], observed a significant reduction in the expression of CD35 on peripheral blood granulocytes in RA patients in comparison to healthy individuals, in addition to CD55 and CD46. However, on SF granulocytes an increased expression of CD55 and CD35 was observed compared with blood granulocytes from same patient. Similarly to Crockard et al., they hypothesized that chemotactic agents can induce increased expression of CD35 and CD55. According to the authors, the difference in the expression of these molecules leads to increased adhesiveness, resistance to complement and an increased capacity of neutrophils for removal of immune complexes. We did not observe any difference in the proportion and MFI for CD55, CD46 and CD35 in peripheral blood granulocytes.

McCarthy et al. [10] showed a significant increase in the expression of CD35 on lymphocytes and monocytes from the peripheral blood. We also found an increased CD35 expression in these cells, but our data was not significantly different. Torsteinsdóttir et al. [11] studying the activation of monocytes in RA, reported that the expression of CD35 in peripheral blood monocytes was elevated in patients in comparison to healthy controls, the same that our findings, however the increase in our data was not significant. According to the authors the data suggest that the monocytes from patients with RA showed signs of activation in the peripheral circulation concerning adhesion and phagocytosis. The priming of the blood monocytes in RA may be one of the mechanisms behind the recruitment of mononuclear cells to the rheumatoid synovium. Concerning these findings, Gadd et al. [12] analyzed CD35 expression on RA, reactive arthritis and healthy controls synovial fluid (SF) monocytes and peripheral blood monocytes, and they also revealed significant upmodulation of CD35 expression on peripheral blood monocytes of RA patients compared to controls group. These indicate a systemic (peripheral blood) change in the monocytes immunophenotype of the RA patient group. Moreover, we found that the absolute value of monocytes with positive CD55, CD59, CD46, and CD35 was significantly higher than controls (data not shown). This increase of expression of this regulatory protein could be due with the monocytosis present in RA patients ($p=0.02$, data not shown) and we do not find any other report in the literature. The reason by which these CReg are higher expressed in monocytes from RA patients, and the possible correlation with monocytosis need to be further explored. We also found that the proportion of CD59 and CD35 monocytes in RA patients showed increased significant differences compared to controls. No difference was observed in the proportion and MFI to CD55, CD46 and CD35 in lymphocytes.

We found no reports about on changes in the expression of CD55 in blood leukocytes in RA, besides that of Jones et al. [9]. Otherwise, analyses of the expression of CD55 in rheumatoid synovium have revealed it was expressed in the synovial lining cell layer and on vascular endothelial cells of synovial tissue, suggesting that CD55 may be induced during a local

inflammatory response. In addition, C5b-9 terminal complement complexes were found in several CD55-positive cases, suggesting that complement activation might, in itself, induce CD55 expression. The authors propose that the occurrence of CD55 may represent a physiological mechanism for local complement regulation in synovial tissue [29].

For CD46 we did not observe any statistically significant difference in CD46 expression in granulocytes, monocytes and lymphocytes from peripheral blood of patients with RA compared with healthy controls. By contrast, Jones et al. [9] found a statistically significant decrease in the expression of CD46 on granulocytes from peripheral blood. We did not find another study for this protein in peripheral blood leukocytes in RA to elucidate these opposite findings. Recent work has suggested that CD46 can play a role in modifying adaptative immunity. For example, CD46 suppressed immune responses with stimulation of T-regulatory cells and was suggested to prevent chronic inflammation [30]. CD46 also recognized apoptotic and necrotic cells and might play roles to scavenge the damaged cells [31].

In summary, we believe that our findings may contribute to elucidate the mechanisms of change CReg expression in RA and we not found any other report at the literature showing CD59 increase in all peripheral blood cells in RA. Several explanations can be proposed to explain to the CD59 increased expression in leukocytes in RA: (i) increased synthesis for compensatory mechanisms because of complement activation; (ii) leukocytes activation and/or (iii) disease activity. In our study we found a trend to increased expression of CD59 with increased disease activity, however we believe that a higher number of patients must be studied to find a statistically significant result. Whether these changes are contributory to the disease or merely a consequence of the chronic inflammatory state remains unclear. However, the data suggest that CReg might be working systemically to suppress the disease activity associated with uncontrolled complement activation in RA.

12. REFERENCES

- [1] Smith CA, Arnett FC. Epidemiologic aspects of rheumatoid arthritis. Current immunogenetic approach. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991 Apr(265):23-35.
- [2] Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of medicine*. 2007;39(7):517-30.
- [3] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):356-61.
- [4] Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2005 Apr;204:55-73.
- [5] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009 Feb 21;373(9664):659-72.
- [6] Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):729-40.
- [7] Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nature reviews*. 2010 Jan;9(1):43-56.
- [8] Crockard AD, Thompson JM, McBride SJ, Edgar JD, McNeill TA, Bell AL. Markers of inflammatory activation: upregulation of complement receptors CR1 and CR3 on synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint disease. *Clinical immunology and immunopathology*. 1992 Nov;65(2):135-42.
- [9] Jones J, Laffafian I, Cooper AM, Williams BD, Morgan BP. Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*. 1994 Aug;33(8):707-12.
- [10] McCarthy D, Taylor MJ, Bernhagen J, Perry JD, Hamblin AS. Leucocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leucocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1992 Mar;51(3):307-12.
- [11] Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc gamma and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. 1999 Mar;115(3):554-60.
- [12] Gadd SJ, Felzmann T, Majdic O, Maurer D, Petera P, Chen WJ, et al. Phenotypic analysis of functionally associated molecules on peripheral blood and synovial fluid monocytes from arthritis patients. *Rheumatology international*. 1992;12(4):153-7.
- [13] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.
- [14] Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2005 Sep-Oct;23(5 Suppl 39):S100-8.
- [15] Brodeur JP, Ruddy S, Schwartz LB, Moxley G. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991 Dec;34(12):1531-7.

- [16] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010 Sep;11(9):785-97.
- [17] Petranka J, Zhao J, Norris J, Tweedy NB, Ware RE, Sims PJ, et al. Structure-function relationships of the complement regulatory protein, CD59. *Blood cells, molecules & diseases*. 1996;22(3):281-96.
- [18] Lund-Johansen F, Olweus J, Symington FW, Arli A, Thompson JS, Vilella R, et al. Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *European journal of immunology*. 1993 Nov;23(11):2782-91.
- [19] Venneker GT, Asghar SS. CD59: a molecule involved in antigen presentation as well as downregulation of membrane attack complex. *Experimental and clinical immunogenetics*. 1992;9(1):33-47.
- [20] Deckert M, Kubar J, Bernard A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T cell adhesion and activation. *J Immunol*. 1992 Feb 1;148(3):672-7.
- [21] Korty PE, Brando C, Shevach EM. CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation. *J Immunol*. 1991 Jun 15;146(12):4092-8.
- [22] Mizuno M. A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(14):1707-17.
- [23] Kontinen YT, Ceponis A, Meri S, Vuorikoski A, Kortekangas P, Sorsa T, et al. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann Rheum Dis*. 1996 Dec;55(12):888-94.
- [24] Bjorge L, Jensen TS, Ulvestad E, Vedeler CA, Matre R. The influence of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma on the expression and function of the complement regulatory protein CD59 on the human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Scand J Immunol*. 1995 Apr;41(4):350-6.
- [25] Vakeva A, Laurila P, Meri S. Loss of expression of protectin (CD59) is associated with complement membrane attack complex deposition in myocardial infarction. *Lab Invest*. 1992 Nov;67(5):608-16.
- [26] Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, Rosse WF, Parker CJ. Erythrocyte membrane inhibitor of reactive lysis: effects of phosphatidylinositol-specific phospholipase C on the isolated and cell-associated protein. *Blood*. 1990 Jan 1;75(1):284-9.
- [27] Yuan FF, Bryant JA, Fletcher A. Protease-modified erythrocytes: CD55 and CD59 deficient PNH-like cells. *Immunology and cell biology*. 1995 Feb;73(1):66-72.
- [28] Mizuno M, Nishikawa K, Goodfellow RM, Piddlesden SJ, Morgan BP, Matsuo S. The effects of functional suppression of a membrane-bound complement regulatory protein, CD59, in the synovial tissue in rats. *Arthritis Rheum*. 1997 Mar;40(3):527-33.
- [29] Tarkowski A, Trollmo C, Seifert PS, Hansson GK. Expression of decay-accelerating factor on synovial lining cells in inflammatory and degenerative arthritides. *Rheumatology international*. 1992;12(5):201-5.

[30] Kemper C, Verbsky JW, Price JD, Atkinson JP. T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46. *Immunologic research*. 2005;32(1-3):31-43.

[31] Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, et al. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36342-54.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso principal achado foi o aumento da expressão da proteína reguladora do complemento CD59 nos granulócitos, monócitos e linfócitos do sangue periférico em pacientes com artrite reumatóide (AR). Entretanto, não encontramos outro artigo na literatura mostrando esta alteração na AR. Várias explicações podem ser propostas para elucidar o aumento da expressão de CD59 em leucócitos na AR: (i) aumento da síntese por mecanismos compensatórios devido à ativação do complemento, (ii) ativação de leucócitos e/ou (iii) atividade da doença. Nós observamos uma tendência de aumento da expressão de CD59, com aumento da atividade da doença, no entanto, acreditamos que um maior número de pacientes deve ser estudado para encontrar um resultado estatisticamente significativo. Se estas mudanças são contributivas para a doença ou apenas uma consequência do estado inflamatório crônico permanece obscuro. No entanto, os dados sugerem que estas proteínas podem estar trabalhando sistematicamente para suprimir a atividade da doença associada à ativação descontrolada do complemento na AR. Desta forma, mais estudos são necessários para confirmar estes achados e definir o real mecanismo pelos quais ocorrem estas alterações na AR.

ANEXOS

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 3359-8304.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: “Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com Artrite Reumatóide”.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Telefone para contato: (51) 3359-8340

Objetivo do estudo:

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

Anexo 2

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, n.º de prontuário _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com Artrite Reumatóide”. 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 20__.

Nome e Assinatura do paciente ou responsável:

Nome e Assinatura do pesquisador:

Anexo 3

Table III: Description of treatments and DAS28 from RA patients:

Patient	Drugs	DAS28
1	Etanercept 50 mg/week; Leflunomid 20/day	3.8
2	Methotrexate (MTX) 15 mg/week; Prednisone 10 mg/week; Infliximab (IFX) 3 mg/kg	3.1
3	MTX 25 mg/week	5.6
4	Hidroxicloroquine 400mg/Day	No data
5	Prednisone 10mg/day; MTX 15mg/week	5.7
6	MTX 10 mg/week; Prednisone 10mg/day	4.8
7	MTX 10 mg/week	No data
8	Ibuprofen 1200mg/Day	3.2
9	MTX 1ml/week; Hydroxychloroquine 400mg/day	3
10	MTX 20mg/week, Sulphasalazine (SSZ) 2000mg/day; Prednisone 5mg/day	3.2
11	Leflunomide 20mg/day , MTX 20mg/week; Prednisone 5mg/day	≤ 2.6
12	MTX 20mg/week; Prednisone 5mg/day	2.5
13	MTX 25 mg/week; Abatacept	3.2
14	MTX 15mg/week; Tocilizumab	≤ 2.6
15	MTX 25 mg/week; Leflunomide 20mg/day.	No data
16	MTX 20mg/week; SSZ 1000mg/day; Hydroxychloroquine 400mg/day; Diclofenac	5.4
17	Prednisone 5mg/day; Tocilizumab	No data
18	Leflunomide 230mg/day; Ibuprofen 600mg/day; Prednisone 10mg/day	4
19	Leflunomide 20mg/Day	≤ 2.6
20	MTX 20mg/week	≤ 2.6
21	MTX 25mg/week; Leflunomide 20mg/day	≤ 2.6
22	MTX 15mg/week	≤ 2.6
23	Leflunomide 20mg/day; MTX 25mg/week; Prednisone 5mg/day	2.7
24	Prednisone 5mg/Day	No data
25	MTX 15mg/week; Prednisone 7.5mg/day	5.3
26	MTX 20mg/week; Leflunomide 20mg/day; Prednisone 10mg/day; Ibuprofen 1200mg/day	4.1
27	MTX 10mg/week; Prednisone 10mg/day	4.9
28	MTX 12.5mg/week; Prednisone 5mg/day; Ibuprofen 1200mg/day	2.4
29	Ibuprofen 1200mg/day; MTX 17.5mg/week; Prednisone 10mg/day	5.8
30	Prednisone 7.5mg/day; Hydroxychloroquine 400mg/day	≤ 2.6