

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

**Correlação entre os níveis de expressão de CD55, CD59, CD46 e
CD35 com citopenias em pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico.**

Ana Paula Alegretti

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de doutorado

2011

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

**Correlação entre os níveis de expressão de CD55, CD59, CD46 e
CD35 com citopenias em pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico.**

Ana Paula Alegretti

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de doutorado

2011

A366c **Alegretti, Ana Paula**

Correlação entre o nível de expressão de CD55/CD59/CD46/CD35 e a presença de citopenias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico / Ana Paula Alegretti ; orient. Ricardo Machado Xavier. – 2011.
97 f. : il. color.

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

1. Lúpus eritematoso sistêmico 2. Antígenos CD55 3. Antígenos CD59 4. Antígenos CD46 5. Receptores de complemento 3b 6. Marcadores biológicos I. Xavier, Ricardo Machado II. Título.

NLM: WD 380

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

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

A estudante de biomedicina, Laiana Schneider, por toda a dedicação, trabalho, companheirismo e amizade; que com certeza contribuíram em muito para a realização deste trabalho.

As colegas e amigas Amanda Piccoli e Priscila Lora por toda a ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Patologia Clínica por toda a força e compreensão.

Ao grupo dos pesquisadores orientados pelo Prof. Ricardo Machado Xavier pela amizade e cooperação.

Ao serviço de reumatologia e em especial ao médico Dr. Odirlei Monticielo pela ajuda na obtenção das informações clínicas dos pacientes.

Aos meus pais, Luiz e Fatima Alegretti, por todos os ensinamentos de ética, moral e respeito; e por todo amor, carinho e dedicação.

Ao meu irmão, Tiago Alegretti, pelo carinho e paciência em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao meu marido, Gilberto Giordano Filho, por todo companheirismo, amor e carinho.

Sumário

Índice de figuras e tabelas	6
Abreviaturas e Siglas	7
Resumo	8
Introdução	9
Revisão da literatura	11
Justificativa	29
Objetivos do trabalho	30
Referências da revisão da literatura	31
Artigo Original: “Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients”	36
Considerações Finais	57
Anexos	
Termo de Consentimento	60
Artigo de Revisão publicado na Revista Brasileira de Reumatologia: “O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.”	63
Artigo Original publicado na Cellular Immunology: “Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients”	72

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Vias de ativação do complemento.	14
Figura 2. Resumo das principais funções do sistema complemento no organismo.	16
Tabela 1. Resumo das principais funções regulatórias das Cregs CD55, CD59, CD35 e CD46	17
Figura 3. Mecanismos de regulação do complemento.	19
Tabela 2. Resumo dos principais estudos e achados reportados na literatura sobre o perfil de Cregs em pacientes LES	26
Table 1. Demographic, clinical, and laboratorial features of SLE patients.	44
Figure 1: Creg surface expression of neutrophil cell.	45
Table 2. The mean of membrane fluorescence intensity (MFI) of CD55, CD59, CD46 and CD35 on the blood cells of SLE patients and controls.	46
Figure 2: Creg surface expression of lymphocytes cell.	47
Figure 3: Creg surface expression of RBC.	49

Abreviaturas e Siglas

AIHA: *autoimmune haemolytic anaemia*

ANCA - *anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*

B – fator B – componente do complemento

BD: *Becton Dickinson*

C1 – C9 – componentes do sistema complemento

C1INH – *C1 inhibitor* – inibidor de C1

CD35: CR1 – receptor do complemento 1

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

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

CD59: MIRL: *membrane inhibitor of reactive lysis* - Inibidor da lise de membrana

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

Células NK - *natural killers* – células matadoras naturais

Cregs: *complement regulatory proteins* - proteínas reguladoras do complemento

D – fator D – componente do complemento

DAI: Doenças auto-imunes

FC : fração constante

AHAI: anemia hemolítica auto-imune

HPN: Hemoglobinúria Paroxística Noturna

Ig: imunoglobulina

DLLG: Doença Linfoproliferativa de linfócitos granulares

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

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

MASPs - *MBL-associated serine protease*

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

MFI: *mean fluorescence intensity*

P – properdina

SC: sistema complemento

SD: *standard deviation*

SLE: *systemic lupus erythematosus*

SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SMD: síndrome mielodisplásica

Resumo:

CD55, CD59, CD35 e CD46 são proteínas de membrana que apresentam propriedades reguladoras da ativação da cascata do complemento. A deficiência na expressão destas proteínas está associada a uma menor proteção contra a ativação do sistema complemento, inclusive do complexo de ataque a membrana, levando à lise e morte celular. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com citopenias parecem apresentar uma deficiência adquirida destas proteínas. Contudo, os mecanismos que modulam essa diminuída expressão continuam desconhecidos e o seu impacto nas manifestações do LES necessitam ser melhor estudados.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 em células do sangue periférico de pacientes com LES e a correlação com a presença de citopenias, atividade da doença e ativação do complemento. Foram realizadas análises por citometria de fluxo em leucócitos e eritrócitos de 100 SLE pacientes e 61 controles saudáveis.

Neste trabalho foi identificada uma diminuição da expressão de CD55, CD59 e CD46, em pacientes com LES com linfopenia e neutropenia; apenas CD59 e CD35 estavam diminuídos em pacientes com LES com anemia, quando comparados com controles saudáveis. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a expressão de CD55 e de CD59 em neutrófilos e a atividade da doença (SLEDAI); uma correlação positiva entre a expressão de CD55 e CD35 em neutrófilos e CD55 nos linfócitos e o nível de C3; e uma correlação positiva com a expressão de CD35 nos eritrócitos e o nível C4. Os resultados obtidos no estudo sugerem que há uma alteração no padrão da expressão destas proteínas nas células do sangue periférico de pacientes com LES, e esta alteração parece estar correlacionada com a atividade da doença e / ou atividade do complemento.

Introdução

O organismo humano está constantemente exposto a agentes infecciosos e, conseqüentemente, desenvolveu um sistema de defesa imune altamente eficiente que visa reconhecer e eliminar tais agentes infecciosos; contudo, a resposta imune do hospedeiro contra agentes infecciosos pode constituir uma faca de dois gumes e vir a atacar células saudáveis do hospedeiro. Devido a isto, o sistema imunológico tem que manter um estreito equilíbrio entre o ataque na superfície estranhas e proteção de superfícies de células próprias.

O sistema complemento é uma importante ferramenta do sistema imune, sendo a primeira barreira de combate a patógenos invasores no nosso organismo; contudo, uma ativação exacerbada do complemento pode levar à formação do complexo de ataque a membrana das próprias células do organismo e a uma formação excessiva de mediadores da inflamação. Neste contexto, quando a resposta imune ativada pelo sistema de complemento não é devidamente controlada, compostos efetores gerados podem atacar e danificar superfícies de células próprias; e isso pode resultar em doença.

As proteínas de membrana celular CD55, CD59, CD46 e CD35 são responsáveis pela regulação da ação do complemento nas células. A prevalência de deficiência de expressão destas proteínas reguladoras do complemento não é bem estabelecida no nosso meio, principalmente em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Recentes estudos sugerem que pacientes com LES possuem uma deficiência significativa destas proteínas nas células do sangue periférico e isto parece estar associado a citopenias secundárias ao LES. Contudo, o mecanismo/causa de diminuição da expressão destas proteínas nas células destes pacientes ainda é desconhecido.

O projeto de pesquisa que originou este trabalho foi inicialmente desenvolvido durante a realização do mestrado acadêmico em que foi evidenciado que existe uma diferença no padrão de expressão de CD55 e CD59 em pacientes com LES quando comparado com controles saudáveis, além de uma correlação significativa com a presença de linfopenia nestes pacientes, corroborando com os poucos achados publicados na literatura. Como o desenvolver do projeto, verificou-se a importância de correlacionar a intensidade de expressão de CD55, CD59, CD46 e CD35 em um número maior de pacientes LES com e sem citopenias e, também, correlacionar a atividade da doença como uma possível causa de diminuição destas proteínas.

Este projeto contou com o auxílio financeiro do FIPE (O Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do HCPA, sob o número 09-534.

Revisão da Literatura

Sistema complemento

O sistema complemento (SC) é uma das primeiras linhas de defesa da imunidade inata que permitem a detecção eficaz e eliminação de patógenos que ameaçam a viabilidade do hospedeiro. A maioria das proteínas que compõem o SC é sintetizada no fígado, entretanto também pode ser produzida por células mielóides, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, e principalmente por macrófagos no sítio inflamatório(1). Este sistema é caracterizado por uma cascata de proteínas ativadas seqüencialmente, resultando em morte celular através da lise direta e/ou ativação de fagócitos(2); além disso, facilita a eliminação de células mortas ou modificadas, como partículas apoptóticas e restos celulares(3), possui a capacidade de desempenhar função imunorregulatória importante através do seu papel na imunidade adaptativa(4, 5) e regulação da tolerância para antígenos próprios(6). Apesar de ser bem reconhecido pelo seu papel altamente eficiente na defesa contra patógenos, o SC também está sendo estudado pelo seu potencial de dano às células do próprio organismo(7).

Existem três mecanismos de ativação do SC bem estabelecidos (Figura 1): através da via clássica (reconhecimento do complexo antígeno-anticorpo através do componente C1q do complemento); via alternativa (hidrólise espontânea do componente C3 do complemento que se torna ativado e capaz de reconhecer estruturas dos patógenos); ou via da lectina (mediada pela ligação da lectina ligadora da manose – MBL – mannose-binding lectin – a carboidratos ligantes na superfície do patógeno) (4).

A via clássica, um potente mecanismo efetor da imunidade humoral, é ativada através da interação do componente C1 do complemento aos domínios da fração constante (FC) das imunoglobulinas (Ig) IgM ou IgG complexadas ao antígeno (complexo imune antígeno-anticorpo). O C1 é formado por três proteínas (C1q, C1r, C1s), e para que ocorra a ativação do complexo C1, pelo menos dois dos seus seis sítios globulares devem ligar-se às moléculas de Ig ligadas ao patógeno. Após esta ligação, o C1q sofre uma mudança conformacional que gera ativação do C1r e clivagem do C1s que, por sua vez, é capaz de clivar C4 e C2. O fragmento C4b liga-se à membrana celular do patógeno e permite a ligação do fragmento C2a; o complexo formado C4b2a é a C3 convertase da via clássica(8, 9).

A via alternativa é ativada, na ausência de anticorpo, diretamente por partículas ricas em carboidratos presentes na superfície do microorganismo invasor, envolvendo a ligação de C3b (presente de forma solúvel no plasma) e demais componentes da via alternativa: o fator B, o fator D e a properdina (fator P)(10). O fator B consiste em uma serina protease, homóloga a C2. O fator B, após sua clivagem pelo fator D, liga-se ao C3b formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). A properdina tem a capacidade de estabilizar o complexo C3bBb, que pode clivar outras moléculas de C3(11).

A via das lectinas é ativada através da ligação da MBL, um componente solúvel no nosso organismo, com carboidratos presentes na superfície do microrganismo alvo. A MBL é membro da família das lectinas dependentes de cálcio e possui a estrutura semelhante ao C1q. Após sua ativação, ocorre a interação com serino-proteases associadas à MBL (MASPs - MBL-associated serine proteases), que incluem MASP-1, MASP-2 e MASP-3, que clivam estruturas do complemento C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a)(12, 13).

Estas três vias de ativação convergem para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC: membrane attack complex) de uma maneira semelhante. As C3 convertases clivam o componente central do complemento C3 em C3a, um peptídeo anafilático e antimicrobiano, e na opsonina C3b. Os fragmentos de C3b revestem superfícies dos antígenos alvos e sinalizam essas partículas para rápida fagocitose. Na superfície da membrana das células 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(14, 15).

Se a ativação progride, uma nova enzima, a C5 convertase é gerada (C4b2a3b da clássica e da lectina; e C3bBbC3b – da via alternativa). Esta enzima cliva C5, liberando o poderoso peptídeo anafilático C5a e o fragmento indutor da fase terminal, C5b(14).

O C5b recruta os componentes C6, C7, C8 e várias unidades de C9 (C9n) para a superfície alvo. A mudança de conformação destas proteínas solúveis e hidrofílicas e a sua agregação induzem a formação do complexo de ataque a membrana (MAC), onde a unidade funcional é um poro inserido na bicamada fosfolipídica(16). Esse poro interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada de água, íons e pequenas moléculas para o citosol, levando à lise celular (todo o processo da cascata do complemento está resumido na Figura 1).

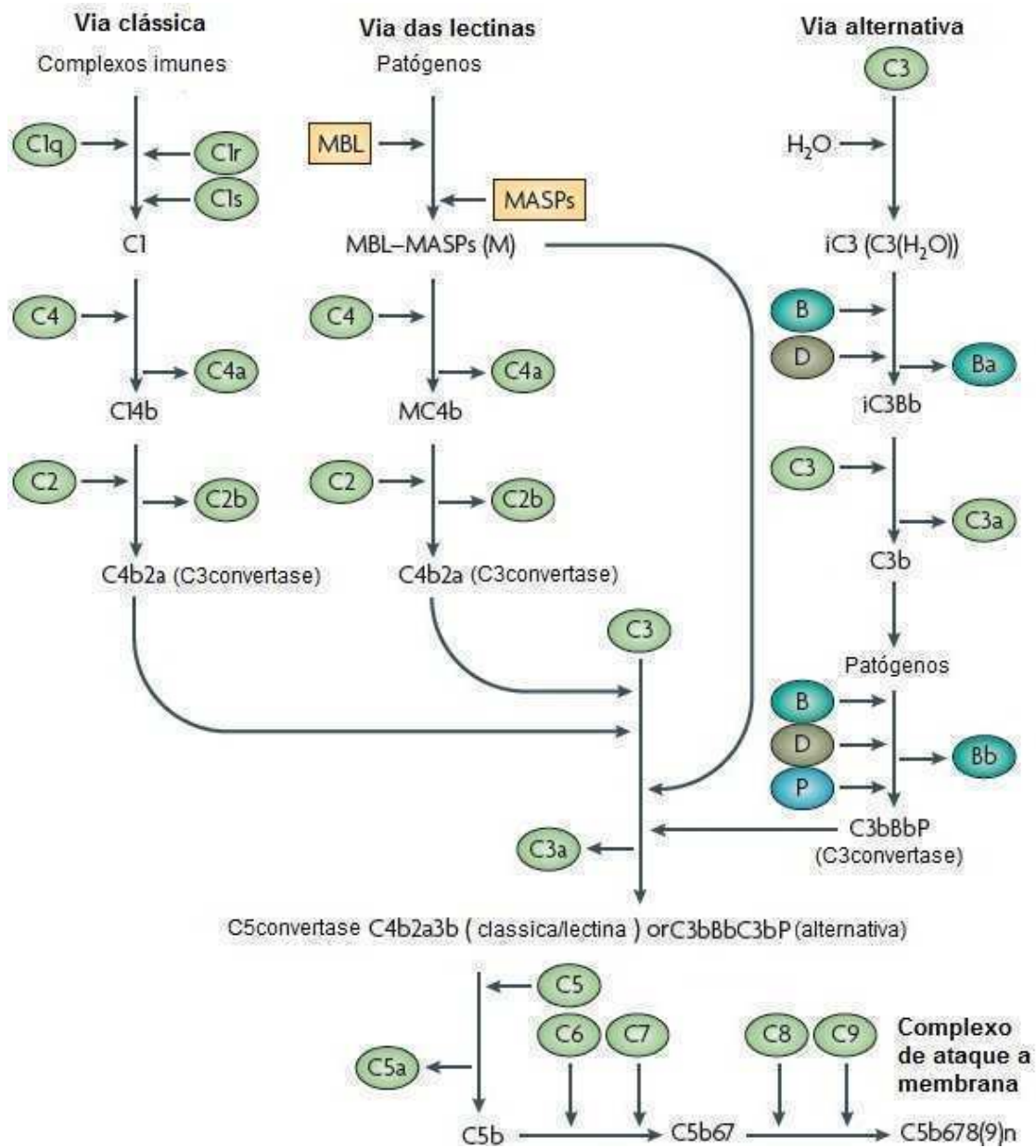


Figura 1. Vias de ativação do complemento. Via clássica: ativada a partir da ligação do anticorpo ao antígeno. Via alternativa: ativada diretamente por partículas ricas em carboidratos presentes na superfície do patógeno. Via da Lectina: a via da lectina é ativada pela interação direta da lectina ligadora da manose (MBL) com carboidratos terminais encontrados em glicoproteínas bacterianas (manose e N-acetil-glicosamina). Figura adaptada de Nat Rev Drug Discov, 2010 (1).

Durante o processo de ativação e desenvolvimento da cascata do complemento, alguns pequenos fragmentos são gerados, principalmente C3a e C5a, os quais atuam modulando as reações humorais e celulares, principalmente quimiotaxia e anafilaxia, através da interação destes fragmentos de ativação com receptores em células efetoras (C3aR e C5aR). A atividade quimiotática de C5a é 100 vezes maior do que a de C3a(17).

Além de uma ação efetora contra os patógenos através do MAC, o complemento possui outras atividades biológicas no organismo: opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de complexos imunes e de células apoptóticas, interface entre a imunidade inata e adaptativa, e ação pró-inflamatória. Estes efeitos ocorrem através da ligação dos produtos de ativação com receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células(2, 18, 19), (Figura 2).

Quando o complemento é ativado por anticorpos direcionados a antígenos de origem externa, mas também eventualmente a antígenos próprios, a ativação explosiva e inespecífica da via comum final e a formação excessiva de mediadores da inflamação podem causar danos a tecidos e células autólogas. Para proteger ou conter estes danos, o SC é fortemente regulado por substâncias solúveis ou ligadas à membrana celular, conhecidas como proteínas reguladoras do complemento (Creg – complement regulatory proteins), (20).

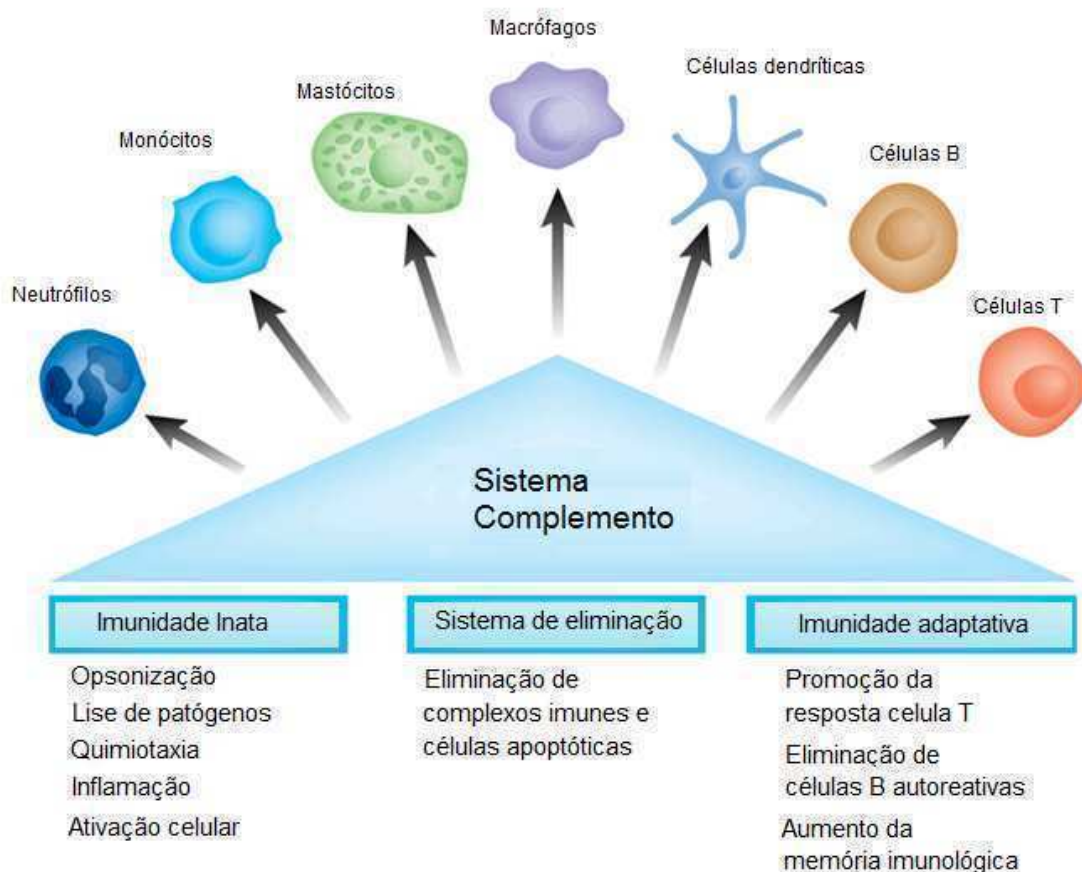


Figura 2. Resumo das principais funções do sistema complemento no organismo.

Figura adaptada de Nat Biotechnol, 2007 (21)

Proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46

As células normais, que são resistentes à lise autóloga mediada pelo complemento, possuem um sistema regulador do complemento na membrana celular constituído por proteínas, sendo as principais o CD55 (ou o fator acelerador de degradação: DAF – decay accelerating factor), o CD59 (ou inibidor da lise de membrana: MIRL – membrane inhibitor of reactive lysis), CD35 (ou receptor do

complemento do tipo 1: CR1 – complement receptor type 1) e o CD46 (ou proteína cofator de membrana: MCP - Membrane cofactor protein).

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 (22). 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 (23). Já o CD46 e CD35 atuam na inativação de C3b e C4b. O CD35 atua também, no processamento e limpeza dos IC (24); as funções regulatórias do complemento destas proteínas estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo das principais funções regulatórias das Cregs CD55, CD59, CD35 e CD46:

<i>Proteína</i>	<i>Função regulatória do complemento</i>
CD55	Previne a formação de novas enzimas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas(25).
CD59	Bloqueia a ligação de C9 ao complexo C5b-8 e previne a formação do MAC (23).
CD35	Atua como cofator para inativar o C3b e C4b através do fator I; além disso, interage com o C3b e C4b para promover remoção de complexos imunes(24).
CD46	Atua como cofator para inativar o C3b e C4b através do fator I(24).

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 (Figura 3). Nesta revisão abordaremos, exclusivamente, as proteínas reguladoras de membrana celular.

O CD55 é uma glicoproteína globular ancorada à membrana pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (24). É expressa em diferentes tipos celulares e encontrada sob forma solúvel na lágrima, saliva, urina, líquido sinovial, líquido e plasma (26). Em adição a sua função de regulação do complemento, atua como um modulador negativo da resposta da célula T (27) e parece proteger as células contra a lise mediada por células matadoras naturais (NK-natural killers) (28). Atua ainda como um ligante de adesão intercelular, interagindo com CD97 nos leucócitos (29) e como um receptor para certos vírus e microorganismos (30).

O CD59 é também uma glicoproteína globular ancorada a membrana pela GPI. 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. Além de regulador do complemento, o CD59 parece estar envolvido na adesão e ativação das células T (31), ativação de neutrófilos via tirosina quinase (32) e na indução da morte celular (33). Além do mais, Omidvar e cols (34), avaliando o significado do CD59 nas células-alvo na modulação da citotoxicidade, encontraram uma maior suscetibilidade das células-alvo que expressavam CD59 à lise mediada por células NK.

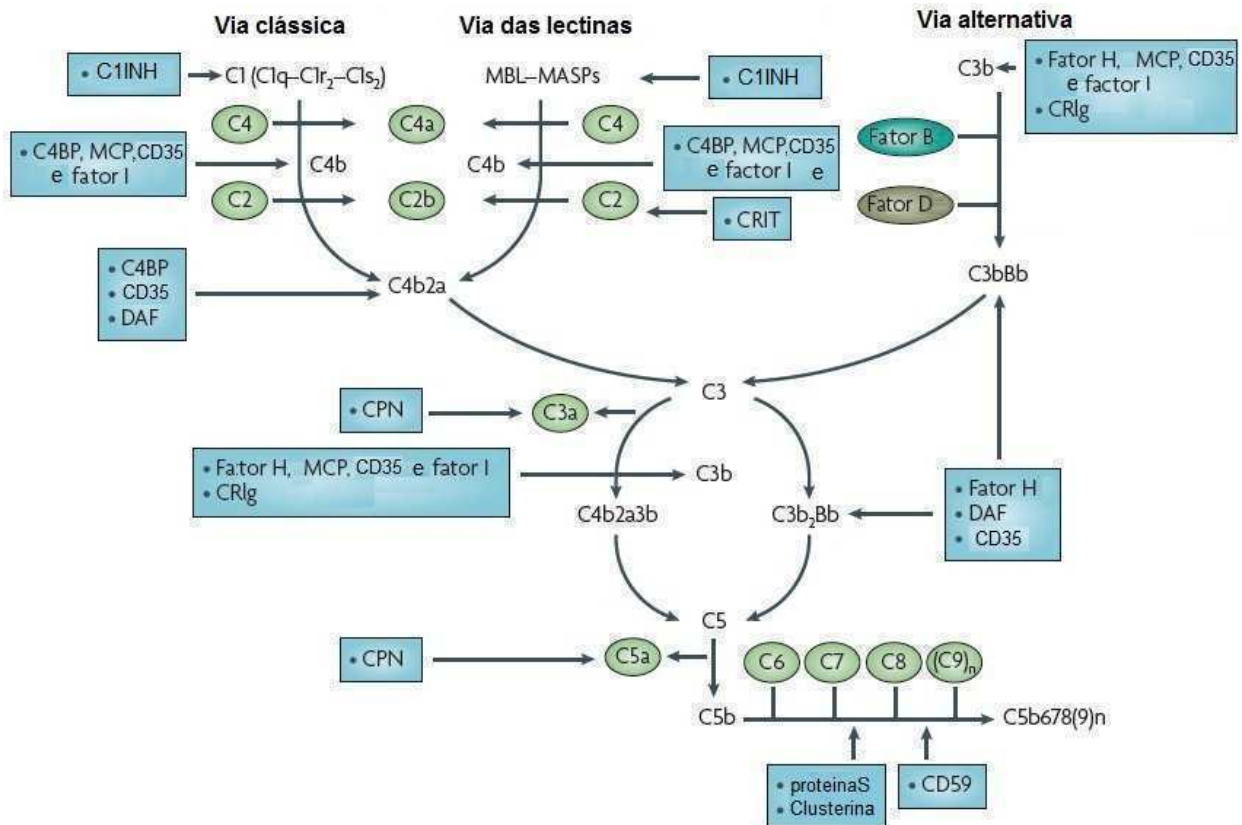


Figura 3. Mecanismos de regulação do complemento. Reguladores de fase solúvel: o inibidor C1 C1INH (inibidor de C1 - C1INH: C1 inhibitor protein) serve como um substrato para a serino proteases C1r e C1s, formando um complexo para inativação completa de C1. C1INH também inativa as MASP1 e MASP2 da via das lectinas, que são estruturalmente e funcionalmente semelhantes à C1r e C1s. C4b e C3b (e C3 hidrolisado) são inativados por clivagem proteolítica pelo fator I, que exige um cofator solúvel obrigatório para C4b e C3b, os co-fatores são as proteína C4b-ligante (C4BP: C4 binding protein) para C4b e fator H para C3b. C4BP e fator H aceleram a degradação C3 convertases, C4b2a e C3bBb, das vias clássicas e alternativas, respectivamente. As anafilatoxinas C3a e C5a são inativado por carboxi-N-peptidase (CPN), que retira um resíduo de arginina terminal para reduzir as suas atividades pró-inflamatórias. A proteína-S e a clusterina se ligam ao complexo C5b-C7 para evitar a inserção na membrana celular e interferir na polimerização do C9. Reguladores ligados à membrana celular: CD35 (CR1) atua como um cofator para a clivagem de C4b e

C3b mediada pelo fator I. Também atua acelerando a degradação das C3 convertases. CD46 (MCP) também possui atividade de cofator para a clivagem de C4b e C3b mediada pelo fator I. O CD55 (DAF) possui a função de acelerar a degradação das C3 convertases das três vias de ativação. O CD59 (ou Protectina) interfere na ligação e polimerização do C9. O CR1g (regulador do complemento da superfamília das imunoglobulinas), presente em macrófagos e células de Kupffer liga-se ao C3b e bloqueia C3- e C5- convertases da via alternativa. O CRIT (C2 receptor inhibitor trispanning) liga-se ao C2 e impede sua clivagem por C1s, interferindo com a geração da C3 convertase da via clássica. Figura adaptada de Nat Rev Drug Discov, 2010(1)

O CD35 (CR1 ou receptor C3b/C4b) é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples (35) que atua como Creg através da desestabilização de C3b e C4b e forçando assim o decaimento das enzimas C3 e C5 convertases da via clássica, das lectinas e da via alternativa. Além disso, age como um cofator para inativar o C3b e C4b através do fator I, atuando como mais um passo na regulamentação da via alternativa (36). O papel do CD35 como um receptor de MBL pode estar envolvido em outra via de regulação da via das lectinas (37). Esta molécula é expressa em diferentes tipos celulares, tais como eritrócitos, leucócitos e fagócitos(38). Sua função biológica varia conforme a célula em que é expresso. O CD35 medeia a adesão e a ingestão de partículas revestidas por C3b e C4b pelas células fagocíticas; enquanto que nos linfócitos B e células dendríticas foliculares promove o processamento do antígeno (39). Em condições fisiológicas, o acúmulo dos complexos imunes (IC: immune complex), que ocorrem principalmente em doenças autoimunes, podem ser removidos da corrente sanguínea através de receptores do complemento (CR), como o CD35.

O CD46, ou MCP, é uma glicoproteína transmembrana que regula o sistema complemento através da ligação com as opsoninas C3b e C4b e executa a função de cofator de suas degradações através da serino protease fator I. Esta molécula é expressa em todas as células, com exceção dos eritrócitos (24). Além de seu papel na imunidade inata, o CD46 também regula a resposta imune adquirida. A coestimulação 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 (40), caracterizadas pela expressão de Interferon γ (IFN γ), interleucina 10 (IL10) e outras moléculas (41). O CD46 também é um receptor para uma lista crescente de patógenos humanos como: Herpes Vírus Humano 6, vírus do Sarampo, Streptococcus pyogenes sp, adenovírus e Neisseria sp (42-44). A ubiquidade da expressão de superfície, a atividade regulatória e a sinalização celular contribuem para o CD46 ser alvo de múltiplos patógenos (45).

A consequência patológica da deficiência de reguladores do complemento presentes na membrana foi inicialmente reconhecida na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN). A HPN é caracterizada pelo aumento da lise dos eritrócitos devido à diminuição de proteínas de membrana ligada a GPI, principalmente CD55 e CD59 (46). A deficiência de CD55 e CD59 também tem sido estudada em outras doenças e parece estar correlacionada com sua gravidade(47-54). Yamaguchi e cols(55) demonstraram que 28,6% dos pacientes com anemia aplásica (AA) e 27,8% dos pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) apresentaram uma população deficiente de CD59 nos eritrócitos. Wang e cols (56) observaram uma diminuição significativa de CD55 e CD59 em 52% dos neutrófilos de pacientes com AA não tratados. Esta deficiência acarreta processos hemolíticos mediados pelo complemento semelhantes aos encontrados na HPN.

Há poucos relatos na literatura sobre o padrão de expressão normal dessas proteínas nas células sangüíneas. Hu e cols (57), em 2005, demonstraram que clones com mutação no gene da PIG-A (gene que codifica a GPI, que ancora as proteínas CD55 e CD59) são encontrados em indivíduos normais. Oelschlaegel e cols (46), em 2001, analisaram por citometria de fluxo (CF) amostras de sangue de 52 doadores saudáveis e observaram 3% de deficiência de CD55 e CD59 nos eritrócitos e granulócitos normais.

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e o complemento

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune inflamatória crônica que acomete principalmente mulheres jovens, caracterizada por acometer múltiplos órgãos e apresentar anticorpos dirigidos contra proteínas do próprio organismo(58). A importância do complemento para o desenvolvimento de LES é claramente demonstrada em um trabalho que relatou que mais de 90% dos indivíduos com deficiência genética de C1q desenvolveram LES grave; além disso, deficiências de C4 e C2 também estão associadas com LES; contudo, estas três deficiências genéticas são raras e, portanto, não podem explicar a maioria dos casos LES(59). Ainda não se sabe se os pacientes com LES geralmente são portadores de defeitos genéticos nas proteínas do complemento, ou nos seus reguladores, que não geram uma deficiência total, mas levam apenas ao comprometimento de sua função.

Estudos apontam que uma falha na regulação da resposta do complemento durante a depuração de células em apoptose poderia resultar na liberação de antígenos próprios estimulando reações autoimunes em indivíduos com predisposição ao LES(60).

Apesar de bilhões de células morrerem por apoptose todos os dias, apenas poucas células apoptóticas podem ser identificadas em condições saudáveis, comprovando a eficiência e rapidez do seu processo de depuração(61). Células apoptóticas ligam-se com moléculas iniciadoras do complemento, como C1q e MBL(62), que intensificam a sua captação pelos fagócitos e ativam o sistema complemento através da via clássica e das lectinas (respectivamente). A via alternativa é ativada espontaneamente, mas é mantida sob controle, principalmente por um inibidor solúvel, o fator H (63).

Outro mecanismo extensivamente estudado em pacientes com LES é a ligação de autoanticorpos com antígenos próprios de superfícies celulares e a formação de complexos imunes após a ligação com antígenos circulantes. Estes complexos imunes tendem a se depositar em órgãos, como o glomérulo renal, com subsequente ativação do sistema complemento através da via clássica, podendo causar dano aos tecidos e células vizinhas(19).

Anormalidades hematológicas são comumente encontradas em pacientes com LES, sendo anemia e linfopenia as alterações mais freqüentes(64). A anemia de doença crônica, por deficiência de ferro e a anemia hemolítica autoimune (AHA) são as formas mais comuns em pacientes com LES, podendo ocorrer ainda mielotoxicidade induzida por drogas e anemia devido à falência renal crônica(65). A linfopenia está presente particularmente durante a doença ativa e é fortemente associada com crioglobulinas IgM, fixação do complemento e anticorpos anti-linfócitos(66). A neutropenia é também uma característica comum da doença, com uma prevalência da ordem de 47%, e esta pode também ser mediada por anticorpos anti-neutrófilos(67).

Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos tecidos e células de pacientes com LES, pouco se conhece sobre a função e atividade das proteínas reguladoras do complemento nesses pacientes e sobre o quanto elas são responsáveis pela modulação da gravidade desse dano.

O papel das Cregs em citopenias secundárias ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

Na Tabela 2 estão listados resumidamente os principais estudos e achados reportados na literatura sobre o perfil de Cregs em pacientes LES. No que se refere ao CD55 e CD59, a maioria dos estudos apontam uma diminuição da expressão destas proteínas e sua correlação com linfopenia(68, 69) e anemia(70). Além disso, um dos estudos demonstrou que pacientes com LES não-linfopênicos apresentaram uma maior intensidade dessas proteínas nos linfócitos em relação aos controles(68). Recentemente, o perfil de expressão das proteínas reguladoras CD55 e CD59 em pacientes com LES foi revisado (71, 72).

Um trabalho publicado por Miwa e cols (73) demonstrou 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 acentuadas, maiores níveis de anticorpos anticromatina e dermatite mais grave do que os controles.

Outro estudo, realizado com pacientes LES, por Richaud-Patin e cols. (70), em que foi avaliada a intensidade de expressão de CD55 e CD59 na membrana de eritrócitos de pacientes com AHAI, evidenciou uma redução destas proteínas nos eritrócitos de pacientes LES que apresentam AHAI secundária. Neste estudo, os

autores avaliaram a presença de anticorpos antifosfolípidios IgG e IgM, e não foi encontrada nenhuma correlação entre a presença destas imunoglobulinas e a expressão de CD55 e CD59. Posteriormente, os mesmos autores(68) investigaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 em linfócitos T e B de pacientes com LES com e sem linfopenia e demonstraram que as células de pacientes com linfopenia apresentavam diminuição de expressão de CD55 e CD59 em comparação com os controles. De maneira interessante, observaram que nos pacientes com LES que não apresentaram linfopenia, os linfócitos apresentavam uma maior intensidade dessas proteínas do que os controles.

Mas recentemente, Alegretti e cols(69) encontraram uma expressão diminuída de CD55 e/ou CD59 nos linfócitos, hemácias e granulócitos, mas não em monócitos, de pacientes com LES. A partir destes resultados encontrados, os autores acreditam que esta alteração na expressão destas moléculas pode ocorrer devido ao status da ativação das células ou por causa da produção de autoanticorpos contra moléculas específicas na superfície da membrana, com conseqüente consumo de CD55 e CD59 na tentativa de impedir a lise celular pelo complemento.

Tabela 2. Resumo dos principais estudos e achados reportados na literatura sobre o perfil de Cregs em pacientes LES

<i>Referencia</i>	<i>Principais achados</i>	<i>Células analisadas</i>
Richaud-Patin, 2003(70)	Diminuição de CD55 e CD59	RBC
Garcia-Vallares, 2006(68)	Diminuição de CD55 CD59	linfócitos
Alegretti, AP, 2010(69)	Diminuição de CD55 CD59	WBC / RBC
Kawano, 1999(74)	Aumento de sCD46	soro
Arora, 2000/2004(75, 76)	Diminuição de CD35	Glomérulo
	Aumento de CD55 CD59	RBC
Cohen, 1992(77)	Diminuição de CD35	RBC
Cornillet, 1992(78)	Aumento na frequência do alelo S	polimorfismo
Lach-Trifilieff, 1999(79)	Expressão normal	reticulócitos
Birmingham, 2005(80)	Diminuição de CD35	RBC

Legenda: WBC: leucócitos; RBC: eritrócitos.

Embora a etiopatogenia do LES seja pouco compreendida, a expressão deficiente do CD35 é identificada por alguns pesquisadores como um mecanismo importante. Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos neste contexto foi realizado por Cohen e col(77), em 1992, que relataram uma diminuição de CD35 nos eritrócitos de pacientes LES. Este estudo avaliou o catabolismo de CD35 nos eritrócitos para verificar a possível causa da diminuição desta proteína nestas células. Os autores deste trabalho, a partir dos dados obtidos, sugeriram que possa ocorrer uma síntese alterada e/ou alteração na expressão de CD35 nas células de medula óssea deste pacientes. Neste mesmo ano, o mesmo grupo reportou um estudo sobre o polimorfismo de alguns alelos do gene do CD35(78). Neste estudo, os autores sugeriram que a diminuição da expressão da CD35 nos eritrócitos dos

pacientes com LES está relacionada com o aumento na frequência do alelo S, e concluíram que existe a hipótese uma ligação genética entre CD35 e suscetibilidade ao LES.

Com o intuito de verificar se a perda da expressão de CD35 ocorre nos eritrócitos maduros circulantes ou se eritrócitos de pacientes LES já vêm da medula óssea com este defeito, Lach-Trifilieff (79), avaliaram a expressão de CD35 em eritrócitos maduros e reticulócitos (eritrócitos imaturos), demonstraram que a expressão não estava diminuída nestas células mais imaturas e sugeriram que existe uma perda acelerada desta molécula nos eritrócitos circulantes cuja causa ainda não está elucidada.

Arora e cols, em 2004, (81) 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 o CD55 e CD59 estavam aumentados nestas células. Os autores sugeriram que este aumento 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. Posteriormente, estes dados foram confirmados por estes mesmos pesquisadores com a análise de transcrição de CR1 (CD35) em pacientes com LES. Os dados encontrados mostraram um acentuado declínio nos níveis de transcrição de CD35 em neutrófilos destes pacientes em comparação com os controles(76). Além disso, os autores e demonstraram que os imunocomplexos são importantes moduladores negativos da transcrição de CR1 nos neutrófilos de pacientes LES.

Um dos principais estudos que correlacionaram a expressão de CD35 com a atividade da doença foi desenvolvido por Birmingham e cols, em 2006. Neste estudo, foram avaliadas as mudanças de expressão de CD35 durante um período de acompanhamento de pacientes apresentando doença ativa, em especial naqueles com comprometimento renal. Os autores encontraram, em vários momentos no tempo de acompanhamento, uma variação na expressão de CD35 nas células dos pacientes LES correlacionada com a ativação do complemento; eles sugerem que o consumo de CD35 reflete a ativação da sua função (que inclui a proteção contra a nefrite do LES).

Raros estudos são encontrados na literatura sobre a expressão de CD46 em pacientes LES(82). Com o objetivo de avaliar a utilidade clínica de CD46 solúvel (sCD46) como um marcador da atividade da doença em pacientes com LES, Kawano e cols(51) demonstraram níveis elevados de sCD46 no soro de pacientes com LES ativo, sendo que estes níveis diminuíram após o tratamento com corticosteróides. Além disso, níveis séricos de sCD46 foram significativamente correlacionados com níveis reduzidos de CH50 (ensaio para quantificar a atividade do complemento). Estes achados, de acordo com os autores, sugerem que os níveis de sCD46 refletem a ativação in vivo do sistema complemento e podem servir como um parâmetro clínico adicional para avaliação da atividade do LES.

Justificativa

O padrão de expressão das proteínas reguladoras do complemento (CD55, CD59, CD46 e CD35) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico ainda não está bem estabelecido. Definir esse padrão de expressão é importante para avaliação do seu potencial significado no desenvolvimento de citopenias no LES, bem como para otimizar o uso de terapias de depleção celular que envolvam ativação do sistema complemento.

Objetivos do trabalho

Verificar se a intensidade de expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD46 e CD35 em eritrócitos e leucócitos de pacientes com LES está correlacionada com a presença de citopenia nestes pacientes.

Objetivos secundários

1. Definir a intensidade de expressão CD55, CD59, CD46 e CD35 na membrana celular de eritrócitos e leucócitos.
2. Comparar os resultados das análise da intensidade de expressão CD55, CD59, CD46 e CD35 na membrana celular de eritrócitos e leucócitos dos pacientes com LES com controles saudáveis
3. Verificar se a linfopenia dos pacientes LES está correlacionada com a diminuição de CD55, CD59, CD46 e CD35 nos linfócitos.
4. Verificar se a neutropenia dos pacientes LES está correlacionada com a diminuição de CD55, CD59, CD46 e CD35 nos neutrófilos destes pacientes.
5. Verificar se a anemia dos pacientes LES está correlacionada com a diminuição de CD55, CD59, CD46 e CD35 nos eritrócitos destes pacientes.
6. Verificar se a intensidade de expressão de CD55, CD59, CD46 e CD35 está correlacionada com a atividade da doença, utilizando os índices SLEDAI e SLICC, nos pacientes com LES.
7. Verificar se a intensidade de expressão de CD55, CD59, CD46 e CD35 está correlacionada com a atividade do complemento, comparando com os níveis de C3 e C4, nos pacientes com LES.

Referências

1. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan;9(1):43-56.
2. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
3. Ogden CA, Elkon KB. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr Dir Autoimmun.* 2006;9:120-42.
4. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34-50.
5. Fang C, Miwa T, Shen H, Song WC. Complement-dependent enhancement of CD8+ T cell immunity to lymphocytic choriomeningitis virus infection in decay-accelerating factor-deficient mice. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):3178-86.
6. Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol.* 2000;74:61-88.
7. Welch TR. Complement in glomerulonephritis. *Nat Genet.* 2002 Aug;31(4):333-4.
8. Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol.* 1987;5:21-42.
9. Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt.* 1993 Dec(93):138-47.
10. Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem J.* 1988 May 15;252(1):47-54.
11. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2002 April-June;13(2):119-25.
12. Monticeli OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008 Apr;27(4):413-9.
13. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity.* 2001 Jul;15(1):127-35.
14. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):729-40.
15. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785-97.
16. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J.* 1989 Nov 15;264(1):1-14.
17. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Feb;6(2):132-42.
18. Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology.* 2000 Aug;49(1-2):187-98.
19. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1140-4.
20. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1265-75.
21. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Molecular immunology.* 2007 Jan;44(1-3):73-81.
22. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:35-58.

23. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):537-45.
24. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.
25. Mikesch JH, Buerger H, Simon R, Brandt B. Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1766(1):42-52.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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. *Infection and immunity.* 1995 May;63(5):1663-8.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev.* 2001 Apr;180:112-22.
37. Khera R, Das N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol.* 2009 Feb;46(5):761-72.
38. Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:157-66.
39. 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.

40. 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. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):862-71.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):496-503.
46. 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.
47. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Konstantopoulos K, Komninaka V, et al. Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia (Budap)*. 2001;31(1):7-16.
48. Azenishi Y, Ueda E, Machii T, Nishimura J, Hirota T, Shibano M, et al. CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1999 Mar;104(3):523-9.
49. Kaminski HJ, Kusner LL, Richmonds C, Medof ME, Lin F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Exp Neurol*. 2006 Dec;202(2):287-93.
50. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V, et al. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol*. 2002 Jan;75(1):40-4.
51. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V, et al. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J*. 2001;2(1):33-7.
52. Ruiz P, Wepler D, Tryphonopoulos P, Nishida S, Moon J, Kato T, et al. CD55 and CD59 deficiency in transplant patient populations: possible association with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-like symptoms in Campath-treated patients. *Transplant Proc*. 2006 Jul-Aug;38(6):1750-2.
53. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1308-14.
54. Yang LB, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000 Oct 15;20(20):7505-9.

55. Yamaguchi M, Machii T, Azenishi Y, Nishimura J, Shibano M, Kanakura Y, et al. Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals. *Blood Cells Mol Dis.* 2000 Jun;26(3):247-54.
56. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H, et al. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol.* 2001 Mar;66(3):200-5.
57. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood.* 2005 May 15;105(10):3848-54.
58. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2007 Feb 17;369(9561):587-96.
59. Truedsson L, Bengtsson AA, Sturfelt G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2007 Dec;40(8):560-6.
60. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 May;6(5):280-9.
61. Leers MP, Bjorklund V, Bjorklund B, Jornvall H, Nap M. An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Aug;59(8):1358-65.
62. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2853-63.
63. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* 2010 Aug;47(13):2187-97.
64. Hepburn AL, Narat S, Mason JC. The management of peripheral blood cytopenias in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Dec;49(12):2243-54.
65. Voulgarelis M, Kokori SI, Ioannidis JP, Tzioufas AG, Kyriaki D, Moutsopoulos HM. Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis.* 2000 Mar;59(3):217-22.
66. Morimoto C, Schlossman SF. Antilymphocyte antibodies and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1987 Feb;30(2):225-8.
67. Nossent JC, Swaak AJ. Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Q J Med.* 1991 Jul;80(291):605-12.
68. 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.
69. 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.
70. 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. *Immunology letters.* 2003 Aug 5;88(2):95-9.
71. Alegretti AM, T. Brenol, JCT. Xavier, RM. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.* 2009;49(3).

72. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev.* 2007 Jan;6(3):155-61.
73. 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.
74. 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.
75. Birmingham DJ, Gavit KF, McCarty SM, Yu CY, Rovin BH, Nagaraja HN, et al. Consumption of erythrocyte CR1 (CD35) is associated with protection against systemic lupus erythematosus renal flare. *Clin Exp Immunol.* 2006 Feb;143(2):274-80.
76. 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.
77. Arora V, Mondal AM, Grover R, Kumar A, Chattopadhyay P, Das N. Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(7):1722-8.
78. 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.
79. Cornillet P, Gredy P, Pennaforte JL, Meyer O, Kazatchkine MD, Cohen JH. Increased frequency of the long (S) allotype of CR1 (the C3b/C4b receptor, CD35) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1992 Jul;89(1):22-5.
80. 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.
81. 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.
82. Endoh M, Yamashina M, Ohi H, Funahashi K, Ikuno T, Yasugi T, et al. Immunohistochemical demonstration of membrane cofactor protein (MCP) of complement in normal and diseased kidney tissues. *Clin Exp Immunol.* 1993 Oct;94(1):182-8.

Artigo Original

“DIMINISHED EXPRESSION OF COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS ON PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) PATIENTS”

Ana Paula Alegretti*, Serviço de Patologia Clínica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Laiana Schneider, Serviço de Patologia Clínica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Amanda Kirchner Piccoli, Serviço de Patologia Clínica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Odirlei Andre Monticelo, Serviço de Reumatologia. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Priscila Schmidt Lora, Serviço de Reumatologia. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Ricardo Machado Xavier, Serviço de Reumatologia. Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author*: Ana Paula Alegretti (e-mail: anaalegretti@gmail.com)

Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre—HCPA,
Rua Ramiro Barcelos, 2350—2° andar, Bairro Bom Fim.
Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil

“DIMINISHED EXPRESSION OF COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS ON PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) PATIENTS”

AP Alegretti¹, L Schneider¹, AK Piccoli¹, OA Monticielo², PS Lora², RM Xavier²

¹Serviço de Patologia Clínica; ²Serviço de Reumatologia; Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

Financial support: This study received financial support from the *Fundo de Incentivo à Pesquisa* (FIPE, Research Incentive Fund) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Summary

CD55, CD59, CD46 and CD35 are proteins with complement regulatory (Creg) properties that ensure cell and tissue integrity when this system is activated. It has been reported that SLE (Systemic Lupus Erythematosus) patients seem to have an acquired deficiency of these proteins. The aim of this study was to evaluate the presence of altered Creg expression on peripheral blood cells from SLE patients and its association with anemia, neutropenia and lymphopenia. Flow cytometric analyses were performed on white blood cells and red blood cells (RBC) from 100 SLE patients and 61 healthy controls. Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) and SLICC (systemic lupus international collaborating clinics). Compared with healthy controls, we observed in SLE patients with lymphopenia and neutropenia decreased expression of CD55 ($p < 0.001$), CD59 ($p < 0.001$) and CD46 ($p < 0.05$). In SLE patients with anemia, only CD59 ($p < 0.001$) and CD35 ($p < 0.001$) were decreased. There was a negative correlation between CD55 and CD59 expression on neutrophils and the SLEDAI, and a positive correlation between CD55 and CD35 expression on neutrophils and C3 level in SLE patients. Furthermore, there was a positive correlation between CD35 expression on RBC and C4 level in SLE patients. The results obtained in the study suggest that there is an altered pattern of Creg expression on the peripheral blood cells of SLE patients, and this decreased expression is correlated with disease activity and/or with activation of the complement system.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, SLE, CD55, CD59, CD46, CD35, cytopenias, complement system.

Introduction

The complement system (CS) represents the first defense line of innate immunity; it acts facilitating the phagocytosis of immune complexes, pathogens and apoptotic cells and forming the membrane attack complex (MAC), resulting in cell lysis. This powerful defense system is composed of multiple components (>60 different proteins and activation products) that trigger in a cascade type system (1).

The complement as a central defense system is immediately activated within seconds upon entry of a pathogen into the human host through three pathways: the classical (triggered by antibody–antigen complexes), the lectin (triggered by carbohydrates on the surface of bacteria), and the alternative pathways (spontaneous and continuous process which is initiated by the conformational change of C3). These three pathways use different proteins to produce C3 and C5 convertases, which involves cleavage of C2 and C4 (classical and lectin pathway) or the cleavage of factor B by factor D (alternative pathway). All result in the formation of the lytic MAC (membrane-attack complex: C5b-9) (2, 3). Activation of the complement system is a powerful drive to initiate inflammation, but can, if unregulated, lead to severe tissue damage and disease. Based on their potent damaging capacity the generation and targeting of complement effector compounds is tightly regulated(4).

Normal cell membranes express complement regulatory (Creg) proteins that regulate activation of the complement system and provide essential protection against self damage (5). There are four major human cell surface Creg proteins: CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis - MIRL), which is a complement membrane inhibitor that blocks assembly of the MAC by binding to C8 and C9 (6);

CD55 (decay accelerating factor - DAF), that accelerates the disassembly of preformed C3 and C5 convertases (7); CD46 (membrane cofactor protein), that acts as a cofactor for the factor I-mediated cleavage of the activated complement components C3b/C4b (8); and CD35 (complement receptor type I, CR1), which is also involved in the regulation of C3 fragment deposition and serves as a cofactor for the degradation of C3b by factor I (4). These Creg proteins are present on the cell surface of whole blood cells, except the CD46, which is not expressed on RBC. It has been reported that the production and the expression of some of these complement regulatory proteins are altered in autoimmune diseases and that inherited deficiencies of the complement system components are associated with a high prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE), glomerulonephritis, and vasculitis (9-11).

The complement system is integrally involved in the pathogenesis of tissue injury in SLE. Tissue deposition of immunoglobulin is a characteristic feature of SLE and can cause continued complement activation by the classical pathway (10). Therefore, potential differences on the expression of the Cregs proteins could implicate different susceptibilities to complement mediated damage and be clinically significant. Particularly, altered expression on blood cells could be related to cytopenic changes common in this disease. Earlier studies have shown that expression of CD35 (12-16), CD55 and CD59 (17, 18) on erythrocytes and CD55 and CD59 (19-21) on lymphocytes are decreased in patients with SLE, but some of these findings were controversial. The current study aimed to evaluate the expression of CD55, CD59, CD46 and CD35 expression on peripheral blood cells from SLE and healthy controls using flow cytometry and its correlation with cytopenias on these patients.

Material and methods

Subjects

One hundred patients that fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria (22) for SLE and 61 healthy controls with no history of autoimmune diseases were included in the present study. Disease activity was measured using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) (23) and SLICC-DI (systemic lupus international collaborating clinics) (24).

The patients were seen during their routine follow-up visits in the outpatient clinic of the Department of rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Thirty-eight of them had lymphopenia, defined as <1200 lymphocytes/uL; thirteen of them had neutropenia, defined as <1500 neutrophils/uL; and twenty-one of them had anemia, defined as hemoglobin <11g/dL. The exclusion criterion was concomitant presence of overlap with another autoimmune disease. Peripheral blood samples were collected in Na-EDTA Vacutainer tubes. All SLE patients were receiving an immunosuppressive drug at the time of blood collection (mycophenolate mofetil, cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, cyclosporin and/or rituximab).

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

Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 membrane in leukocytes

For red blood cell (RBC) staining, 100 uL of diluted blood (with an optimal dilution with phosphate buffered saline (PBS) to achieve 10000 red cells/uL) were

placed into polystyrene tubes (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Diego, CA, USA) and were subjected to two-colour staining with 8uL/test of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD55PE, CD59FITC, CD35PE and CD46FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). After 20 min incubation at room temperature, samples were re-suspended in 0.5mL of PBS; and cells were analysed on the flow cytometer.

For leukocyte staining, 100 ul of whole blood (with an optimal dilution to achieve 5000 cells/uL) were placed into polystyrene tubes and were subjected to two-colour staining with 8uL of each antibody of fluorochrome-conjugated MoAbs 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 0.5 mL of PBS.

Cells were analysed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Membrane intensity of CD55, 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. 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 auto-fluorescence and non-specific antibody binding.

Serological studies

Measurement of complement 3 (C3) and complement 4 (C4) is used to determine whether primary deficiencies or activation-related consumption of the complement components are present in SLE patients. C3 and C4 measurements were performed using the ADVIA 1800 chemical analyzer system (Siemens) on patient's sera.

Complete Blood Cell Count (CBC)

A complete CBC was performed using the Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation/Japan). Slides revised were prepared with SP-100 SYSMEX™ using a staining program was as follows: May Grunwald (Biolyon, France) pure time: 2.5 min, MG dilute time: 3 min, Giemsa (Biolyon, France) time: 7 min, rinse 0 min and drying time 5 min, as instructed by the supplier.

Statistics

Data were compared using Mann–Whitney U-test, Student t-test and Spearman correlation coefficient when appropriate. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$. Statistical analysis was conducted using SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

The description of the 100 patients and 61 healthy controls is summarized on Table 1. Of the SLE patients, 38% had lymphopenia, 13% had anemia, 21% had neutropenia and 16% had thrombocytopenia (platelets <150.000/uL). None of these cytopenias were observed in the healthy control group.

Table 1. Demographic, clinical, and laboratorial features of SLE patients.

Patients's features	SLE (n=100)	Healthy controls (n=61)
Sex (F%)	93	67.2
Age (Year) Median (range)	42 (31-53)	45 (30-61)
SLEDAI ^a Median (range)	2(0-5)	-
SLICC-DI ^b Median (range)	1(0-2)	-
Rash malar (%)	58	-
Glucocorticoids(%)	90	-
Nephritis(%)	45	-
Arthritis(%)	67	-
AIHA ^c (%)	28	-
RBC (x10 ¹² Cells/uL)	4.15(0.55)	4.4(0.36)
Hemoglobin(g/dL)	12.0(1.6)	13.5(1.2)
Platelets (x10 ⁶ Cells/uL)	208(65)	228(45)
Leucocytes(x10 ³ Cells/uL)	5.43(4.07-7.91)	6.96(6-8.59)
Lymphocytes(x10 ³ Cells/uL)	1.32(0.85-1.79)	2.25(1.75-2.85)
Neutrophils(x10 ³ Cells/uL)	3.58(2.22-5.29)	3.77(3.08-4.74)
Monocytes(x10 ³ Cells/uL)	0.48(0.37-0.68)	0.58(0.6-0.75)
Thrombocytopenia* (%)	16	0
Leukopenia* (%)	17	0
Lymphopenia* (%)	38	0
Neutropenia* (%)	13	0
Anemia* (%)	21	0

^a SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index.

^b SLICC-DI: systemic lupus international collaborating clinics

^c AIHA: autoimmune hemolytic anemia (positive Coomb's test).

* lymphocytes: <1200/uL; neutropenia: <1500 neutrophils/uL; anemia:<11g/dL; and thrombocytopenia< 150.10⁶Cells/uL

Neutrophil analyses

In SLE patients, the MFIs of all Cregs on neutrophils (granulocytes) were significantly lower than that of healthy controls (Table 2). When comparing neutropenic (13/100) with non-neutropenic SLE patients, all Cregs, with the exception of CD46, were significantly decreased (Figure 1).

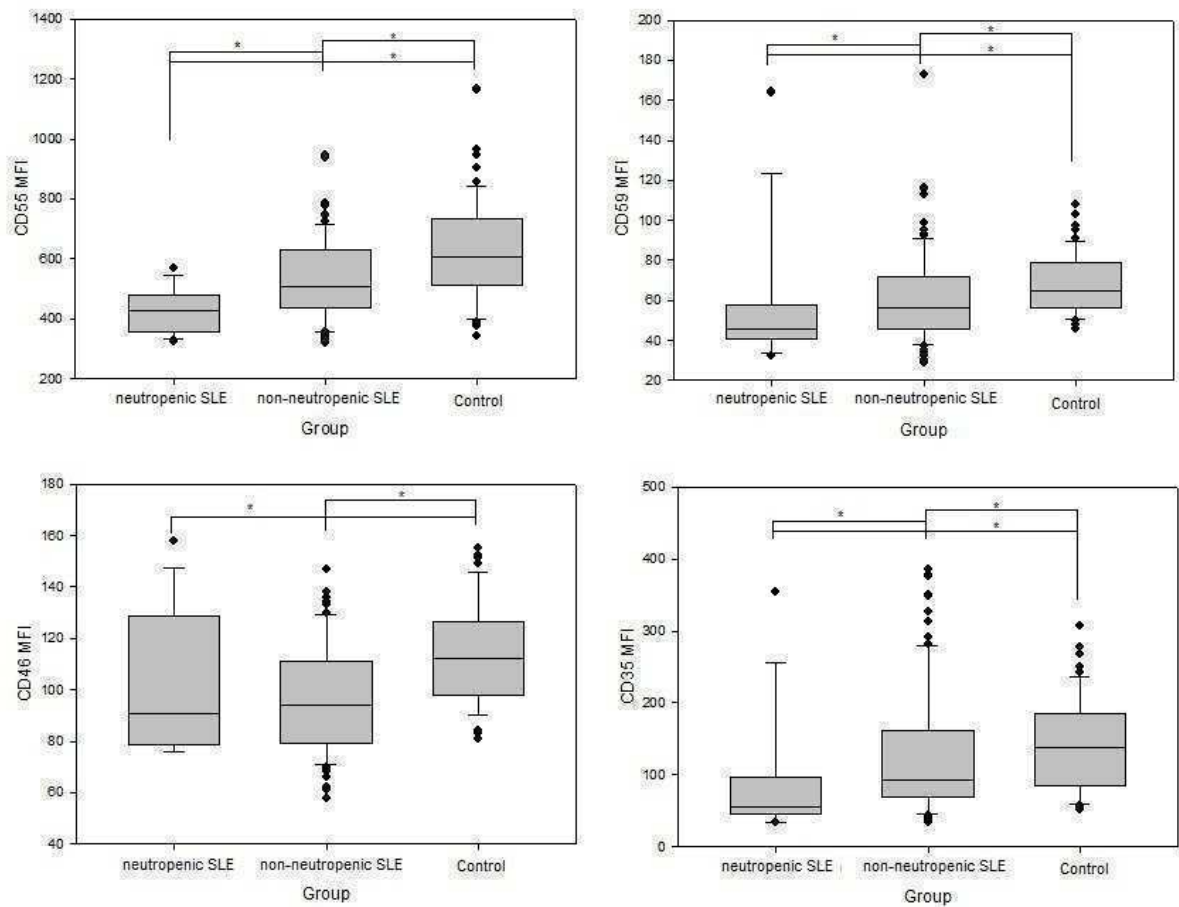


Figure 1: Creg surface expression of neutrophil cell. The figure displays mean fluorescence intensity (MFI) of CD55, CD59, CD46 and CD35 on gated neutrophil from SLE patients with neutropenia, without neutropenia and controls. Shown is the median and interquartilar range from all subjects studied in each group.

There was a negative correlation between CD55 ($r=-0.278$, $p=0.019$) and CD59 ($r=-0.23$, $p=0.048$) expression on neutrophils and the SLEDAI; besides that, there was a positive correlation between CD55 ($r=0.237$, $p=0.021$) and CD35 ($r=0.334$, $p=0.030$) expression on neutrophils and C3 serum levels in SLE patients, and CD55 ($r=0.334$, $p=0.001$) with C4 level.

When analyzing only neutropenic SLE patients, a positive correlation was shown between CD59 on neutrophils and C4 serum levels ($r=0.828$, $p=0.006$).

Table 2. The mean of membrane fluorescence intensity (MFI) of CD55, CD59, CD46 and CD35 on the blood cells of SLE patients and controls.

Cell	Creg	SLE patient MFI ^a	Control MFI ^a	p ^b
Neutrophils	CD55	515 ±132	621 ± 168	<0.001**
	CD59	60 ±24	68 ±15	0.016*
	CD35	88(67-154)	138(86-185)	0.007*
	CD46	97.2 ± 21.3	113.5 ±19.4	<0.001**
Lymphocytes	CD55	295 ±153	350±121	0.021*
	CD59	21.5(13-31)	32(25-38)	<0.001**
	CD35	23(21-28.7)	28(21-59.5)	0.053
	CD46	62(49-77.7)	79(65-97.5)	<0.001**
Monocytes	CD55	953 ±313	1057 ±241	0.021*
	CD59	23(18-33)	22(15.5-33)	0.422*
	CD46	74.3 ±21.9	78.5 ±16.8	0.217
	CD35	122.5(66.2-202.7)	138(85-198.5)	0.296
RBC	CD55	188.5 ±44.1	201.6 ± 43.5	0.153
	CD59	73.5(53.5-110.7)	112(102.5-148)	<0.001**
	CD35	9.1 ±2.5	15 ±5.0	<0.001**

* Significant statistical difference ($p < 0.05$).

**Significant statistical difference ($p < 0.001$).

^a Media ± SD or Median (25-75 interquartile range)

^b Mann–Whitney U-test or Student t-test.

Lymphocyte analyses

In SLE patients, the MFIs of CD55, CD59 and CD46 on lymphocytes were significantly lower than that of healthy controls (Table 2). When comparing lymphopenic (38/100) with non-lymphopenic SLE patients, only CD55 and CD59 were significantly decreased (Figure 2).

There was a positive correlation between CD55 ($r=0.231$, $p=0.026$) expression on lymphocytes and C3 serum levels in SLE patients, and no association with the SLEDAI or the SLICC-DI.

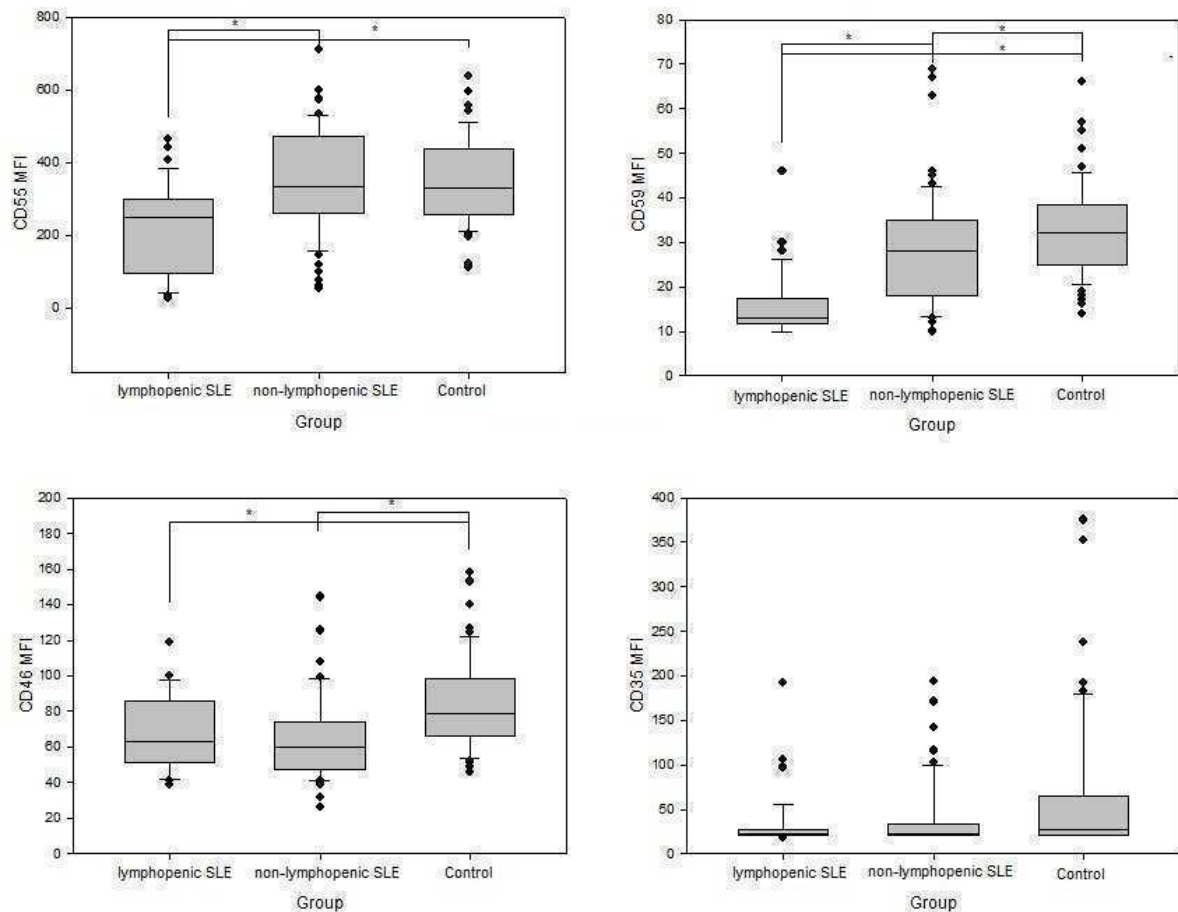


Figure 2: Creg surface expression of lymphocytes cell. The figure displays mean fluorescence intensity (MFI) of CD55, CD59, CD46 and CD35 on gated

neutrophil from SLE patients with lymphopenia, without lymphopenia and controls. Shown is the median and interquartile range from all subjects studied in each group.

Monocyte analyses

In SLE patients, only the MFI of CD55 on monocytes was significantly lower than that of healthy controls (Table 2). There was no correlation between Creg expression on monocytes and C3 and C4 level or SLEDAI and SLICC-DI in SLE patients.

Red blood cells analyses

In SLE patients, the MFI of CD59 and CD35 on RBC were significantly lower than that of healthy controls (Table 2). When comparing anemic (21/100) with non-anemic SLE patients, there were no MFI CD59 and CD35 statistic difference (Figure 3).

There was a positive correlation between CD35 ($r=0.218$, $p=0.049$) expression on RBC and C4 serum levels in SLE patients; and no association with the SLEDAI or the SLICC-DI. When analyzed only anemic patients this latter correlation was stronger ($r=0.526$, $p=0.021$). CD46 was not analyzed because it is not expressed on RBC.

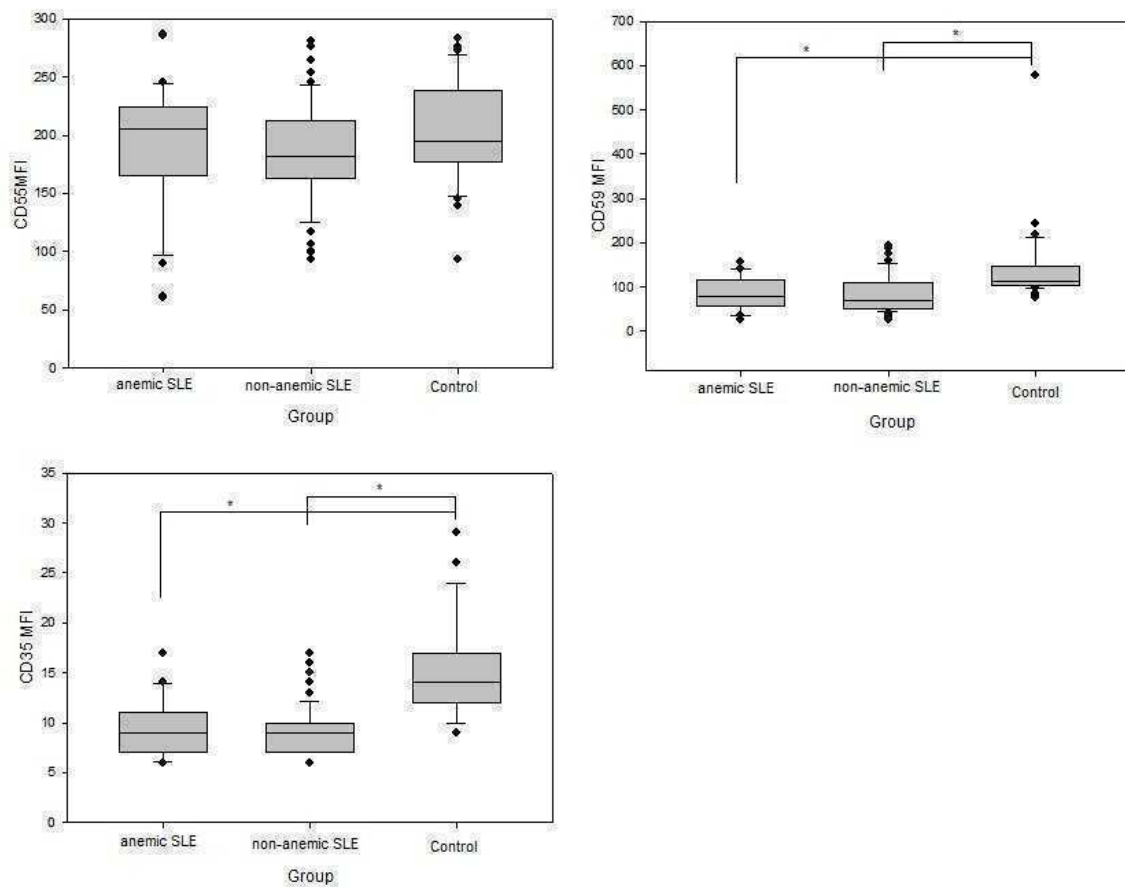


Figure 3: Creg surface expression of RBC. The figure displays mean fluorescence intensity (MFI) of CD55, CD59, CD46 and CD35 on gated RBC from SLE patients with anemia, without anemia and controls. Shown is the median and interquartile range from all subjects studied in each group.

Discussion

Our study revealed significantly lower Creg expression on several blood cells from SLE patients when compared with healthy controls, more marked in cytopenic patients, and in many cases associated with higher disease activity and lower serum

C3 and C4 levels. Although there are a few publications evaluating some of the Creg proteins in specific blood cells in SLE patients, our study is the first to encompass all the membrane bound Cregs and all blood cells in a large sample of SLE patients. This allows a clear and definitive view of the expression profile of these proteins and their relations with decreased blood cell numbers and with disease activity.

We have previously reported a decreased expression of CD55 (but not of CD59) on neutrophils from SLE patients (21), and decreased CD35 expression on neutrophils has also been shown (16, 25). In this study, besides confirming the decreased expression of CD55 and CD59, it was demonstrated that the higher the disease activity, the lower their expression on neutrophils. Furthermore, there might be a direct correlation between the lower CD55 and CD35 expression and activation of the classical complement pathway, as indicated by the lower C3 and C4 serum levels. These findings suggest that the decreased expression of Cregs may be due to their consumption trying to protect the cell against complement-mediated lysis, perhaps triggered by specific autoantibodies.

On lymphocytes, the CD55, CD59 and CD46 MFI showed significant differences between SLE and controls. Lymphopenic patients presented the lower expression of these Cregs. Similarly to our results, Garcia-Valladares (19) investigated the MFI of CD55 and CD59 in T and B lymphocytes from SLE patients with lymphopenia. Both T and B cells from lymphopenic patients showed decreased membrane expression of CD55 and CD59 when compared to controls. Tsunoda et al (20) found that the proportion of CD59 on activated T CD8⁺ lymphocytes in SLE patients was significantly reduced compared to controls and that it could be correlated with disease activity and be involved in the induced apoptosis of these cells. Our data showed that the decreased expression was unrelated to disease

activity and accumulated damage using SLEDAI and SLICC-DI, as has been reported (19, 21), but demonstrated that the lower C3 level, and consequently greater complement activation, the lower the expression of CD55 on lymphocytes in these patients.

The MFIs of CD59 and CD35 on RBC from SLE patients were significantly reduced when compared to healthy controls, but this deficiency does not seem to be associated with anemia or autoimmune hemolytic anemia (AIHA), since the non-anemic and patients with no secondary AIHA also demonstrated reduced CD59 and CD35 MFI on their red cells. Our data about the decreased CD35 expression on RBC from SLE patients corroborate the findings of the literature (12-16). Furthermore, we found that the low expression of CD35 in SLE patients was correlated with low C4 levels.

The diminished expression of CD59 on RBC from SLE patients with secondary AIHA was previously reported by Richaud-Patin et al (17). However, in contrast with our results, SLE patients with no AIHA exhibited a normal expression of these molecules. It is important to mention that the number of patients evaluated in our study with and without AIHA was 28 and 72, respectively, which is much greater than that of the study of Richaud-Patin (11 and 5).

We also observed a decreased CD35 and CD59 expression on RBC from SLE patients with nephritis (n=45) ($p < 0.001$, data not shown). This finding corroborates in part the findings of Arora et al (18), who have demonstrated that in 15 lupus nephritis patients, the expression of CD35 was significantly reduced compared to the expression on erythrocytes from normal individuals. On the other hand, these authors observed that CD55 and CD59 levels were highly elevated in RBCs, in contrast with our results.

The cause of this generally decreased expression of Creg proteins in SLE blood cells is still unclear. Richaud-Patin et al (17) have hypothesized that the diminished expression of CD55 and CD59 proteins on red cells might be due either to the impaired synthesis of the GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor or to the abnormal coupling of the protein to the membrane on red blood cell precursors. However, our findings do not support these hypotheses, since in that case the expression of Cregs would be uniformly reduced on all blood cells, while different patterns of diminished expression depending on each cell type were observed in our study.

A decline in CD35 expression at both mRNA transcript and protein level in SLE has been described and it has been suggested to be acquired (26). However, nothing is known about the factors involved in this downregulation of CD35 gene expression (27). Lach-Trifilieff et al(28) demonstrated that there is no lack of CD35 expression on young RBC (reticulocytes), in which CD35 is known to be low, and in most cases the low CD35 on RBC is due to an accelerated loss occurring in the circulation. Holme et al showed that erythrocyte CD35 numbers are reduced during periods of increased disease activity and tend to return to normal during remission (29).

The fact that there was a clear association of decreased Creg expression with disease activity, low complement levels and decreased peripheral blood cell numbers in our study indicates that the mechanism is related to the disease itself. The production of auto-antibodies against specific cell self antigens, Creg consumption and complement-mediated lysis may be the most plausible explanation, as has also been partially suggested by others studies (5, 21, 30).

The decreased expression of the Cregs may also involve other functions of these proteins. For instance, CD59 has been implicated in the process of signal transduction and T-cell activation (31), and it has been reported that CD59 cross-linking induces internalization of this molecule and endocytosis of the lymphocyte membrane (32). Another suggestion, it seems that the epitopes against which the monoclonal antibodies are directed somehow express themselves in a differential manner, depending on the cells' activation state (33).

In conclusion, it was evident that there are differences in the patterns of expression of Creg proteins on the peripheral blood cells from SLE patients, since the diminished MFI expression of all Cregs proteins were found on neutrophils cells; CD55, CD59, and CD46 on lymphocytes; CD55 on monocytes; and CD59 and CD35 on RBC. Moreover, these differences seem to correlate with disease activity, complement activation and blood cell cytopenias. The cause of the decreased expression on cell surface from SLE patients is not yet established, and the mechanisms by which cells are destroyed or sequestered remain rather obscure. We believe this is an adaptive phenomenon that happens due to a consumption of the Creg proteins when trying to prevent complement-mediated cell lysis. Moreover, the fact that each of these four hemopoietic lineages might show underexpression of Cregs independently from the others suggests the participation of different physiopathologic processes. Deeper understanding of these processes, and the role of Cregs, could be important for the development of novel therapies for the blood cell involvement in SLE and other autoimmune-mediated diseases.

Reference

1. Zipfel PF. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol Lett.* 2009 Sep 22;126(1-2):1-7.
2. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
3. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1140-4.
4. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):729-40.
5. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev.* 2007 Jan;6(3):155-61.
6. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Molecular immunology.* 2007 Jan;44(1-3):73-81.
7. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology.* 2006 Dec;119(4):522-8.
8. 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.
9. Sleasman JW. The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease. *Adv Dent Res.* 1996 Apr;10(1):57-61.
10. Alahlafi A, Wordsworth P, Wojnarowska F. Activation/inactivation of the classical pathway of complement in non-lesional skin of patients with systemic lupus erythematosus. *J Cutan Pathol.* 2005 Sep;32(8):537-40.
11. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2002 April-June;13(2):119-25.
12. Ripoche J, Sim RB. Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. *Biochem J.* 1986 May 1;235(3):815-21.
13. 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.
14. Iida K, Mornaghi R, Nussenzweig V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1982 May 1;155(5):1427-38.
15. de Carvalho Lins CE, Pereira Crott LS, Teixeira JE, Barbosa JE. Reduced erythrocyte complement receptor type 1 in systemic lupus erythematosus is related to a disease activity index and not to the presence or severity of renal disease. *Lupus.* 2004;13(7):517-21.
16. Marzocchi-Machado CM, Alves CM, Azzolini AE, Polizello AC, Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. CR1 on erythrocytes of Brazilian systemic lupus erythematosus patients: the influence of disease activity on expression and ability of this receptor to bind immune complexes opsonized with complement from normal human serum. *J Autoimmun.* 2005 Dec;25(4):289-97.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
23. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992 Jun;35(6):630-40.
24. Isenberg DA, Gladman D. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics Group--origins and outcomes. *Lupus.* 2001;10(5):375-7.
25. 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.
26. 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.
27. Arora V, Mondal AM, Grover R, Kumar A, Chattopadhyay P, Das N. Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(7):1722-8.
28. 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.
29. Holme E, Fyfe A, Zoma A, Veitch J, Hunter J, Whaley K. Decreased C3b receptors (CR1) on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1986 Jan;63(1):41-8.
30. Winfield JB, Fernsten PD, Czyzyk JK. Anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1997;108:127-35.
31. Walsh LA, Tone M, Thiru S, Waldmann H. The CD59 antigen--a multifunctional molecule. *Tissue Antigens.* 1992 Nov;40(5):213-20.

32. Deckert M, Ticchioni M, Bernard A. Endocytosis of GPI-anchored proteins in human lymphocytes: role of glycolipid-based domains, actin cytoskeleton, and protein kinases. *J Cell Biol.* 1996 May;133(4):791-9.
33. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.

Considerações Finais

Nosso estudo demonstrou que existe uma diminuição da expressão das proteínas CD55, CD59, CD46 e CD35 nas células do sangue periférico de pacientes com LES; contudo, a deficiência não ocorre de maneira igual em todas as células.

Um dos principais achados do nosso estudo foi a identificação de uma redução significativa da expressão de todas Creg em neutrófilos de pacientes com LES quando comparada com controles saudáveis. A diminuição da expressão de CD55 e CD59 correlacionou negativamente com a atividade da doença, demonstrando que quanto maior atividade da doença, menor é expressão de CD55 e CD59. Além disso, a expressão de CD55 obteve uma correlação positiva com a quantidade de C3 e C4 nestes pacientes. Estes resultados sugerem que, quanto menor o nível de C3 e C4, que está associada com a ativação do complemento, menor é a expressão de CD55. A diminuição do C4 sugere uma ativação do complemento através da via clássica.

Neste estudo, a expressão de CD55 e CD59 nos linfócitos mostrou diferenças significativas entre os pacientes LES e controles, corroborando com os principais relatos da literatura; sendo que a diferença na expressão de CD55 estava presente estatisticamente significativo apenas nos pacientes linfopênicos e apresentou uma correlação positiva com o nível de C3 nos pacientes LES. Além disso, o CD46 também estava diminuído, tanto em pacientes com e sem linfopenia. Essas diferenças não foram estatisticamente relacionadas à atividade da doença.

A expressão de CD59 e CD35 nos eritrócitos de pacientes LES mostrou significativa redução quando comparada com os controles; contudo, esta deficiência não parece estar associada com anemia ou anemia hemolítica auto-imune (AHAI)

conforme sugerido por alguns autores, pois, pacientes não-anêmicos e sem AHAI secundária também demonstraram redução de CD59 e CD35 nos eritrócitos.

Os dados obtidos na realização deste trabalho também evidenciaram uma diminuição de CD55 na membrana de monócitos; contudo, não foi identificada uma correlação com a atividade da doença nem com a ativação do complemento. Além disso, CD59, CD46 e CD35 não mostraram diferença significativa quando comparados com os controles; no entanto, outros trabalhos são necessários para confirmar estes achados, pois não foram encontrados relatos na literatura.

Nossa hipótese para esta diminuição da expressão de proteínas Cregs consiste em um mecanismo adaptativo, associado a uma maior atividade da doença, desencadeado por autoanticorpos específicos contra um antígeno celular presente na membrana das células dos pacientes LES, ativando a cascata do complemento pela via clássica e conseqüentemente diminuição destas Cregs pelo consumo na tentativa de proteger a célula contra esta lise mediada pelo complemento.

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

- a) o polimorfismo genético (alteração dos genes que codificam estas proteínas ou a quantificação dos respectivos RNAs mensageiros);
- b) a presença de anticorpos contra estas proteínas reguladoras do complemento nas células destes pacientes (produzidas devido as características da doença);

- c) se a expressão destas proteínas está correlacionadas à ativação celular (estimulação de outras funções realizadas por estas proteínas Cregs durante a resposta imune);
- d) se a expressão destas proteínas está correlacionadas mecanismos de *downregulation*;
- e) a presença de anticorpos contra antígenos específicos de cada subtipo celular acarretando em um consumo destas moléculas na membrana celular, na tentativa de proteger a célula contra o complemento.

Poucos estudos sobre o perfil de expressão de Cregs em pacientes com LES são encontrados na literatura. A deficiência adquirida destas proteínas no LES não parece ser dependente de mutações genéticas, como ocorre na HPN. Por outro lado, parece haver uma associação com a atividade da doença ou com o consumo destes marcadores devido ao aumento da ação do complemento nestes pacientes. Além disso, o papel destas proteínas na indução de citopenias do LES não está ainda bem definido. Contudo, estudos sugerem que níveis de expressão celular de Cregs abaixo do normal conferem uma baixa proteção à lise exacerbada mediada pelo complemento e podem ser uma das causas do desencadeamento da doença em pacientes com susceptibilidade genética.

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: Correlação entre o nível de expressão de CD55, CD59, CD46 e CD35e a presença de citopenias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Telefone para contato: (51) 3359-8315

O objetivo do estudo

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

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 utilizarão apenas as suas iniciais, idade e sexo como informações pessoais. Em relação à coleta de sangue, será coletada apenas uma amostra de sangue (4mL de sangue total em um tubo contendo anticoagulante EDTA) , em que será realizado um hemograma e uma análise quantitativa das moléculas CD55, CD59, CD46 e CD35 por citometria de fluxo. 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 pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese nenhuma.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Correlação entre o nível de expressão de CD55, CD59, CD46 e CD35 e a presença de citopenias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu **consentimento** a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Porto Alegre ___ de _____ de 20__.

Nome e Assinatura do paciente ou responsável:

Nome e Assinatura do pesquisador:

Anexo 2

Artigo publicado na Revista Brasileira Reumatologia:

Rev Bras Reumatol 2009;49(3):276-87

O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Ana Paula Alegretti¹, Tamara Mucenic², João Carlos Tavares Brenof³, Ricardo Machado Xavier³

RESUMO

CD55 e CD59 são proteínas de membrana ancoradas por glicosilfosfatidilinositol que apresentam propriedades reguladoras da ativação da cascata do complemento. Essa regulação ocorre através da inibição da C3 convertase pelo CD55 e prevenção da etapa final de polimerização do complexo de ataque à membrana pelo CD59. Deficiência na expressão dessas proteínas pode estar associada a uma maior ativação do sistema complemento, inclusive do complexo de ataque à membrana, levando à morte celular. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, com anemia hemolítica e linfopenia, parecem apresentar uma deficiência adquirida de CD55 e CD59. Contudo, os mecanismos que modulam essa diminuída expressão continuam desconhecidos e o seu impacto nas manifestações do lúpus eritematoso sistêmico precisa ser mais bem estudado.

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

INTRODUÇÃO

Sistema complemento

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

As evidências na literatura sugerem que o SC tem a capacidade de desempenhar função imunorregulatória importante através do seu papel na imunidade humoral,² modulação da imunidade de células T³ e regulação da tolerância para antígenos próprios nucleares.⁴ Apesar de ser bem reconhecido pelo seu papel altamente eficiente na defesa contra patógenos como bactérias, células infectadas por vírus e parasitas, o SC também vem chamando a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial de dano às células do próprio organismo.⁵

A ativação da cascata do complemento pode ser iniciada através da via clássica (dependente de anticorpo), via alternativa (espontânea), ou via da lectina (mediada pela ligação da

Recebido em 14/10/2008. Aprovado, após revisão, em 18/02/2009. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

Trabalho realizado na Unidade de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica e no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

1. Farmacêutica Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

2. Médica Reumatologista do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS

Endereço para correspondência: R. Ramiro Barcelos, 2.350, 2º andar – Serviço de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CEP 90035-003. Porto Alegre – RS. Telefone: (51) 2101-8315 E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

lectina-manose). Após a sua ativação, os fragmentos gerados do complemento atuam modulando as reações humorais e celulares, principalmente quimiotaxia e anafilaxia, através da interação desses fragmentos de ativação com receptores celulares ou pela deposição dos complexos proteicos na membrana celular.⁶

A via clássica, um potente mecanismo efetor da imunidade humoral, é ativada através da interação do componente C1 do complemento aos domínios da fração constante (FC) das imunoglobulinas (Ig) IgM ou IgG complexadas ao antígeno (complexo imune antígeno-anticorpo). O C1 é formado por três proteínas (C1q, C1r, C1s), e para que ocorra a ativação do complexo C1, pelo menos dois dos seus seis sítios globulares devem ligar-se às moléculas de Ig ligadas ao patógeno. Após essa ligação, o C1q sofre uma mudança conformacional que gera ativação do C1r e clivagem do C1s que, por sua vez, é capaz de clivar C4 e C2. O fragmento C4b liga-se à membrana celular do patógeno e permite a ligação de C2a; o complexo formado C4b2a é a C3 convertase da via clássica.^{7,8}

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo diretamente por partículas ricas em carboidratos presentes na superfície do micro-organismo invasor, envolvendo a ligação de C3b (presente de forma solúvel no plasma) e demais componentes da via alternativa: o fator B, o fator D e a properdina (fator P).⁹ O fator B consiste em uma serina protease, homóloga a C2. O fator B, após sua clivagem pelo fator D, liga-se ao C3b formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). A properdina tem a capacidade de estabilizar o complexo C3bBb, que pode clivar outras moléculas de C3.¹⁰

A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante da manose (MBL – *mannose-binding lectin*), um componente solúvel no nosso organismo, com carboidratos presentes na superfície do micro-organismo alvo. A MBL é membro da família das lectinas dependentes de cálcio e possui a estrutura semelhante ao C1q. Após sua ativação, ocorre a interação com serino-proteases associadas à MBL (MASPs – *MBL-associated serine protease*), que incluem MASP-1, MASP-2 e MASP-3, que clivam estruturas do complemento C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a) e C5 convertase (C4b2a3b).^{11,12}

Portanto, as três vias de ativação convergem para a geração de enzimas proteolíticas, denominadas C3 convertases, que clivam a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b gerado se combina com a C3-convertase, dando origem à C5-convertase, a qual cliva C5 em C5a e C5b. Os fragmentos C3a e C5a são potentes anafilatoxinas. O fragmento C5b se agrega com C6 e C7 para formar o complexo de inserção C5b-7; após esta etapa, ocorre o recrutamento de C8 e múltiplas unidades de C9 na membrana da célula-alvo, formando o complexo de ataque à membrana

(MAC – *membrane attack complex*).^{13,14} A unidade funcional do MAC (Figura 1) é um poro inserido na bicamada fosfolipídica que interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada de água, íons e pequenas moléculas para o citosol da célula-alvo, levando à sua ruptura.¹⁵

Além de uma ação efetora contra os patógenos, o complemento tem outras atividades biológicas no organismo, como opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de complexos imunes e de células apoptóticas, interface entre a imunidade inata e adaptativa, e ação pró-inflamatória. Esses efeitos ocorrem através da ligação dos produtos de ativação com receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células.^{1,6,13}

Quando o complemento é ativado por anticorpos direcionados a antígenos de origem externa, mas também eventualmente a antígenos próprios, a ativação explosiva e inespecífica da via comum final e a formação excessiva de mediadores da inflamação podem causar danos a tecidos e células autólogas. Para proteger ou conter esses danos, o SC é fortemente regulado por substâncias solúveis ou ligadas à membrana celular.¹⁶

PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55/CD59

As células normais, que são resistentes à lise autóloga mediada pelo complemento, possuem um sistema regulador do comple-

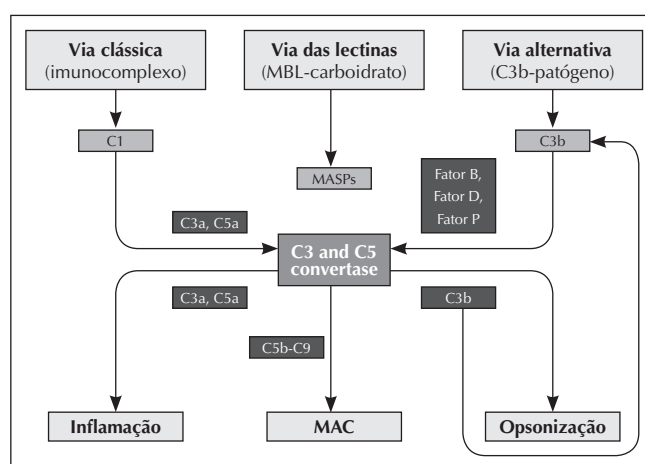


Figura 1. O complemento pode ser ativado através da via clássica, da via das lectinas e da via alternativa. O componente C1 é composto de C1q, C1r e C1s e reconhece o imunocomplexo ligado à membrana celular; a lectina ligante da manose (MBL) reconhece certos carboidratos na membrana de alguns patógenos específicos; e o C3b reconhece carboidratos presentes na membrana dos patógenos. Todas as vias de ativação originam a formação da C3 e C5 convertase, que geram as anafilatoxinas C3a e C5a, a opsonina C3b e o complexo de ataque à membrana (MAC). O C3b também amplifica a via alternativa. Figura adaptada de *Nature Reviews Immunology*.⁷⁰

mento na membrana celular constituído por proteínas, sendo as principais o CD55, o fator acelerador de degradação (DAF – *decay accelerating factor*), e o CD59, ou inibidor da lise de membrana (MIRL – *membrane inhibitor of reactive lysis*) (Tabela 1). O CD55 inibe a formação de novas C3 e C5 convertases, prevenindo a clivagem de C3 e C5, além de acelerar a degradação dessas enzimas pré-formadas.¹⁷ A proteína CD59 é o único regulador de membrana que interfere diretamente na estruturação do MAC através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8¹⁸ (Figura 2).

O CD55, revisado em Mikesch *et al.*,¹⁹ é uma glicoproteína globular ancorada à membrana celular pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI), com peso molecular que varia de 50 a 100 kDa em diferentes tipos celulares. É detectado de forma solúvel no plasma, lágrima, saliva, urina, líquido sinovial e líquido.²⁰ Além de regulador do complemento, o CD55 parece proteger as células contra a lise mediada por células matadoras naturais

Tabela 1

Principais funções inibidoras das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59:

Proteína	Função reguladora do complemento
CD55	Previne a formação de novas enzimas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação dessas enzimas pré-formadas.
CD59	Interfere na estruturação do MAC através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8.

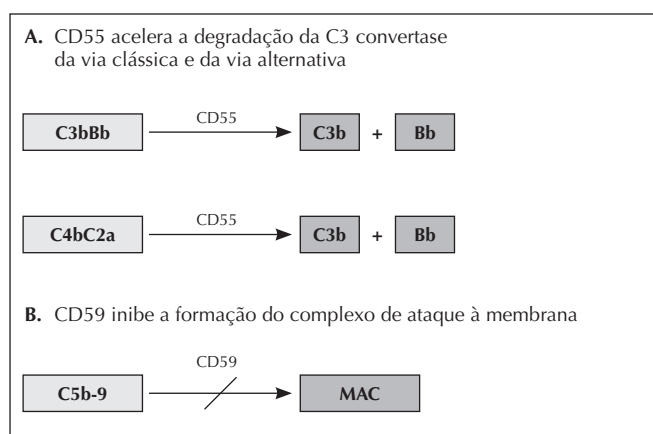


Figura 2. As glicoproteínas de membrana CD55 e CD59 regulam o sistema complemento do ataque às células do próprio organismo: CD55 promove a degradação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb) e da via clássica e da via das lectinas (C4bC2a), e também a degradação das C5 convertases (não apresentadas); o CD59 inibe a formação do MAC (C5b-9) através da inserção da molécula durante a junção dos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9 na membrana celular. Figura adaptada de *Nature Reviews Immunology*.⁷⁰

(células NK – *natural killers*). O CD55 pode também atuar como um ligante de adesão intercelular, interagindo com o CD97 nos leucócitos, e como um receptor para certos vírus e micro-organismos.²¹

O CD59, revisado por Kimberley *et al.*,¹⁶ é uma glicoproteína globular pequena, também ancorada pelo GPI, de aproximadamente 20 kDa, pertencente à família do antígeno leucocitário 6 (Ly-6). Devido ao papel crucial na prevenção de danos ao próprio organismo através da deposição inapropriada do complexo lítico MAC, essa proteína é amplamente expressa na maioria dos tecidos e em todas as células circulantes.

A consequência patológica da deficiência de reguladores do complemento presentes na membrana foi inicialmente reconhecida na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN). Essa doença hematológica adquirida foi primeiramente descrita em 1866, por William Gull, e por Paul Strubing, em 1882, como uma forma distinta de anemia hemolítica rara, associada à hemoglobinúria durante a noite.²² A HPN é caracterizada pelo aumento da lise dos eritrócitos devido à diminuição de proteínas de membrana ligada a GPI, principalmente CD55 e CD59, responsáveis por inibir a lise celular autóloga do complemento.²³

A HPN é uma desordem clonal na qual ocorre uma mutação no gene PIG-A (*fosfatidilinositolglican A*) do cromossomo X, acarretando a biossíntese anormal da âncora GPI para membrana lipídica.²² Por se tratar de uma desordem clonal nas células-tronco hematopoéticas, todas as linhagens celulares do sangue são afetadas, sendo que nos pacientes com HPN normalmente são encontradas subpopulações de células deficientes e normais. Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão as regulatórias do complemento, como CD55, CD59 e CD46 (proteína cofator de membrana); e outras proteínas envolvidas na função imune,^{24,25} como o receptor FC (CD16) em granulócitos e células NK, receptor lipopolissacarídeo (CD14) em monócitos, molécula de adesão celular (CD58) em todas as células hematopoéticas e o CD24 em linfócitos, com atividade ainda desconhecida.

Há poucos relatos na literatura sobre o padrão de expressão normal dessas proteínas nas células sanguíneas. Araten *et al.*,²⁶ em 1999, e Hu *et al.*,²⁷ em 2005, demonstraram que clones com mutação no gene da PIG-A são encontrados em indivíduos normais. Oelschlaegel *et al.*,²³ em 2001, analisaram por citometria de fluxo (CF) amostras de sangue de 52 doadores saudáveis e observaram 3% de deficiência de CD55/CD59 nos eritrócitos e granulócitos normais. A deficiência isolada de CD55 em humanos não foi associada à hemólise intravascular ou a outra evidência de falha na regulação do complemento. Contudo, a deficiência isolada de CD59 esteve associada a sinais e sintomas semelhantes à HPN²⁸ devido ao fato de o CD59 ser um inibidor

mais efetivo do complemento, pois bloqueia a formação do complexo de ataque à membrana.

A deficiência de CD55 e CD59 tem sido estudada em outras doenças e correlacionada com sua gravidade.²⁹⁻³⁶ Yamaguchi *et al.*,³⁷ demonstraram que 28,6% dos pacientes com anemia aplásica (AA) e 27,8% dos pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) apresentaram uma população deficiente de CD59 nos eritrócitos. Wang *et al.*³⁸ observaram uma diminuição significativa de CD55 e CD59 em 52% dos neutrófilos de pacientes com AA não tratados. Essa deficiência acarreta processos hemolíticos mediados pelo complemento semelhantes aos encontrados na HPN.

Isoda *et al.*,³⁹ em 2007, avaliaram 40 indivíduos saudáveis por citometria de fluxo como controle para avaliar se pacientes com DLLG (doença linfoproliferativa de linfócitos granulares) compartilhavam um fenótipo HPN. O valor de corte (*cutoff*) obtido para a proporção de células negativas em indivíduos saudáveis foi abaixo de 0,04% em granulócitos e abaixo de 0,07% nos eritrócitos, tanto para CD55 como para CD59. As células dos pacientes com DLLG não demonstraram alteração da expressão de CD55 e CD59, com exceção dos linfócitos granulares com fenótipo CD16+CD56-, os quais apresentaram deficiência dessas proteínas.

A resistência de células cancerígenas à lise mediada pelo complemento é uma das estratégias adquiridas por essas células, caracterizando um obstáculo no desenvolvimento de imunoterapias baseadas em anticorpos antitumor que fixam complemento.⁴⁰ Recentemente, estudos avaliaram a superexpressão de proteínas reguladoras do complemento em células e tecidos como um mecanismo de defesa celular contra um ataque exacerbado do sistema complemento.⁴¹⁻⁴⁵ Esse mecanismo pode gerar resistência a drogas utilizadas na imunoterapia com ação mediada pelo complemento, como é o caso do rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico direcionado à molécula CD20, que promove a depleção de linfócitos B. Acredita-se que um dos mecanismos de ação seja a sinalização e indução de apoptose da célula B mediada pelo complemento. Esta droga tem sido cada vez mais utilizada como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B (especialmente linfomas) e doenças autoimunes.⁴⁶⁻⁴⁹

PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55/CD59 EM DOENÇAS AUTOIMUNES

Os recentes estudos em modelos animais de doenças autoimunes concomitante com a remoção de proteínas reguladoras do complemento, através da adição de anticorpos monoclonais ou

da deleção gênica,⁵⁰⁻⁵³ têm avaliado o papel do CD55 e CD59 nas células do organismo.⁵⁴

Dentre as patologias estudadas neste contexto está a esclerose múltipla (EM), que é uma das doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC), mais frequentemente em adultos jovens. Sua etiologia é ainda desconhecida, mas há evidências de formação de autoanticorpos contra antígenos presentes na camada de mielina. Na EM, a perda de mielina (desmielinização) interfere na transmissão dos impulsos, provocando sintomas variados da doença.⁵⁵ Alguns experimentos com deficiência gênica de CD55 e CD59^{50,51} em modelo de encefalomielite autoimune experimental (modelo animal para estudos de EM) têm demonstrado que esses animais apresentaram um grau mais grave da doença quando comparados aos controles. Mead *et al.* também reportaram que ratos deficientes de C6, incapazes de formar o MAC, não apresentaram dano de axônio nem desmielinização, e as manifestações clínicas foram menos intensas.⁵⁶

Os autoanticorpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA – *anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*) são antiproteínas citoplasmáticas específicas de neutrófilos e monócitos, sendo a mieloperoxidase e a proteinase 3 os principais antígenos-alvo em pacientes com vasculites e glomerulonefrites. Xiao *et al.*⁵⁷ sugerem que a estimulação de neutrófilos por ANCA causa a liberação de fatores que ativam o complemento através da via alternativa, levando a amplificação inflamatória da doença. Matsuo *et al.*⁵⁸ relataram que a neutralização com anticorpos monoclonais anti-CD59 em células renais de ratos confere uma exacerbação da doença em modelos experimentais de glomerulonefrite.

Na miastenia grave (mg) o sistema imune produz anticorpos contra os receptores nicotínicos de acetilcolina localizados na junção neuromuscular, impedindo a ativação muscular. Sugere-se que haja participação do sistema complemento na patologia da mg com base na identificação de produtos de ativação do complemento no plasma e depósito na placa motora dos pacientes.⁵⁹ Kaminski *et al.* demonstraram em estudos com camundongos que o aumento da expressão de CD55 e CD59 protege contra a perda de receptores de acetilcolina e diminui o sintoma de fraqueza muscular.³¹

O PAPEL DO COMPLEMENTO E DAS PROTEÍNAS CD55/CD59 EM CITOPENIAS SECUNDÁRIAS AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente mulheres jovens. É caracterizada por acometer múltiplos órgãos e apresentar alterações da resposta imunológica, com presença de anticorpos dirigidos

contra proteínas do próprio organismo.⁶⁰ Anormalidades hematológicas são comumente encontradas em pacientes com LES, sendo anemia e linfopenia as alterações mais frequentes.⁶¹⁻⁶³ A anemia de doença crônica, por deficiência de ferro, e a anemia hemolítica autoimune (AHAI) são as formas mais comuns em pacientes com LES, podendo ocorrer ainda mielotoxicidade induzida por drogas e anemia devido à falência renal crônica.⁶⁴ A linfopenia está presente particularmente durante a doença ativa e é fortemente associada a crioglobulinas IgM, fixação do complemento e anticorpos antilinfócitos. Autoanticorpos direcionados contra as células sanguíneas podem causar lise celular por mecanismos de citotoxicidade dependente de anticorpo, opsonização, bloqueio de receptores e apoptose, entre outros.⁴²

Os anticorpos produzidos nas doenças autoimunes podem se ligar a antígenos de superfícies celulares ou formar complexos imunes após a ligação com antígenos circulantes. Esses complexos imunes tendem a se depositar em órgãos, como o glomérulo renal, com subsequente ativação do sistema complemento através da via clássica, causando dano aos tecidos.⁶ Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos órgãos em doenças autoimunes, pouco se conhece sobre o mecanismo das proteínas reguladoras de membrana do complemento na modulação da gravidade desse dano.⁶⁵

Um trabalho publicado por Miwa *et al.*⁶⁶ demonstrou 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. Esses animais apresentaram linfadenopatia e esplenomegalia acentuadas, maiores níveis de anticorpos anticromatina e dermatite mais grave do que os controles.

Pouco se tem estudado até hoje sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 nos linfócitos e eritrócitos de pacientes com LES,⁶⁷ e nenhum estudo avaliou expressão nos granulócitos e monócitos. Richaud-Patin *et al.*,⁶⁸ por exemplo, avaliaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 na membrana de eritrócitos de pacientes com AHAI, e foi encontrada uma redução destas proteínas nos eritrócitos de pacientes lúpicos que apresentam AHAI secundária. Nesse estudo, os autores avaliaram a presença de anticorpos antifosfolípidios IgG e IgM, e não foi encontrada nenhuma correlação entre a presença dessas imunoglobulinas e a expressão de CD55 e CD59.

Posteriormente, os mesmos autores⁴² investigaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 em linfócitos T e B de pacientes com LES com e sem linfopenia e demonstraram que as células de pacientes com linfopenia apresentavam diminuição de expressão de CD55 e CD59 quando comparados com os controles. De maneira interessante, encontraram que, nos pacientes com LES que não apresentaram linfopenia, os

linfócitos apresentavam maior intensidade dessas proteínas do que os controles. Outro achado do estudo é que a titulação dos autoanticorpos testados (anti-SSA, anti-dsDNA e anti-P ribossomal) foi maior nos pacientes linfopênicos. Contudo, a prevalência de positividade dos anticorpos foi igual, com exceção do anti-SSA, que foi significativamente maior no grupo dos pacientes com linfopenia, achados que corroboram os relatos previamente na literatura.^{63,65,67,68}

Com o objetivo de avaliar a apoptose *in vitro* nas doenças autoimunes, Tsunoda *et al.*⁶⁹ observaram uma expressão diminuída de CD59 nos linfócitos T CD8+, mas não em linfócitos T CD4+, tanto nos pacientes com LES quanto nos pacientes com síndrome de Sjögren, e de forma predominante nas células T CD8+ ativadas expressando CD45RO+ e HLADR+. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que células T CD8+CD59^{dim} (baixa expressão) foram mais suscetíveis à apoptose *in vitro*. De acordo com os dados encontrados nesse estudo, os autores sugerem que a diminuição da expressão de CD59 em células T CD8+ ativadas poderia se relacionar com a atividade da doença e a ativação ou indução da apoptose nesses pacientes.

Arora *et al.*⁴³ avaliaram a expressão de CR1 (receptor 1 do complemento), CD55 e CD59 em eritrócitos e células do glomérulo de pacientes lúpicos com glomerulonefrite proliferativa difusa (GPD); a expressão de CR1 estava diminuída nos pacientes com LES e GPD, tanto nos eritrócitos, quanto nas células do glomérulo, e, de forma interessante, CD55 e CD59 estavam aumentados nessas células. Os autores sugerem que esse aumento de CD55 e CD59 acontece por compensação da expressão reduzida de CR1 (regulador do complemento C3 e C5 convertase) e como uma tentativa da célula para se proteger contra a ação do complemento.

CONCLUSÃO

Poucos estudos sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 em pacientes com LES são encontrados na literatura. A deficiência adquirida dessas proteínas no LES não parece ser dependente de mutações genéticas, como ocorre na HPN, e também não foi correlacionada à produção de autoanticorpos. Por outro lado, parece haver uma associação com a atividade da doença. Além disso, o papel destas proteínas na indução de citopenias do LES não está ainda bem definido. Contudo, estudos sugerem que níveis de expressão celular de CD55 e CD59 abaixo do normal conferem uma baixa proteção à lise exacerbada mediada pelo complemento. De maneira interessante, células que expressam níveis elevados dessas proteínas parecem estar envolvidas com mecanismo de proteção às ações citolíticas do complemento.

REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(14):1058-66.
2. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J *et al*. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(8):3357-61.
3. Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, Dohmen KM, Schlichting J, Tretter T *et al*. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat Immunol* 2001;2(8):739-45.
4. Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 2000;74:61-88.
5. Welch TR. Complement in glomerulonephritis. *Nat Genet* 2002;31(4):333-4.
6. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(15):1140-4.
7. Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* 1987;5:21-42.
8. Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt* 1993;(93):138-47.
9. Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem J* 1988;252(1):47-54.
10. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002;13(2):119-25.
11. Monticelo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27(4):413-9.
12. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T *et al*. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 2001;15(1):127-35.

13. Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 2000;49(1-2):187-98.
14. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends in immunology* 2002;23(2):61-4.
15. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989;264(1):1-14.
16. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Molecular immunology* 2007;44(1-3):73-81.
17. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 1989;7:35-58.
18. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D *et al.* CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol* 2002;539(Pt 2):537-45.
19. Mikesch JH, Buerger H, Simon R, Brandt B. Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766(1):42-52.
20. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* 1987;165(3):848-64.
21. Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 1996;184(3):1185-9.
22. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455(2-3):269-86.
23. Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainty D, Nowak R, Naumann R *et al.* A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(2):81-90.
24. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989;84(1):7-17.
25. 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.
26. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(9):5209-14.
27. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005;105(10):3848-54.
28. Motoyama N, Okada N, Yamashina M, Okada H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol* 1992;22(10):2669-73.
29. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Konstantopoulos K, Komninaka V *et al.* Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia (Budap)* 2001;31(1):7-16.
30. Azenishi Y, Ueda E, Machii T, Nishimura J, Hirota T, Shibano M *et al.* CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1999;104(3):523-9.
31. Kaminski HJ, Kusner LL, Richmonds C, Medof ME, Lin F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Exp Neurol* 2006;202(2):287-93.
32. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V *et al.* Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol* 2002;75(1):40-4.
33. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V *et al.* Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001;2(1):33-7.
34. Ruiz P, Weppel D, Tryphonopoulos P, Nishida S, Moon J, Kato T *et al.* CD55 and CD59 deficiency in transplant patient populations: possible association with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-like symptoms in Campath-treated patients. *Transplant Proc* 2006;38(6):1750-2.
35. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M *et al.* Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107(4):1308-14.
36. Yang LB, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2000;20(20):7505-9.
37. Yamaguchi M, Machii T, Azenishi Y, Nishimura J, Shibano M, Kanakura Y *et al.* Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26(3):247-54.
38. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H *et al.* Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 2001;66(3):200-5.
39. Isoda A, Tsukamoto N, Mitsui T, Yamane A, Hatsumi N, Matsushima T *et al.* Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29(1):52-7.
40. Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2000;26(4):269-86.
41. Li SH, Szmítko PE, Weisel RD, Wang CH, Fedak PW, Li RK *et al.* C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 2004;109(7):833-6.
42. 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.
43. 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.
44. Cuida M, Legler DW, Eidsheim M, Jonsson R. Complement regulatory proteins in the salivary glands and saliva of Sjogren's syndrome patients and healthy subjects. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(6):615-23.

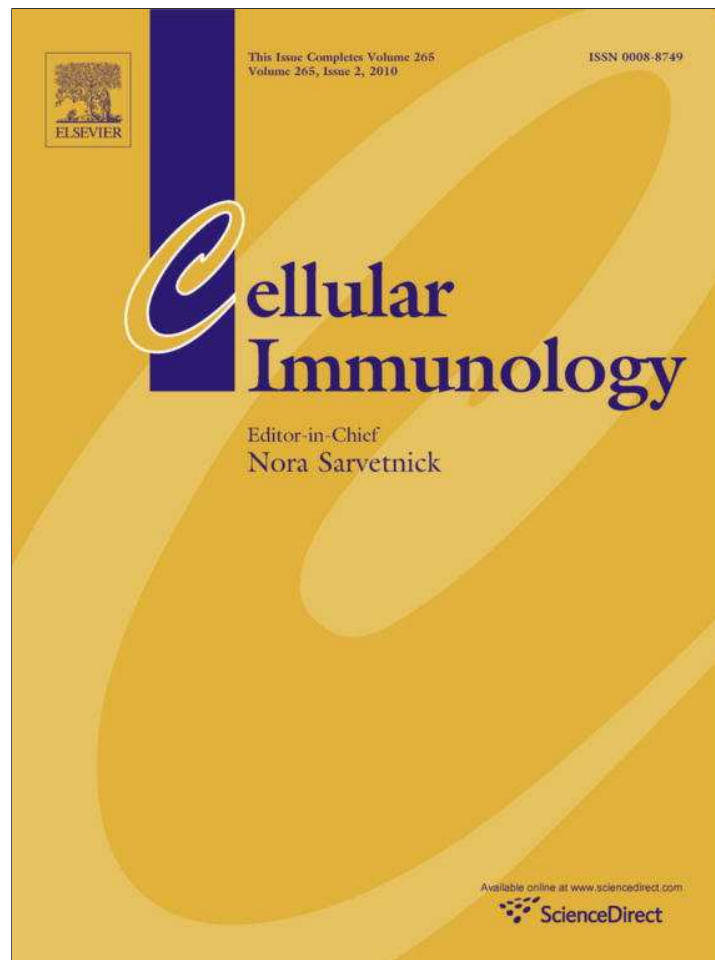
45. Qin C, Cai XY. [Research progression on complement regulatory proteins CD46, CD55, and CD59 in tumor immunotherapy]. *Ai Zheng* 2006;25(11):1450-3.
46. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T *et al.* CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001;98(12):3383-9.
47. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S *et al.* Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000;95(12):3900-8.
48. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res* 2006;30(5):625-31.
49. Thatayatikom A, White AJ. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006;5(1):18-24.
50. Mead RJ, Neal JW, Griffiths MR, Linington C, Botto M, Lassmann H *et al.* Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 2004;84(1):21-8.
51. Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD *et al.* The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med* 2005;201(4):567-77.
52. Tuzun E, Saini SS, Morgan BP, Christadoss P. Complement regulator CD59 deficiency fails to augment susceptibility to actively induced experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006;181(1-2):29-33.
53. Lin F, Salant DJ, Meyerson H, Emancipator S, Morgan BP, Medof ME. Respective roles of decay-accelerating factor and CD59 in circumventing glomerular injury in acute nephrotoxic serum nephritis. *J Immunol* 2004;172(4):2636-42.
54. Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP. Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria. *Blood* 2001;98(2):442-9.
55. Lutterotti A, Berger T, Reind LM. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2007;14(18):1956-65.
56. Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002;168(1):458-65.
57. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007;170(1):52-64.
58. Matsuo S, Nishikage H, Yoshida F, Nomura A, PiddLesden SJ, Morgan BP. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats. *Kidney Int* 1994;46(1):191-200.
59. Chamberlain-Banoub J, Neal JW, Mizuno M, Harris CL, Morgan BP. Complement membrane attack is required for endplate damage and clinical disease in passive experimental myasthenia gravis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):278-86.
60. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369(9561):587-96.
61. Keeling DM, Isenberg DA. Haematological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Blood Rev* 1993;7(4):199-207.
62. Nossent JC, Swaak AJ. Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1991;80(291):605-12.
63. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Tueting T, Bieber T. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: close in vivo association to autoantibodies targeting nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2004;150(5):994-8.
64. Voulgarelis M, Kokori SI, Ioannidis JP, Tzioufas AG, Kyriaki D, Moutsopoulos HM. Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis* 2000;59(3):217-22.
65. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006;118(2-3):127-36.
66. Miwa T, Maldonado MA, Zhou L, Sun X, Luo HY, Cai D *et al.* Deletion of decay-accelerating factor (CD55) exacerbates autoimmune disease development in MRL/lpr mice. *Am J Pathol* 2002;161(3):1077-86.
67. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007;6(3):155-61.
68. 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. *Immunology letters* 2003;88(2):95-9.
69. Tsunoda S, Kawano M, Koni I, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T *et al.* Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2000;51(3):293-9.
70. Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):9-18.

Anexo 3

Artigo publicado na Revista Cellular Immunology

Cellular Immunology 265 (2010) 127–132

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycimm

Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients

A.P. Alegretti^{a,*}, T. Mucenic^b, J. Merzoni^c, G.A. Faulhaber^d, L.M. Silla^e, R.M. Xavier^b

^a Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^b Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^d Serviço de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^e Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2010

Accepted 26 July 2010

Available online 2 August 2010

Keywords:

Systemic lupus erythematosus

SLE

CD55

CD59

Lymphopenia

Cytopenias

Complement system

GPI

Flow cytometry

Immunophenotyping

ABSTRACT

CD55 and CD59 are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins with complement inhibitory properties. CD55 inhibits the formation of C3 convertases, and CD59 prevents the terminal polymerisation of the membrane attack complex. It has been reported that SLE patients seem to have an acquired deficiency of these proteins associated with secondary autoimmune haemolytic anaemia and lymphopenia. The aim of this study was to evaluate the presence of altered CD55 and CD59 expression on peripheral blood cells from SLE patients. Flow cytometric analyses were performed on red and white blood cells from 23 SLE patients and 23 healthy controls. We observed more CD55- and CD59-lymphocytes ($p = 0.005$ and $p = 0.019$, respectively), and CD59-granulocytes ($p = 0.045$) in SLE patients than in controls. These results suggest there is an altered pattern of CD55 and CD59 expression on the peripheral blood cells of SLE patients, and it may play a role in the cytopenias in these patients.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

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

pear to mediate tissue damage initiated by autoantibodies in many immune diseases [3,4].

Normal cell membranes express many proteins that regulate activation of the complement system and provide essential protection against damage to self [5]. These proteins are known as complement regulatory (Creg) proteins. There are three major human cell surface Creg proteins: CD46 (membrane cofactor protein), which facilitates C3b and C4b inactivation [6], CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis – MIRL), which is a complement membrane inhibitor that blocks assembly of the MAC by binding to C8 and C9 [7]; and CD55 (decay accelerating factor – DAF), that accelerates the disassembly of preformed C3 and C5 convertases [8]. It has been reported that the production and the expression of some of the regulatory proteins are altered in autoimmune diseases and that inherited deficiencies of the complement system components are associated with a high prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE), glomerulonephritis, and vasculitis [9–11].

SLE is a multisystem autoimmune connective tissue disorder with a broad range of clinical presentation and a variable course and prognosis [12], where B cells produce antibodies directed against self-antigens, forming immune complexes that are deposited on tissues [13,14]. The complement system is integrally

* Corresponding author. Address: Serviço de Patologia Clínica do, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350–2º andar, Bairro Bom Fim, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil.

E-mail address: anaalegretti@gmail.com (A.P. Alegretti).

involved in the pathogenesis of tissue injury in SLE. Tissue deposition of immunoglobulin is a characteristic feature of SLE and can cause continued complement activation by the classical pathway [10].

Some SLE patients seem to have an acquired deficiency of CD55 and CD59 proteins and it has been associated with secondary autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) and lymphopenia [15,16]. Richaud-Patin et al. [15] found a diminished expression of CD55 and CD59 on red cells from several SLE patients with secondary AIHA. Garcia-Valladares et al. [16] demonstrated that T and B cells from lymphopenic SLE patients have decreased CD55 and CD59 mean fluorescence intensity (MFI). Lymphopenia and anaemia are the most frequent haematological findings in this disease [17,18]. Although the cause is unclear, autoantibodies against lymphocyte and red cell surface molecules, and consequent cell lysis by complement unspecific activation, could be an explanation for these manifestations [15,16,19]. Otherwise, the over expression of these regulatory proteins may exert a protective effect against complement-mediated injury [20]. Neutropenia is also common in SLE patients but there are no studies evaluating CD55/CD59 expression on these cells.

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

2. Material and methods

2.1. Subjects

Twenty-three patients that fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria [21] for SLE and 23 age- and sex-matched healthy controls with no history of autoimmune diseases were included in the present study. These patients were seen during their routine follow-up visits in the outpatient clinic of the Serviço de Reumatologia of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The exclusion criteria were concomitant presence of leukaemia, primary lymphoproliferative diseases, overlap with an autoimmune disease other than Sjögren's syndrome, and refusal to consent. Peripheral blood samples were collected in Na-EDTA Vacutainer tubes, and all SLE patients were receiving an immunosuppressive drug at the time of blood collection. Lymphopenia was defined as <1500 cells/ μL , anaemia was defined as the reduction of haemoglobin below 12.0 g/dL, and thrombocytopenia was defined as the reduction of platelets below $150,000/\mu\text{L}$.

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

2.2. Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 membrane in leucocytes

For red blood cell (RBC) staining, 100 μL of diluted blood (with an optimal dilution with phosphate buffered saline (PBS) to achieve $10,000$ red cells/ μL) was placed into polystyrene tubes (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Diego, CA, USA) and was subjected to two-colour staining with 3 μL /test of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD55FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil), CD59PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD14PE (BD Biosciences, San Diego, CA,

USA), and anti-CD45FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil). After 20 min incubation at room temperature, samples were re-suspended in 0.5 mL of PBS; and cells were analysed on the flow cytometer.

For leucocyte staining, 100 μL of whole blood (with an optimal dilution to achieve $10,000$ leucocyte/ μL) was placed into polystyrene tubes and was subjected to two-colour staining with 3 μL of each antibody of fluorochrome-conjugated MoAbs against CD55FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil), CD59PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD14PE and anti-CD45FITC (FK-Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil). After 15 min incubation at room temperature, 1.0 ml of FACSlyse (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was added and RBC lysis was allowed for 10 min at room temperature. Samples were washed once and re-suspended in 0.5 mL of PBS.

Cells were analysed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Membrane intensity of CD55 and CD59, which is proportional to the number of CD55 and CD59 epitopes on the membrane, was estimated in the gated subpopulations by one-parameter histograms and the relative mean fluorescence intensity (MFI) was recorded. A pattern of flow cytometry assay from a control is showed in Fig. 2. The negative expression of CD55 (CD55-) and CD59 (CD59-) was defined when cells in the gated subpopulations had FITC and PE fluorescence lower than 10^1 . 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.

2.3. Statistics

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

3. Results

The description of the 23 patients and 23 healthy controls is summarised on Table 1. Eleven of the 23 SLE patients (47.8%) had lymphopenia (lymphocytes < 1500 cells/ μL); and seven of the 23 SLE patients (30.4%) had anaemia (haemoglobin < 12.0 g/dL), five of the 23 SLE patients (21.7%) had thrombocytopenia (platelets $< 200,000/\mu\text{L}$) and one of the 23 SLE patients (4.3%) showed granulopenia (granulocytes $< 1500/\mu\text{L}$).

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

3.1. Red blood cell analyses

The proportion of CD55+ (97.88%) and CD59+ (98.84%) red cells from SLE patients did not differ significantly when compared with controls (96.83% and 99.90%, respectively); (Table 2). Nevertheless, the MFI of CD55 on SLE red cells was significantly reduced when compared to the expression on red cells from controls (124.27 versus 181.90), ($p < 0.001$) (Table 3). This reduction was observed both in anaemic (7/23) and non-anaemic patients, with (6/23) or

Table 1
Description of SLE patients and healthy controls.

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

^a SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index.

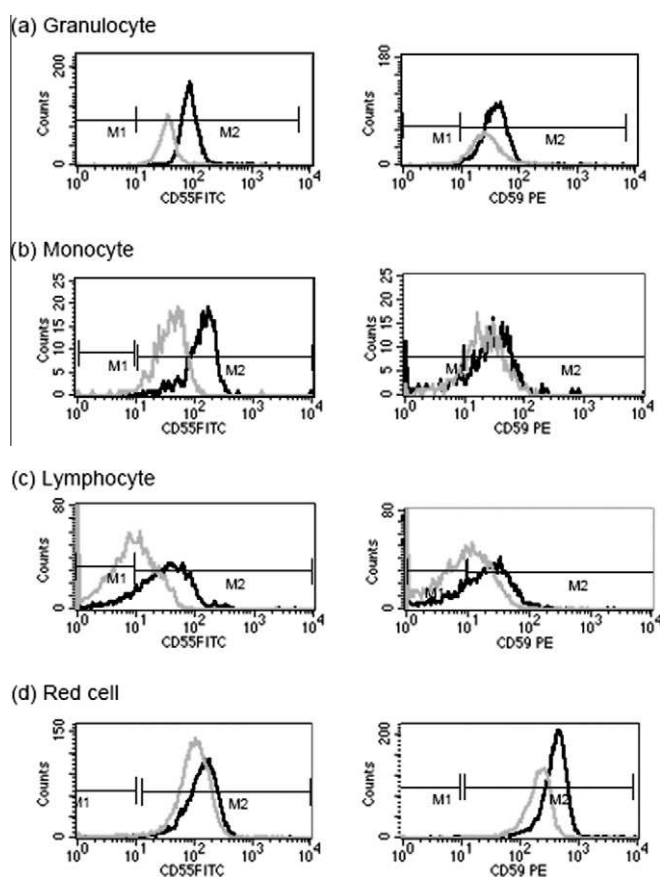


Fig. 1. A patterns of histogram MFI CD55FITC and CD59PE expressions on specific peripheral blood cells versus counted cells from a control (black line) and SLE patient (grey line).

without AIHA. The MFI of CD59 on red cells showed no significant differences between the groups (Table 3). There was no association of the CD55 and CD59 expression on red cells and the SLEDAI scores.

3.2. Lymphocyte analyses

In SLE patients, the proportions of CD55+ (72.71%) and CD59+ (63.96%) lymphocytes were significantly lower than that of healthy

controls (85.86% and 73.49%, $p = 0.005$ and $p = 0.019$, respectively) (Table 2). Patients with lymphopenia (11/23) had a significantly lower proportion of CD55+ and CD59+ lymphocyte when compared to respective controls ($p = 0.022$ and $p = 0.029$, respectively), while the non-lymphopenic patients had no difference ($p = 0.090$ and $p = 0.180$), (data not shown). The CD55 and CD59 MFI on lymphocytes also showed significant differences between SLE and controls. In SLE patients, the CD55 MFI (32.6) and CD59 MFI (12.13) lymphocytes were significantly lower than that of healthy controls (40.7 and 22.9, $p = 0.007$ and $p = 0.046$, respectively) (Table 3). There was no association of the CD55 and CD59 expression and SLEDAI scores.

3.3. Granulocyte and monocyte analyses

The proportion of CD59+ granulocytes in the SLE patients (94.5%) was significantly reduced compared to controls (97.26%) ($p = 0.045$). There was an inverse correlation between the proportion of CD59+ granulocytes and the SLEDAI scores ($r = -0.48$, $p = 0.028$), in which a lower proportion of CD59+ granulocytes was shown in patients with higher disease activity. The CD55 MFI was also significantly reduced on granulocytes when compared to the expression from controls ($p = 0.014$). In the single SLE patient with granulopenia a reduced proportion of CD59 on the granulocytes was found (76.74%) when compared to respective control (99.98%), and that result was eight standard deviations below the mean of the controls (97.27%).

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

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

4. Discussion

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

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

Richaud-Patin et al. evaluated the MFI of CD55 and CD59 on red cells from patients with AIHA, they found a diminished expression of CD55 and CD59 on red cells from several SLE patients with secondary AIHA [15]. However, SLE patients with no-AIHA exhibited a normal expression of these molecules. They hypothesised that the diminished expression of these proteins on red cells in these patients might be due either to the impaired synthesis of the GPI anchor, or to the abnormal coupling of the protein to the membrane on red blood cell precursors. However, our data do not support that there is a constitutive impaired synthesis of the GPI anchor, since in that case, CD55 and CD59 would be uniformly re-

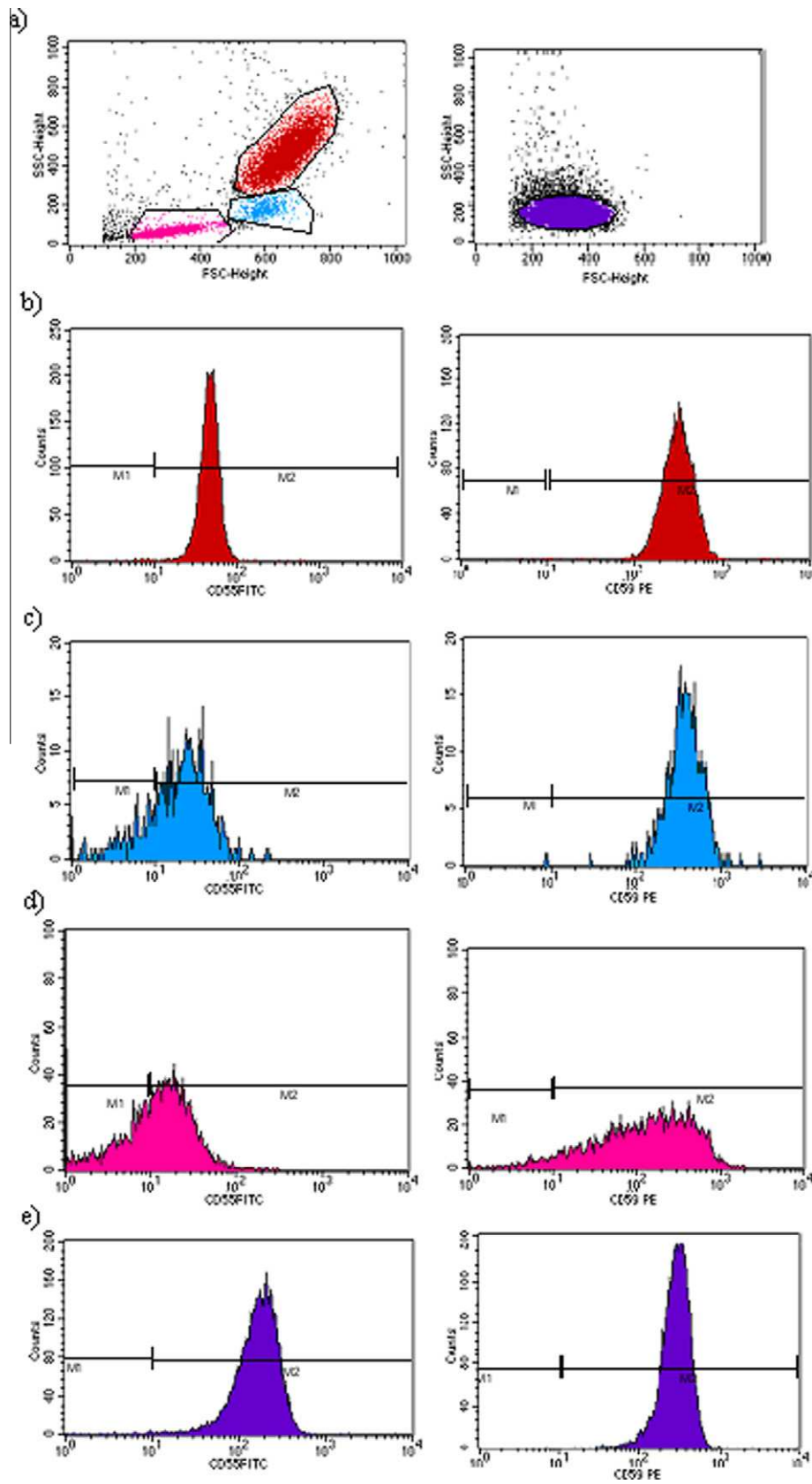


Fig. 2. A pattern of flow cytometry assay from a control. (a) Cells distribution by forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). Red population: granulocytes cell; blue population: monocytes cells; pink population: lymphocytes cells; and purple population: red blood cells. (b) Histogram CD55FITC and CD59PE MFI expressions versus counted cells from granulocytes gate; (c) histogram CD55FITC and CD59PE MFI expressions versus counted cells from monocytes gate; (d) histogram CD55FITC and CD59PE MFI expressions versus counted cells from lymphocytes gate; and (e) histogram CD55FITC and CD59PE MFI expressions versus counted cells from red blood cells gate.

Table 2Proportion (mean percentage) of CD55+ and CD59+ cells (FITC and PE fluorescence lower than 10¹) in SLE patients and controls.

	Blood cell	SLE patient (n = 23)	SD	Controls (n = 23)	SD	Significant (two-tailed)
CD55+ (%)	Red cell	97.88	(1.6)	96.83	(3.2)	<i>p</i> = 0.243
	Lymphocyte	72.71	(16.4)	85.86	(8.2)	<i>p</i> = 0.005 ^a
	Granulocyte	99.01	(0.27)	99.93	(0.12)	<i>p</i> = 0.400
	Monocyte	98.98	(2.3)	99.69	(0.3)	<i>p</i> = 0.167
CD59+ (%)	Red cell	98.84	(2.8)	99.90	(0.2)	<i>p</i> = 0.089
	Lymphocyte	63.96	(13.8)	73.49	(10.3)	<i>p</i> = 0.019 ^a
	Granulocyte	94.50	(5.8)	97.26	(2.9)	<i>p</i> = 0.045 ^a
	Monocyte	90.22	(6.7)	90.72	(7.7)	<i>p</i> = 0.806

^a Significant statistical difference (*p* < 0.05).**Table 3**

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

	Blood cell	SLE patient (n = 23)	SD	Controls (n = 23)	SD	Significant (two-tailed)
CD55 (MFI)	Red cell	124.27	(33.7)	181.90	(23.4)	<i>p</i> < 0.001 ^a
	Lymphocyte	32.6	(21.5)	40.7	(14.6)	<i>p</i> = 0.007 ^a
	Granulocyte	66.10	(20.6)	83.95	(23.4)	<i>p</i> = 0.014 ^a
	Monocyte	122.95	(53.9)	125.45	(35.8)	<i>p</i> = 0.866
CD59 (MFI)	Red cell	332.72	(80.0)	324.45	(46.4)	<i>p</i> = 0.626
	Lymphocyte	12.13	(8.3)	22.90	(12.1)	<i>p</i> = 0.046 ^a
	Granulocyte	29.50	(11.6)	34.72	(20.4)	<i>p</i> = 0.338
	Monocyte	32.77	(12.5)	33.09	(17.2)	<i>p</i> = 0.941

^a Significant statistical difference (*p* < 0.05).

duced on all other blood cells, and different patterns of diminished expression depending on each cell type were observed. Moreover, monocyte CD14 expression, marker that is also GPI-anchored membrane protein, was not reduced on the SLE blood cells (data not shown). Therefore, further studies are needed to address the possible causes of this deficiency. The activation status of each cell type could be a possible explanation for these differences.

In this study, the CD55 and CD59 MFI on the lymphocytes showed significant differences between SLE and controls. These differences were unrelated to disease activity or therapy. Similarly to our results, Garcia-Valladares et al. [16] investigated the MFI of CD55 and CD59 in T and B lymphocytes from SLE patients with lymphopenia. Both T and B cells from lymphopenic patients showed decreased membrane expression of CD55 and CD59 when compared to controls. Another interesting observation was that lymphocytes from non-lymphopenic SLE patients had increased expression of both molecules when compared to controls. They concluded that the altered expression of CD55 and CD59 seems to be associated to the disease manifestation.

It was also observed in the current study that the proportion of CD55+ and CD59+ lymphocytes in SLE patients was significantly reduced compared to controls, indicating that SLE patients might have an increased number of cells without CD55 and CD59 expression. This decrease of CD55+ and CD59+ lymphocytes was associated with lymphopenia in SLE patients and we do not find any other report on the literature. The reason by which these Creg are not expressed in more lymphocytes from SLE patients, and the possible correlation with lymphopenia need to be further explored.

Tsunoda et al. [24] found that the proportion of CD59+ activated CD8+ lymphocytes in SLE patients was significantly reduced compared to controls and that it may be correlated with disease activity and may be involved in induced apoptosis of these cells. Anti-lymphocyte antibodies are believed to be responsible for the decreased cell numbers, probably through antibody-dependent cellular cytotoxicity, opsonization, surface receptor-blockade, and apoptosis. Complement-mediated lysis is perhaps the most plausible explanation by which antibodies against lymphocyte self-antigens cause cellular depletion [19].

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

Complement regulatory proteins might have a controversial role in innate immunity and, more recently, adaptive immunity. Besides its function as a complement system regulator, CD55 also appears to inhibit natural killer cells (NKcells) [25]. Moreover, DAF is also known as a receptor for certain viruses and microorganisms and as a ligand of the CD97 receptor [26,27]. There has been much research attributing CD59 a role in T-cell activation and signalling [7]. Van den Berg et al. [28] demonstrated in neutrophils that specific tyrosine kinases are activated in response to CD59 cross-linking; and further, Murray and Robbins [29] showed that CD59 activation on T-cells specifically led to phosphorylation of the TCRg/ZAP70 subunit.

In this study, it was evident that there are differences in the patterns of expression of CD55 and CD59 on the peripheral blood cells from SLE patients, since the diminished MFI expression or a decreased proportion of CD55+ and CD59+ cells were not found on all blood cells of the same patient. We found a decreased expression of CD55 and/or CD59 on lymphocytes, RBC, granulocytes, but not on monocytes. We believe this happened due to a variation on the expression that can occur on CD55 and/or CD59 depending on the activation status of these cells, or because of the production of autoantibodies against specific molecules on the membrane surface and consequent CD55 and CD59 consuming trying to prevent cell lysis by complement. We do not think that it is due to a defective biosyntheses of the GPI-anchored membrane protein on stem cell clone as it occurs in the HPN patient. These results suggest that there is a difference in the CD55 and CD59 expression pattern on

SLE patient's cells, and this difference may play a role in the pathophysiology of the cytopenias in these patients.

5. Financial support

This study received financial support from the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE, Research Incentive Fund) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

- [1] M.J. Walport, Complement. First of two parts, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1058–1066.
- [2] M.J. Walport, Complement. Second of two parts, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1140–1144.
- [3] H. Song, C. He, C. Knaak, J.M. Guthridge, V.M. Holers, S. Tomlinson, Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1875–1885.
- [4] J.M. Thurman, V.M. Holers, The central role of the alternative complement pathway in human disease, *J. Immunol.* 176 (2006) 1305–1310.
- [5] B.P. Morgan, The complement system: an overview, *Methods Mol. Biol.* 150 (2000) 1–13.
- [6] M. Kawano, T. Seya, I. Koni, H. Mabuchi, Elevated serum levels of soluble membrane cofactor protein (CD46, MCP) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), *Clin. Exp. Immunol.* 116 (1999) 542–546.
- [7] F.C. Kimberley, B. Sivasankar, B. Paul Morgan, Alternative roles for CD59, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 73–81.
- [8] S.E. Christmas, C.T. de la Mata Espinosa, D. Halliday, C.A. Buxton, J.A. Cummerson, P.M. Johnson, Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes, *Immunology* 119 (2006) 522–528.
- [9] J.W. Sleasman, The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease, *Adv. Dent. Res.* 10 (1996) 57–61.
- [10] A. Alahlafi, P. Wordsworth, F. Wojnarowska, Activation/inactivation of the classical pathway of complement in non-lesional skin of patients with systemic lupus erythematosus, *J. Cutan. Pathol.* 32 (2005) 537–540.
- [11] R. Gupta, T. Ahuja, M. Agraharkar, Disorders of the complement system: an overview, *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 13 (2002) 119–125.
- [12] D.P. D'Cruz, M.A. Khamashta, G.R. Hughes, Systemic lupus erythematosus, *Lancet* 369 (2007) 587–596.
- [13] G.C. Tsokos, S.N. Liossis, Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death, *Immunol. Today* 20 (1999) 119–124.
- [14] Y. Sherer, A. Gorstein, M.J. Fritzler, Y. Shoenfeld, Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients, *Semin. Arthritis Rheum.* 34 (2004) 501–537.
- [15] Y. Richaud-Patin, B. Perez-Romano, E. Carrillo-Maravilla, A.B. Rodriguez, A.J. Simon, J. Cabiedes, J. Jakez-Ocampo, L. Llorente, A. Ruiz-Arguelles, Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus, *Immunol. Lett.* 88 (2003) 95–99.
- [16] I. Garcia-Valladares, Y. Atisha-Fregoso, Y. Richaud-Patin, J. Jakez-Ocampo, E. Soto-Vega, D. Elias-Lopez, E. Carrillo-Maravilla, J. Cabiedes, A. Ruiz-Arguelles, L. Llorente, Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia, *Lupus* 15 (2006) 600–605.
- [17] L.M. Vila, G.S. Alarcon, G. McGwin Jr., H.M. Bastian, B.J. Fessler, J.D. Reveille, Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort, XXXVII: association of lymphopenia with clinical manifestations, serologic abnormalities, disease activity, and damage accrual, *Arthritis Rheum.* 55 (2006) 799–806.
- [18] S. Giannouli, M. Voulgarelis, P.D. Ziakas, A.G. Tzioufas, Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment, *Ann. Rheum. Dis.* 65 (2006) 144–148.
- [19] J.B. Winfield, P.D. Fernsten, J.K. Czyzyk, Anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 108 (1997) 127–135.
- [20] M. Arora, R. Arora, S.C. Tiwari, N. Das, L.M. Srivastava, Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis, *Lupus* 9 (2000) 127–131.
- [21] M.C. Hochberg, Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1725.
- [22] D. Ricklin, J.D. Lambris, Complement-targeted therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1265–1275.
- [23] M. Tomita, Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Biochim. Biophys. Acta* 1455 (1999) 269–286.
- [24] S. Tsunoda, M. Kawano, I. Koni, Y. Kasahara, A. Yachie, T. Miyawaki, H. Seki, Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome, *Scand. J. Immunol.* 51 (2000) 293–299.
- [25] R.W. Finberg, W. White, A. Nicholson-Weller, Decay-accelerating factor expression on either effector or target cells inhibits cytotoxicity by human natural killer cells, *J. Immunol.* 149 (1992) 2055–2060.
- [26] D.R. Shafren, D.J. Dorahy, R.F. Thorne, T. Kinoshita, R.D. Barry, G.F. Burns, Antibody binding to individual short consensus repeats of decay-accelerating factor enhances enterovirus cell attachment and infectivity, *J. Immunol.* 160 (1998) 2318–2323.
- [27] S. Lea, Interactions of CD55 with non-complement ligands, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 1014–1019.
- [28] C.W. Van den Berg, T. Cinek, M.B. Hallett, V. Horejsi, B.P. Morgan, Exogenous CD59 incorporated into U937 cells through its glycosyl phosphatidylinositol anchor becomes associated with signalling molecules in a time dependent manner, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 669–677.
- [29] E.W. Murray, S.M. Robbins, Antibody cross-linking of the glycosyl-phosphatidylinositol-linked protein CD59 on hematopoietic cells induces signaling pathways resembling activation by complement, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 25279–25284.