

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Farmacologia da Médica Mônica de Freitas Leitão.

Campinas, 18 de junho de 1998



**Prof. Dr. Antônio Condino Neto
- Orientador -**

Mônica de Freitas Leitão

**DEFICIÊNCIA DO FATOR I DO COMPLEMENTO:
RELATO DE CASO, ESTUDO DOS FAMILIARES E SUAS
REPERCUSSÕES SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção do Título de Mestre em Ciências na
Área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Campinas
1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	71111111
V.	Ex.
TOMBO BC/	35 215
PROC.	395,98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/09/98
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M-00116525-7

2635d
~~1536d~~

Leitão, Mônica de Freitas

Deficiência do fator I do complemento : relato de caso, estudo dos familiares e suas repercussões sobre o sistema imunológico / Mônica de Freitas Leitão. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Antônio Condino Neto

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema imune. 2. Complemento (Imunologia) . I. Antônio Condino Neto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Antônio Condino Neto

2. Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato de Castro

3. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zolner

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/06/98

Dedico este árduo trabalho a uma pessoa muito especial, que além de me incentivar à pesquisa e orientar à execução deste projeto, foi um exemplo de competência profissional e humildade, e que infelizmente não está mais entre nós.

Ao meu pai, Hermógenes de Freitas Leitão Filho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Exupério, pela compreensão, ajuda familiar, e colaboração na formatação e realização dos gráficos neste trabalho.

Ao meu filho Vítor, pela compreensão dos momentos de ausência.

A minha mãe Helenice, e meus irmãos Paula e Neto, pelo apoio e incentivo.

À toda a minha família, pelo incentivo e colaboração durante todo este período.

Ao Dr. Antônio Condino Neto, pela orientação, incentivo e confiança.

À Dra. Anete Sevciovic Grumach, do Dep. de Pediatria da USP, pelo apoio, orientação e colaboração para a execução de exames laboratoriais.

À Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, do Dep. de Pediatria da Unicamp, pelo apoio, orientação e colaboração na execução de exames laboratoriais.

Ao Dr. José Dirceu Ribeiro, do Dep. de Pediatria da Unicamp, pelo apoio e orientação.

Ao Dr. Michael Kirschfink, biólogo do Inst. de Imunologia de Heidelberg na Alemanha, pela orientação e realização de exames laboratoriais.

À bióloga Elizabeth C. Cambiucci e a técnica de laboratório Maria Helena Carion Mazolla, do Lab. de Imunologia Pediátrica da Unicamp, pela orientação na realização dos exames laboratoriais.

À bióloga Jussara Rehder, do Lab. de Imunologia/Biologia Molecular do CIPED-Unicamp, pela orientação na realização de exames laboratoriais.

À equipe de enfermagem do Ambulatório de Pediatria da Unicamp, pela colaboração na coleta do material.

À equipe de estatística da Comissão de Pesquisa da FCM-Unicamp.

Aos amigos da Pediatria e Farmacologia da FCM-Unicamp, pelo apoio.

À família estudada, pela confiança e cooperação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro

ÍNDICE

SUMÁRIO	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
Tabela 1 - Proteínas do Complemento e seu papel na resposta imune	13
Tabela 2 - Deficiências do Complemento: manifestações clínicas e herança	14
PUBLICAÇÃO.....	17
RESULTADOS ADICIONAIS.....	26
Estudo da migração celular.....	27
Gráfico 1 - Migração espontânea de mononucleares.	28
Gráfico 2 - Quimiotaxia de mononucleares.	29
Gráfico 3 - Migração espontânea de polimorfonucleares.	30
Gráfico 4 - Quimiotaxia de polimorfonucleares.	31
Fagocitose.....	32
Gráfico 5 - Índice fagocitário espontâneo	33
Gráfico 6 - Capacidade fagocitária espontânea	34
Gráfico 7 - Índice fagocitário: hemácia de carneiro (EA) opsonizada por Ac-EA	35
Gráfico 8 - Capacidade fagocitária: hemácia de carneiro (EA) opsonizada por Ac-EA	36
Gráfico 9 - Índice fagocitário: zimosan opsonizado em soro	37
Gráfico 10 - Capacidade fagocitária: zimosan opsonizado em soro	38
Atividade da NADPH oxidase.....	39
Gráfico 11 - Atividade espontânea da NADPH oxidase de mononucleares	40
Gráfico 12 - Atividade estimulada da NADPH oxidase de mononucleares.....	41
Gráfico 13 - Atividade espontânea da NADPH oxidase de polimorfonucleares.	42
Gráfico 14 - Atividade estimulada da NADPH oxidase de polimorfonucleares.....	43
DISCUSSÃO GERAL	44
ANEXOS.....	48
Tabela 3 - Hemograma	49
Tabela 4 - Teste de Hipersensibilidade Retardada.....	49
Tabela 5 - Dosagem de Imunoglobulinas	50
Tabela 6 - Contagem de Linfócitos T.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

SUMÁRIO

As imunodeficiências do sistema complemento são condições raras, correspondendo a 2%-5% das imunodeficiências primárias. Quanto às deficiências do fator I, existem aproximadamente 27 indivíduos diagnosticados. O fator I é uma enzima que regula a atividade da via clássica e alternativa. Na deficiência do fator I ocorre redução da atividade de ambas as vias, mas principalmente da via alternativa, e diminuição nos níveis de C3, fator B, properdina e fator H, por consumo. A redução dos níveis de C3 prejudica a opsonização de microorganismos, predispondo a infecções de repetição nas vias aéreas superiores, meningites, septicemia, por bactérias do tipo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. Neste trabalho foram diagnosticados 3 indivíduos (B4, B6, B7) de uma mesma família com deficiência do fator I (homozigotos). Os pais, que são primos de segundo grau, e três dos irmãos (B2, B3, B8) apresentam redução de 50% nos níveis de fator I (heterozigotos). O padrão de transmissão foi autossômico recessivo. A imunoeletroforese do fator H está alterada. Em todos os pacientes foi realizado hemograma, dosagem de imunoglobulinas, contagem de linfócitos T, teste de hipersensibilidade retardada, com resultados normais. Também foi feito estudo dos fagócitos (estudo da migração, fagocitose, atividade do sistema NADPH oxidase). Nos deficientes do fator I, verificou-se comprometimento da migração espontânea de mononucleares e quimiotaxia de polimorfonucleares (sem reversão do defeito após adição de soro com níveis normais de C3). A fagocitose está diminuída nestes pacientes, entretanto há recuperação da função após adição de soro normal. A atividade da NADPH oxidase foi normal. O defeito de migração celular pode ser decorrente de um defeito intrínseco da célula, ou por comprometimento de receptores de membrana para o complemento.

ABSTRACT

Factor I deficiency causes a permanent, uncontrolled activation of the alternative pathway resulting in an increased turnover of C3 and consumption of factor B, factor H and properdin. Factor I deficiency is clinically associated with recurrent bacterial infections already in early infancy, mainly affecting the upper and lower respiratory tract, or presenting as meningitis or septicemia. We here report on a Brazilian family (n=9) with known consanguinity, where in 3/7 children, suffering from chronic otitis, meningitis, and respiratory infections, a complete factor I deficiency was recognized. One of the patients died after fulminant sepsis. Hemolytic activity of the alternative pathway was not detectable in the patients' sera due to decreased plasma concentrations of C3, factor B and properdin. As a consequence of factor I deficiency, C3b could not be metabolized with the result that no C3-derived split products (C3dg/C3d) were detectable in the patients' sera. In vitro reconstitution with purified factor I restored the regulatory function in the patients' sera with the subsequent cleavage of C3b to C3c and C3dg. Factor H levels were decreased in all patients' sera and found to be tightly complexed with C3b resulting in a modified electrophoretic mobility. Upon factor I reconstitution, factor H was released from C3b regaining its $\beta 1$ electrophoretic mobility. Complement-mediated biological functions like opsonization of bacteria, chemotactic activity and phagocytosis in these patients were impaired. The parents (cousins, 2nd degree) and 3/4 siblings had significantly reduced factor I plasma levels without further alteration in their complement profile. 3 of these obviously heterozygously deficient family members suffered from recurrent bacterial infections of different frequency and severity.

INTRODUÇÃO

Imunodeficiências primárias são condições raras no cotidiano médico, acometendo aproximadamente 1 para cada 10.000 nascidos vivos, excluindo-se os casos de deficiência seletiva de IgA (HAYAKAWA et al., 1981; ROBERTON et al., 1983; HOSKING & ROBERTON, 1983). Dentre as imunodeficiências primárias, os defeitos do sistema complemento são os mais raros, acometendo cerca de 2% à 5% de todos os casos (CARNEIRO-SAMPAIO & GRUMACH, 1992; HAYAKAWA et al., 1981; RYSER et al., 1988). O reconhecimento de pacientes com deficiências nos componentes do sistema complemento ou em suas proteínas reguladoras, tem contribuído para definir a complexidade e importância biológica do sistema complemento (FRANK, 1992).

O sistema complemento juntamente com os fagócitos são considerados integrantes da resposta imunológica inata ou inespecífica, entretanto o sistema complemento interage e modula a resposta imunológica específica, utilizando-se de receptores celulares e de variadas interações moleculares (DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984; OCHS et al., 1986; ERDEI et al., 1991). É formado por mais de 25 proteínas, circulando no organismo como moléculas inativas, constituindo cerca de 15% da fração globulínica plasmática, ou presentes na superfície celular (FRANK, 1992). A maioria das proteínas do sistema complemento é sintetizada no fígado, mas muitas também são produzidas em sítios extra-hepáticos como em monócitos, macrófagos, células epiteliais do trato gastrointestinal e gênito-urinário, e fibroblastos (PERLMUTTER & COLTEN, 1986). Alguns dos genes das proteínas do complemento estão localizados no complexo de histocompatibilidade classe III, dentre eles os das proteínas C4, C2 e fator B (POWIS & TROWSDALE, 1994).

Quando ativadas, as proteínas do sistema complemento interagem de maneira altamente específica, numa sequência de reações bioquímicas. A ativação de uma proteína, normalmente é seguida por sua quebra em dois ou mais fragmentos. O fragmento maior, prossegue na cascata do complemento induzindo a lise do fragmento subsequente, enquanto o menor é liberado no plasma (DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984).

São descritas duas vias de ativação do sistema complemento, as vias clássica e alternativa. A via clássica é constituída pelas proteínas C1, C4, C2 e C3, e pelos componentes terminais C5, C6, C7, C8 e C9 (MÜLLER-EBERHARD, 1968; GUENTHER, 1983). É ativada por imunocomplexos, através da ligação dos anticorpos da classe IgM ou IgG (subclasses IgG1, 2 ou 3) à proteína C1 (KLEIN, 1982). C1 é composto por três subunidades: C1q, C1r e C1s. O domínio CH2 do fragmento Fc da imunoglobulina se liga a C1q levando a uma alteração estrutural. A seguir, ocorre ativação de C1r e C1s, que passam a ter atividade proteolítica. C1 enzimaticamente ativo interage com o próximo componente da cascata, C4, quebrando a molécula em dois fragmentos, C4a e C4b. O fragmento menor, C4a, é liberado e o fragmento maior, C4b, se liga covalentemente à superfície antigênica. Na presença de íons magnésio, C4b age como sítio de ligação para o próximo componente da cascata, C2, que após se ligar a C4b é quebrado pela enzima C1 em dois fragmentos, C2a e C2b (COOPER, 1982). Da mesma maneira, o maior fragmento, C2a, permanece ligado formando o complexo peptídico C4bC2a, ou C3 convertase da via clássica, que agirá em C3 (GUENTHER, 1983). C3 é quebrado em C3a e C3b. C3b, o maior fragmento de C3, liga-se covalentemente ao sítio de ativação, e o fragmento C3a é liberado. Forma-se o complexo C4bC2aC3b, também denominado C5 convertase, que se liga a C5 quebrando-o nos fragmentos C5a e C5b. Novamente, o fragmento maior C5b se liga ao sítio de ativação, e o fragmento C5a é liberado. A cascata prossegue com a ativação subsequente de C6, C7, C8 e C9 (DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984). A ativação desses componentes finais não envolve quebras, mas simplesmente ligações e alterações conformacionais (AUSTEN, 1979). A sequência de reações iniciadas a partir de C5 leva a formação do complexo de ataque a membrana (MAC). MAC é um complexo hidrofóbico que penetra a membrana celular, formando poros pelos quais ocorre a passagem de íons, desestabilizando a membrana e levando à morte celular (VEITCH et al., 1983).

A via alternativa é composta pelas proteínas C3, fator B, fator D, properdina e pelos componentes terminais C5, C6, C7, C8 e C9. Pode ser ativada diretamente por

bactérias, vírus, fungos, helmintos, protozoários e células linfoblastóides, independentemente da presença de anticorpos. Esta via é de particular importância no controle de infecções, antes mesmo da produção de anticorpos. De maneira constante, e em condições normais, forma-se no plasma o complexo C3* através da hidrólise espontânea da ligação tioéster de C3. C3* apresenta propriedades semelhantes às de C3bi ou C3b (PANGBURN et al., 1981). C3* se liga ao fator B, formando-se o complexo bimolecular C3-B. O fator D cliva o fator B em Ba e Bb, e o fragmento Bb permanece ligado ao C3, originando-se o complexo enzimático $\overline{\text{C3bBb}}$, ou C3 convertase da via alternativa. Esta enzima é estabilizada através da ligação com a properdina ($\overline{\text{C3bBbP}}$) (WYATT et al., 1980). A C3 convertase da via alternativa é homóloga a da via clássica, produzindo a quebra de C3 e formação de $\overline{\text{C3bBbC3b}}$, ou C5 convertase (KLEIN, 1982; DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984). A partir desta etapa, a cascata segue de maneira similar a via clássica, com formação final do MAC.

O complemento também pode ser ativado por uma terceira via, independente do anticorpo, iniciada através da ligação da proteína “mannan-binding lectin” (MBL) à carboidratos. A MBL é estruturalmente semelhante ao C1q, e ativa o sistema complemento através da associação com uma protease conhecida como MASP, que por sua vez é similar a C1r e C1s. MBL se liga a carboidratos específicos encontrados na superfície de vários microorganismos, incluindo bactérias, protozoários, vírus, e apresenta atividade antibacteriana promovendo a lise mediada pelos componentes terminais do complemento ou auxiliando na fagocitose (MÜLLER-EBERHARD, 1988; TURNER, 1996).

O sistema complemento é regulado por proteínas séricas ou associadas à membrana celular. C1 é inativado pela proteína sérica inibidora de C1, que dissocia as subunidades C1r/C1s do complexo antígeno-anticorpo (KLEIN, 1982; DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984). A atividade hemolítica de C4 é inativada pela enzima proteolítica denominada fator I, ou inativador de C3b/C4b, que age com o cofator proteína ligante de C4b (C4bp), levando a quebra de C4b. A atividade de C3 é rigorosamente regulada, uma

vez que C3b pode causar dano celular e ativar a via alternativa. O fator I (PANGBURN et al., 1977), associado ao seu cofator H (WHALEY & RUDDY, 1976), degrada os fragmentos C3b produzindo formas inativas da molécula, C3bi, que são incapazes de se ligar ao fator B ou à C3 convertase, mas que podem se ligar a receptores nos fagócitos amplificando a fagocitose.

Os receptores do complemento estão na superfície de várias células e gozam importante papel na regulação da cascata do complemento (KLEIN, 1982). O receptor de C3b/C4b denominado CR1, presente em eritrócitos e leucócitos, age como cofator do fator I quebrando C4b em C4d, e C3b em C3bi. CR1, associado ao fator H e ao fator I, também acelera a degradação da C3 convertase das vias clássica e alternativa. Também na presença de CR1, o fator I degrada o C3bi nos fragmentos C3dg e C3c. Além disso CR1 aumenta a habilidade dos fagócitos de ingerirem partículas ou microorganismos opsonizados por C3b ou C4b, não somente pela ligação de CR1 à C3b ou C4b, mas também através da transdução de sinais que ativam os mecanismos de fagocitose dos leucócitos. CR1 também é importante para o clareamento de imunocomplexos, se liga a C3b ou C4b de imunocomplexos circulantes e os transporta para o fígado e baço (WALPORT & LACHMANN, 1984).

O receptor CR2, presente em linfócitos B, células dendríticas foliculares, e algumas células epiteliais, liga-se a C3bi e C3dg e tem função semelhante ao CR1 e fator I na quebra do C3bi. CR2 é um receptor para o vírus Epstein-Barr, e também auxilia na resposta imune humoral (KLEIN, 1982).

Os receptores CR3 e CR4 fazem parte da família das integrinas, importantes para aderência celular ou interações celulares. CR3, presente em fagócitos, reconhece C3bi e auxilia na fagocitose de partículas (LACHMAN, 1984). CR4, localizado em monócitos, neutrófilos e macrófagos teciduais, se liga a C3bi e C3dg. Seu papel ainda não está bem esclarecido; alguns autores acreditam que o CR4 auxilie na fagocitose de partículas.

Existem outras glicoproteínas na superfície celular, que regulam a ativação do complemento. A “membrane cofactor protein” (MCP) age como cofator do fator I na quebra de C3b. A “decay accelerating factor” (DAF) se liga a C3b e C4b, desestabiliza e acelera a degradação da C3 convertase das vias clássica e alternativa. Os componentes terminais C8 e C9, também estão sob regulação de várias proteínas de membrana (AUSTEN, 1979; COOPER, 1982).

Os fragmentos C3a (DIAS DA SILVA et al., 1967), C4a e C5a (DIAS DA SILVA et al., 1967; MÜLLER-EBERHARD, 1968), conhecidos como anafilotoxinas, apresentam receptores específicos num grande número de células. Se ligam à superfície de mastócitos e basófilos, induzindo sua degranulação, contraem a musculatura lisa em vários tecidos, além de serem potentes peptídeos quimiotáticos para os fagócitos (AUSTEN, 1979; VEITCH et al., 1983; DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984).

As proteínas produzidas após a ativação do sistema complemento apresentam diversas funções. O MAC promove citólise (AUSTEN, 1979; KLEIN, 1982; DIAS DA SILVA & KIPNIS, 1984). O fragmento C3b, promove opsonização (MÜLLER-EBERHARD, 1968; VEITCH et al., 1983). As proteínas da via clássica se ligam a porção Fc dos anticorpos promovendo a solubilização de imunocomplexos (VEITCH et al., 1983).

A função do complemento tem sido tradicionalmente vista como mecanismo inespecífico de defesa, entretanto o complemento participa da resposta imune específica (ERDEI, 1991).

Tabela 1- Proteínas do Complemento e seu papel na resposta imune inespecífica e específica (ERDEI, 1991) .

PROTEÍNA	FUNÇÃO
C1q	Se liga a imunocomplexos, auxilia na fagocitose, aumenta a síntese do inibidor de IL-1 e auxilia a citotoxicidade celular.
Ba	Inibe a proliferação das células B.
Bb	Estimula a proliferação e diferenciação das células B
Fator H	Estimula a proliferação de linfócitos de rato, a atividade NADPH oxidase em monócitos, a liberação de fator I dos linfócitos e a quimiotaxia de monócitos.
C3a	Inibe a proliferação de linfócitos T antígeno-dependente, a produção de anticorpos, a citotoxicidade mediada por células T e NK e estimula a quimiotaxia de mastócitos.
C3b solúvel	Inibe a proliferação de linfócitos induzida por antígenos e mitógenos e a produção de linfocinas.
C3b ligado	Auxilia no clareamento de imunocomplexos, na localização de antígenos no tecido linfóide, na fagocitose de imunocomplexos, na proliferação de células B, de células T dependentes de IL-2, na atividade microbicida das células K e NK, e na apresentação do antígeno.
C3bi	Auxilia na fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpo.
C3d(g) solúvel	Inibe a proliferação de linfócitos induzida por antígenos e mitógenos e a produção de linfocinas.
C3d(g) ligado	Estimula a proliferação das células B.
C5a	Aumenta a proliferação de células T antígeno-dependente, a produção de anticorpos e a quimiotaxia de mastócitos.

Já foram descritos defeitos moleculares de todos os componentes do sistema complemento (ROTHER & ROTHER, 1986; FIGUEROA & DENSEN, 1991). O mais comum é a deficiência de C2 (ALPER & ROSEN, 1981; ROSS & DENSEN, 1984). As deficiências dos componentes da via clássica C1, C4 ou C2, normalmente se manifestam por doenças auto-imunes, ressaltando a importância da via clássica no clareamento de imunocomplexos. As deficiências de C3, fator H ou fator I se manifestam por infecções

piogênicas de repetição, confirmando o papel fundamental de C3 na opsonização de bactérias piogênicas. As deficiências dos componentes terminais C5, C6, C7 e C8, e dos componentes da via alternativa fator D ou properdina resultam na susceptibilidade a infecções por *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (FRANK, 1992).

Tabela 2-Deficiências do Complemento: manifestações clínicas e herança (FRANK, 1992) .

Deficiência	Herança	Cromossomo	Quadro Clínico
C1q	AR	1	Síndrome lúpica, imunodeficiência combinada, glomerulonefrite.
C1r	AR	12	Síndrome lúpica, glomerulonefrite.
C4	AR	6	Síndrome lúpica.
C2	AR	6	Síndrome lúpica, vasculites, glomerulonefrites, púrpura anafilactóide, artrite reumatóide juvenil.
C3	AR	19	Infecções piogênicas de repetição.
C5	AR	9	Infecções por neisséria / Síndrome lúpica.
C6	AR	5	Infecções por neisséria / Síndrome lúpica.
C7	AR	5	Infecções por neisséria / Síndrome lúpica.
C8a	AR	1	Infecções por neisséria / Síndrome lúpica.
C8b	AR	1	Infecções por neisséria / Síndrome lúpica.
C9	AR	5	Infecções por neisséria.
C1 IN	AD	11	Angioedema .
Fator I	AR	4	Infecções piogênicas de repetição.
Fator H	AR	1	Infecções piogênicas de repetição.
Fator D	AR	?	Infecções por neisséria
Properdina	LX	X	Infecções por neisséria

AR: autossômico recessivo. AD: autossômico dominante. LX: ligado ao X

O primeiro caso de deficiência do fator I (ou deficiência do fator inativador de C3b) foi descrito por ALPER (1970) num paciente com Síndrome de Klinefelter e infecções de repetição. Atualmente existem aproximadamente 27 indivíduos com diagnóstico de deficiência do fator I na forma homozigota (VYSE et al., 1994; KIRSCHFINK & BINDER, 1997). A deficiência do fator I é autossômica recessiva ou autossômica co-dominante (RASMUSSEN et al., 1986; SIM et al., 1993). A frequência do gene na população é desconhecida. Os pacientes homozigotos apresentam infecções de repetição nas vias aéreas (otites, sinusites, bronquites, pneumonias), meningites, geralmente de manifestação precoce e gravidade variável, sendo os agentes mais frequentes bactérias encapsuladas do tipo *Neisseria meningitidis* (TEISNER et al., 1984) e/ou *Streptococcus pneumoniae* (ALPER et al., 1970; VYSE et al., 1994). Há predisposição para doenças auto-imunes como glomerulonefrites, lupus e artrites crônicas (SOLAL-CELIGNY et al., 1992). Os pacientes heterozigotos costumam ser assintomáticos (SIM et al., 1993).

A deficiência do fator I resulta na perda do controle da via clássica e alternativa, com hipercatabolismo de C3 (VYSE et al., 1994; KIRSCHFINK & BINDER, 1995). A atividade funcional das vias clássica (CH50) e alternativa (APH50) estão geralmente reduzidas. Há redução dos níveis de C3, fator B, properdina e fator H por consumo. O fator I está indetectável, e as funções reguladas por C3 e pelos fatores da via comum estão alteradas, afetando a atividade bactericida, fagocitose e quimiotaxia de neutrófilos (WAHN et al., 1981). MARQUART e colaboradores (1997) verificaram diminuição dos níveis de CR1 em linfócitos B de deficientes do fator I, e diminuição não tão significativa de CR2. Também observaram redução da fagocitose e produção de ânion superóxido dependente de CR1 e CR3, com expressão de CR1 e CR3 normais em monócitos e polimorfonucleares. Os pacientes geralmente apresentam níveis normais de IgG, IgM e IgA e a produção de anticorpo ao toxóide-tetânico foi descrita como normal (ALPER et al., 1970).

O tratamento baseia-se na antibioticoterapia profilática (SOLAL-CELIGNY et al., 1982) e imunização contra patógenos aos quais os pacientes são particularmente susceptíveis (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae b* e *Neisseria meningitidis*). Uma opção terapêutica é a infusão de plasma fresco congelado. Após infusão de plasma fresco congelado o fator I é eliminado da circulação em 29-45 horas, restaurando temporariamente as funções mediadas pelo complemento (RASMUSSEN et al., 1988; BARRET & BOYLE, 1984). Além dos riscos inerentes dos hemoderivados, a terapêutica de reposição por infusão de plasma fresco congelado leva a riscos de reações anafilactóides (WAHN et al., 1984). A administração de C3 purificado não corrige as funções do complemento.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a resposta imunológica (sistema fagocítico, imunidade celular e humoral) de oito pacientes, de uma mesma família, com deficiência do fator I do complemento. Três dos pacientes apresentam a forma homozigota da doença. Os outros apresentam a forma heterozigota, com níveis do fator I reduzidos em 50%. Apenas um membro da família apresenta níveis normais de fator I. Em todos os membros da família foi realizado estudo do sistema complemento (CH50, APH50, dosagem de C3, C4, C3d, fator H, fator B, fator I, properdina, inibidor de C1 esterase), hemograma, dosagem de imunoglobulinas, contagem de linfócitos T, prova de hipersensibilidade retardada, migração de células mononucleares e polimorfonucleares, fagocitose, e atividade do sistema NADPH oxidase. Nos pacientes com deficiência total do fator I também foi realizada imunoeletroforese do fator H.

PUBLICAÇÃO

Immunopharmacology

Immunopharmacology 38 (1997) 207–213

Complement factor I deficiency in a family with recurrent infections

M.F. Leitão ^a, M.M.S. Vilela ^a, R. Rutz ^c, A.S. Grumach ^b, A. Condino-Neto ^a,
M. Kirschfink ^{c,*}

^a Department of Pediatrics, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

^b Allergy and Immunology Unit, Department of Pediatrics, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, 69120 Heidelberg, Germany



ELSEVIER

Complement factor I deficiency in a family with recurrent infections

M.F. Leitão ^a, M.M.S. Vilela ^a, R. Rutz ^c, A.S. Grumach ^b, A. Condino-Neto ^a,
M. Kirschfink ^{c,*}

^a Department of Pediatrics, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

^b Allergy and Immunology Unit, Department of Pediatrics, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, 69120 Heidelberg, Germany

Received 24 April 1997; accepted 17 June 1997

Abstract

Factor I deficiency causes a permanent, uncontrolled activation of the alternative pathway resulting in an increased turnover of C3 and consumption of factor B, factor H and properdin. Factor I deficiency is clinically associated with recurrent bacterial infections already in early infancy, mainly affecting the upper and lower respiratory tract, or presenting as meningitis or septicemia. We here report on a Brazilian family ($n = 9$) with known consanguinity, where in 3/7 children, suffering from chronic otitis, meningitis, and respiratory infections, a complete factor I deficiency was recognized. One of the patients died after fulminant sepsis. Hemolytic activity of the alternative pathway was not detectable in the patients' sera due to decreased plasma concentrations of C3, factor B and properdin. As a consequence of factor I deficiency, C3b could not be metabolized with the result that no C3-derived split products (C3dg/C3d) were detectable in the patients' sera. In vitro reconstitution with purified factor I restored the regulatory function in the patients' sera with the subsequent cleavage of C3b to C3c and C3dg. Factor H levels were decreased in all patients' sera and found to be tightly complexed with C3b resulting in a modified electrophoretic mobility. Upon factor I reconstitution, factor H was released from C3b regaining its β_1 electrophoretic mobility. Complement-mediated biological functions like opsonization of bacteria, chemotactic activity and phagocytosis in these patients were impaired. The parents (cousins, 2nd degree) and 3/4 siblings had significantly reduced factor I plasma levels without further alteration in their complement profile. 3 of these obviously heterozygously deficient family members suffered from recurrent bacterial infections of different frequency and severity. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Factor I deficiency; Complement; Bacterial infections; Factor H

1. Introduction

Complement deficiencies have been reported for almost all known components and regulatory proteins (Rother and Rother, 1986; Figueroa and Densen, 1991). They are often associated with recurrent bacterial infections and with an increased susceptibility

Abbreviations: ABTS, 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline sulfonate; APH50, hemolytic activity of the alternative pathway (50% lysis); C, complement; CH50, hemolytic activity of the classical pathway (50% lysis); C1Inh, C1 inhibitor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

* Corresponding author. Tel.: +49-6221-564076; fax: +49-6221-565586; e-mail: k92@ix.urz.uni-heidelberg.de

to autoimmune diseases. Activation of the complement system occurs via three independently initiated and tightly regulated pathways: the classical, the alternative and the recently discovered MBL (mannan binding lectin) pathways (Müller-Eberhard, 1988; Turner, 1996). In body fluids, the alternative pathway is regulated by two control proteins, factor I (Pangburn et al., 1977) and factor H (Whaley and Ruddy, 1976). This pathway of complement is in a constant state of low-degree activation, based on the spontaneous generation of hydrolyzed C3 (C3(H₂O)) which exhibits C3b-like properties (Pangburn et al., 1981). In the presence of factor H, the glycoprotein factor I controls this activation mechanism by cleaving C3(H₂O) and C3b to split products designated C3c and C3dg/C3d. Factor I is also involved in the regulation of the classical pathway, employing C4bp and MCP (CD46) as cofactors.

Factor I deficiency causes a permanent, uncontrolled activation of the alternative pathway resulting in an increased turnover of C3 and consumption of factor B, factor H and properdin. Persistent activation of C3 leads to deposition of C3b on bystander cells even in the absence of specific allo- or autoantibodies (Abramson et al., 1971). Immune complex elimination may be impaired due to the inability of immune complex-fixed C3b to be converted to iC3b, a requirement for its subsequent binding to CR3 (Solal-Celigny et al., 1982; Porteu et al., 1986).

Patients with an acquired C3 deficiency due to defects of factor I typically present with systemic pyogenic infections, particularly with encapsulated bacteria such as *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenzae*, and/or *Streptococcus pneumoniae*. Frequent clinical consequences are upper respiratory airway infections (sinusitis, bronchitis, pneumonia), meningitis, otitis media, and arthritis.

Heterozygotes are often asymptomatic and have normal C3 and factor B values with plasma concentrations of factor I of about 50% of the normal range (Sim et al., 1993).

So far, a total of 27 patients with homozygous factor I deficiency from 21 families has been reported (for review see: Vyse et al., 1994; Kirschfink and Binder, 1997). The molecular basis of the deficiency has recently been resolved for two pedigrees (Vyse et al., 1996).

Here we describe a factor I-deficient Brazilian

family with a high degree of consanguinity. From a total number of > 50 members (3 generations), we have now analyzed in more detail 9 individuals from 2 generations.

2. Patients and methods

2.1. Patients

From a Brazilian family (caucasian, $n = 9$) with known consanguinity (see Fig. 1, pedigree), 3/7 children (B4, B6, B7) presented with chronic otitis, meningitis and respiratory infections (Table 1). The family history revealed that all members had experienced one or more episodes of bacterial infections (Table 1). One child was aborted at the 20th gestational week.

2.2. Complement analysis

Functional activity of the classical (CH50, Mayer, 1961) and the alternative pathway (APH50, Joiner et al., 1983) of complement was measured in hemolytic assays according to described procedures. Plasma protein concentrations of C4, C3, B and C1 inhibitor were determined by radial immunodiffusion or nephelometry. Functional activity of C1 inhibitor was assessed by the method of Levy and Lepow (1959). C3dg/C3d was measured by double-decker rocket immunoelectrophoresis according to Brandslund et al. (1981), using rabbit anti-C3c in the lower gel, and rabbit anti-C3d antibodies (Dako, Hamburg, Germany) in the upper gel.

Plasma concentrations of complement inhibitors, factors H and I, were assessed by rocket immunoelectrophoresis, using goat antibodies to human factor H and factor I (Miles Scientific, ICN Biochemicals, Eschwege, Germany). Applying this technique, normal ranges (mean $\pm$ 2 S.D., $n = 40$) were found to be 360–680 $\mu\text{g/ml}$ (factor H) and 60–90 $\mu\text{g/ml}$ (factor I), respectively. Further quantification of factor H, factor I and factor B was performed by ELISA using polyclonal goat anti-H IgG, monoclonal anti-I IgG (Genzyme, Boston, MA, USA), or goat anti-B IgG (Baxter, Unterschleisheim, Germany) as first antibodies and rabbit anti-H IgG (Miles), goat anti-I IgG (Miles), and rabbit anti-B IgG (Dako), respec-

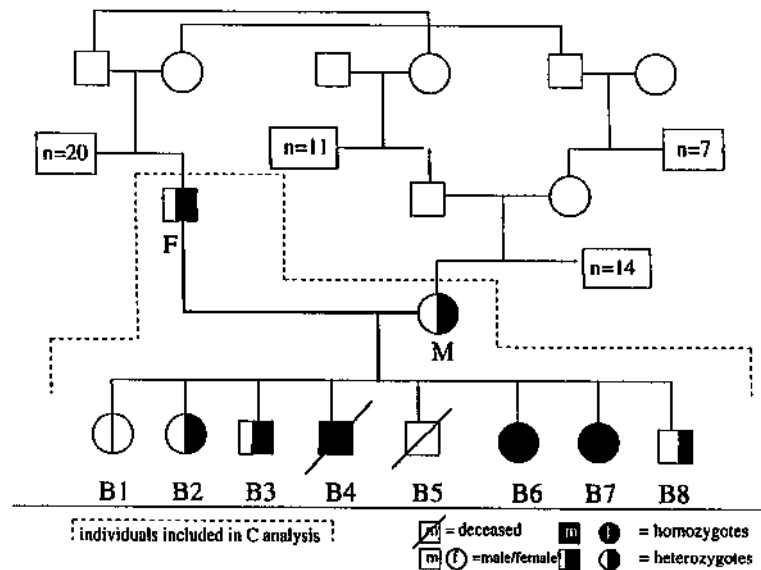


Fig. 1. Pedigree of a Brazilian family with factor I deficiency. F, father; M, mother; B1–B8, children.

tively, as detecting antibodies. Properdin levels were measured by ELISA, using polyclonal anti-P IgG (Baxter) as capture antibody and mouse monoclonal anti-P IgG (Dako) as second antibody. The reactions were visualized by the appropriate peroxidase-conjugated third antibodies, using 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS)/H₂O₂ as sub-

strate. Optical density was measured at $\lambda = 405$ nm on an EAR 340 AT Microplate Reader (SLT, Crailsheim, Germany). Purified factors B, H and I (Quidel, San Diego, CA, USA) were taken as standards.

Reconstitution of factor I function was performed by the addition of 100 μ g factor I/ml patient serum. After incubation at 37°C for 30 min, factor I activity

Table 1
Clinical manifestations in a factor I-deficient family

Family member	Age (years)	Sex	First onset of infections	Symptoms (no. of episodes)
Father	49	m	17 years	pneumonia (1)
Mother	42	f	childhood	otitis (often), tonsillitis (often), pyodermitis, pulmonary tuberculosis
Children				
B1	25	f	6 months	pneumonia (10), sinusitis, tonsillitis, renal tuberculosis
B2	23	f	22 years	urinary tract infection (2), pyelonephritis
B3	22	m	1 year	otitis (often), tonsillitis (2)
B4	18	m	4 years	otitis (often), hepatitis (1), keratoconjunctivitis (1) — deceased (sepsis)
B5	abortion (20th gestational week)	m		
B6	8	f	1 month	meningitis (Neisseria), pharyngitis (15), otitis (12), cellulitis (3), amygdalitis (5), sinusitis (2), tonsillitis (4), pyodermitis (often), pulmonary tuberculosis
B7	7	f	1 year	pharyngitis (8), tonsillitis (2), otitis (5), sinusitis (1), amygdalitis (2), 1
B8	4	m	3 years	tonsillitis (1), pneumonia (1), pyodermitis (1)

Table 2
Complement profile of factor I-deficient patients and family members

	CH50 (% NHS)	C4 ($\mu\text{g/ml}$)	C1Inh ($\mu\text{g/ml}$)	C3 ($\mu\text{g/ml}$)	C3d (mU/l)	APH50 (% NHS)	B ($\mu\text{g/ml}$)	H ($\mu\text{g/ml}$)	I ($\mu\text{g/ml}$)	Properdin ($\mu\text{g/ml}$)
Father	104	320	280	940	50	75	150	320	34	13.5
Mother	117	360	250	1030	64	100	150	325	35	13.9
Children										
B1	115	330	390	980	70	142	140	315	61	17.4
B2	113	360	380	940	62	104	150	330	29	12.6
B3	105	460	410	1030	55	121	150	330	32	16.8
B4	43	320	330	270	<<	<<	16	245	<<	5.9
B5	no data									
B6	28	220	380	250	<<	<<	14	275	<<	7.1
B7	22	180	300	250	<<	<<	16	275	<<	7.6
B8	98	300	390	740	68	92	120	335	31	9.7
Normal range	80–140	100–500	200–500	550–1100	35–70	70–130	100–500	360–680	60–90	10–30

<< = undetectable.

was assessed as the amount of the C3-derived split product C3dg/C3d as described above. Electrophoretic mobility of factor H in I-deficient and I-reconstituted sera was demonstrated by crossed immunoelectrophoresis with goat anti-H IgG in the gel.

Further laboratory diagnosis included the determination of plasma concentrations of immunoglobulins and the assessment of granulocyte and monocyte chemotaxis (Boyden, 1962) and phagocytosis (Van Furth et al., 1978) according to described protocols.

3. Results

Table 2 summarizes the complement profile of members of the factor I-deficient family. Total hemolytic activity of the alternative pathway (APH50) in the patients' sera (B4, B6, B7) was undetectable and the titer of classical pathway activity (CH50) was decreased to 20–40% of normal. Further analysis of the individual components of the alternative pathway revealed low levels of C3, factor H and properdin. No factor B and factor I was detected by immunoprecipitation assays. In addition, the C3-derived split product C3dg/C3d, reflecting factor I-mediated C3b cleavage, was absent in the patients' sera. Application of sensitive ELISAs (de-

tection limit < 1 ng/ml) confirmed a complete absence of factor I, but indicated a residual factor B level in each of the 3 patients.

Despite the functional integrity of the alternative pathway in all the other family members, only half-normal plasma concentrations of factor I were measured in the patients' parents as well as in 3/4 siblings.

Reconstitution of the patients' sera with purified factor I restored the capacity to cleave C3b to C3c

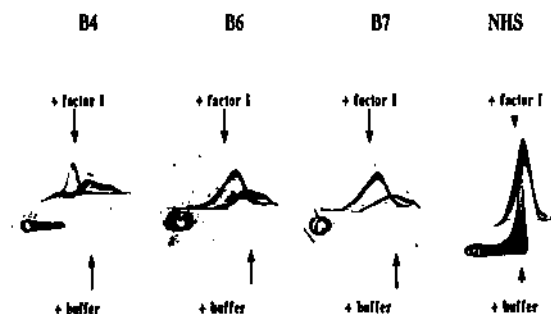


Fig. 2. Crossed immunoelectrophoresis for factor H. Factor H in sera of patients B4, B6 and B7 was found to be tightly associated with C3b, resulting in a modified electrophoretic mobility (+buffer). Upon factor I resubstitution facilitating C3b cleavage, factor H was released from its ligand, now migrating to its β_1 position (+factor I). For better comparison an overlay of two stained immunoelectrophoresis plates for each sample (+buffer/+factor I) is presented. NHS, normal human serum.

Table 3

Results from chemotaxis and phagocytosis assays in factor I-deficient patients and their family members

	Chemotaxis (μ m leading front)		Monocyte phagocytosis (phagocytic index ^a)	
	neutrophils	monocytes	normal serum	patient's serum
Father	63	88	n.d.	n.d.
Mother	112	101	73	68
Children				
B1	112	86	66	82
B2	n.d.	95	80	85
B3	101	64	84	82
B4	75	63	89	71
B5	no data			
B6	29	83	67	23
B7	40	58	89	32
B8	69	85	89	71
Normal range	99–158	75–135	66–96	66–96

^a Phagocytic index: number of particles ingested per 100 cells.

and C3dg/C3d. The reduced level of factor H to almost half-normal values was obviously sufficient to mount a normal C3b degradation upon the addition of factor I. In crossed immunoelectrophoresis, factor H of the patients' sera migrated to the alpha-region in contrast to a beta-migrating factor H in normal serum (Fig. 2). After incubation with purified factor I, factor H returned to its β_1 position.

Plasma concentrations of IgM, IgG, IgA and IgE were within normal ranges (data not shown).

LPS-induced chemotaxis of the patients' neutrophils (B4, B6, B7) and monocytes (B4, B7) were markedly reduced (Table 3). In contrast to normal human serum, the sera of patients B6 and B7 were not able to sufficiently opsonize zymosan particles as reflected by a reduced monocyte phagocytic activity (Table 3).

4. Discussion

A continuous and unregulated activation of the alternative pathway of complement is the consequence of a deficiency of the regulatory protein factor I. Plasma C3 is consumed in these patients as a result of uncontrolled formation of the fluid phase C3 convertase. Hypercatabolism with the subsequent depletion of C3, as well as of factor B, induces a state of increased susceptibility to bacterial infec-

tions. Except for a few cases, all previously described patients suffered from severe, partially life-threatening infections. As in primary C3 deficiency, some individuals lacking factor I show clinical similarities to those with agammaglobulinemia (Grumach and Kirschfink, 1995), with an increased susceptibility to the same pyogenic bacteria.

Clinical symptoms of the patients reported here resemble those seen in previous cases of factor I deficiency. As observed in our patients (Table 1), recurrent bacterial infections often start in early infancy and mainly present as infections of the upper and lower respiratory tract, pneumonia, meningitis, or septicemia (Alper et al., 1970; Vyse et al., 1994). Rare clinical manifestations include osteomyelitis (Floret et al., 1991), septic arthritis (Porteu et al., 1986) and skin abscesses (Alper et al., 1970).

Undetectable factor I in our patients' sera and levels of approximately 50% of normal in the parents and in 3/4 of the siblings point to a hereditary trait of the disorder.

The molecular basis of hereditary factor I deficiencies has recently been discovered in two pedigrees by Vyse et al. (1996). An adenine-to-thymine transversion at nucleotide 1282 in the cDNA caused histidine-400 to be replaced by leucine. A disparity in clinical manifestation of the deficiency between two siblings of one of the described pedigrees prompted the authors to raise the question to what

extent environmental factors and/or additional dysfunctions of the defense system finally determines the phenotype.

Besides the reduction of factor H due to increased catabolism, the absence of factor I seems to affect the binding affinity of the regulator to C3b. As observed earlier (Wahn et al., 1981; Rasmussen et al., 1986), we found a shift in the electrophoretic mobility of the patients' factor H from the beta₂ to the alpha region. Crossed immunoelectrophoresis for C3, which we performed in parallel, indicated that the patients' factor H migrated to the same position as C3b (data not shown). The precipitation pattern of factor H in sera of the apparently heterozygous family members was comparable to that of normal serum (data not shown). Results from reconstitution experiments with the patients' sera indicate that dissociation of the cofactor H from its tight complex with C3b requires the action of factor I. This has first been demonstrated by Nagaki et al. (1978) using purified components. Later, Di Scipio (1992) found that the affinity of factor H to C3b is not directly affected by factor I. Instead, after processing C3b, factor H and I binding sites are lost, thereby restoring the regulators' function.

Double immunodiffusion against anti-factor H IgG comparing the patients' and normal factor H excluded antigenic differences and Western blot analysis gave no further information regarding a possibly altered protein structure of the patients' factor H (data not shown).

The patients' monocytes were capable of mounting a normal phagocytic activity after opsonization of zymosan particles with normal human serum. Due to the low opsonic activity in sera of patients B6 and B7, their cell function was reduced if the phagocytosis assay was performed in the presence of their C3-deficient sera. Impairment of phagocytic function has previously been found in I-deficient patients of one family to be due to a defect of CR3-dependent cell function (Porteu et al., 1986). Migration of the patients' neutrophils (B4, B6, B7) and monocytes against LPS-activated normal serum (B4, B7) was markedly reduced, and even more so if the patients' own serum was taken for chemotaxis generation.

Treatment of clinically apparent I deficiency usually relies on the application of broad spectrum antibiotics. Infusions of fresh frozen plasma have

been shown to be followed by a limited, short-term rise in factor I concentration (half-life: 29–45 h), increased levels of C3 (with detectable C3dg/C3d), C5, CH50, factor B, factor H and properdin for up to 4 weeks, going along with an improvement in complement-dependent biological functions (Wahn et al., 1981; Barrett and Boyle, 1984; Møller-Rasmussen et al., 1988). A similar effect has been observed after the administration of purified factor I (Ziegler et al., 1975). However, there is no general agreement on long-term treatment. Repetitive infusions of fresh frozen plasma, once or twice a month carry the potential risks of transmitting blood-borne viruses, of sensitization against factor I, and of anaphylactic reactions (Barrett and Boyle, 1984). Pasteurized factor I concentrates appear to be superior to plasma infusion therapy due to virus inactivation and depletion of unwanted factor B (Østergaard-Alsøe and Kihl, 1989). However, with respect to a transient reversal of the complement disorder, replacement therapy may provide only an adjunct to the antibiotic treatment of acute infections.

The patients and their family members have been successfully vaccinated against *N. meningitidis*, *H. influenzae* type B and *S. pneumoniae*.

The I-deficient patients who are under continuous antibiotic prophylaxis are currently without complications.

Acknowledgements

The authors thank Miss Elizabeth C. Cambiucci, Sao Paulo, and Miss Uta Geiger, Heidelberg, for excellent technical assistance. Dr. M.F. Leitão is supported by CNPq, Brasília, Brazil.

References

- Abramson, N., Alper, C.A., Lachmann, P.J., Rosen, F.S., Jandl, J.H., 1971. Deficiency of C3 inactivator in man. *J. Immunol.* 107, 19–27.
- Alper, C.A., Abramson, N., Johnston, R.B. Jr., Jandl, J.H., Rosen, F.S., 1970. Studies in vivo and in vitro on an abnormality in the metabolism of C3 in a patient with increased susceptibility to infection. *J. Clin. Invest.* 49, 1975–1985.
- Barrett, D.J., Boyle, M.D.P., 1984. Restoration of complement function in vivo by plasma infusion in factor I (C3b inactivator) deficiency. *J. Pediatr.* 104, 76–81.

- Boyden, S.V. Jr., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen in polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–466.
- Brandslund, I., Siersted, H.C., Svehaug, S.E., Teisner, B., 1981. Double-decker rocket immunoelectrophoresis for direct quantitation of complement C3 split products with C3d specificities in plasma. *J. Immunol. Methods* 2, 63–71.
- Di Scipio, R.G., 1992. Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J. Immunol.* 149, 2592–2599.
- Figueroa, J.E., Densen, P., 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 359–395.
- Floret, D., Stamm, D., Ponard, D., 1991. Increased susceptibility to infection in children with congenital deficiency of Factor I. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10, 615–618.
- Grumach, A.S., Kirschfink, M., 1995. Complement and IgG subclasses in agammaglobulinemic patients. *Clin. Exp. Immunogenetics* 12, 10–15.
- Joiner, K.A., Hawinger, A., Gelfand, J.A., 1983. A study of optimal reaction conditions for an assay of the human alternative complement pathway. *Am. J. Clin. Pathol.* 79, 65–72.
- Kirschfink, M., Binder, R., 1997. Deficiencies in the alternative pathway: Factors I and H. In: Rother, K., Till, G.O., Hänsch, G.M. (Eds.), *The Complement System*. 2nd ed., pp. 420–427, in press.
- Levy, L.R., Lepow, R.B., 1959. Assay and properties of serum inhibitor of C1 esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 101, 608–611.
- Mayer, M.M., 1961. Complement and complement fixation. In: Kabat, E., Mayer, M.M. (Eds.), *Experimental Immunochimistry*. Charles C. Thomas, Springfield, pp. 133–240.
- Müller-Rasmussen, J.M., Teisner, B., Jepsen, H.H., Svehaug, S.E., Knudsen, F., Kirstein, H., Buhl, M., 1988. Three cases of factor I deficiency: The effect of treatment with plasma. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 131–136.
- Müller-Eberhard, H.J., 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 321–347.
- Nagaki, K., Iida, K., Okubo, M., Inai, S., 1978. Reaction mechanisms of β 1H globulin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57, 221–232.
- Østergaard-Alsøe, K., Kihl, J., 1989. Pasteurization of a factor I (C3b inactivator) concentrate from human plasma. *Vox Sang* 57, 240–242.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J., 1977. Human Complement C3b inactivator: Isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein β 1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* 146, 257–271.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J., 1981. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J. Exp. Med.* 154, 856–867.
- Porteu, F., Fischer, A., Descamps-Latscha, B., Hafthwachs-Mecarelli, L., 1986. Defective complement receptors (CR1 and CR3) on erythrocytes and leukocytes of factor I (C3b inactivator) deficient patients. *Clin. Exp. Immunol.* 66, 463–471.
- Rasmussen, J.M., Teisner, B., Brandslund, I., Svehaug, S.E., 1986. A family with complement factor I deficiency. *Scand. J. Immunol.* 23, 711–715.
- Rother, K., Rother, U., 1986. Hereditary and acquired deficiencies in animals and man. Karger, Basel.
- Sim, R.B., Köble, K., McAleer, M.A., Dominguez, O., Dee, V.M., 1993. Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Int. Rev. Immunol.* 10, 65–86.
- Solaf-Celigny, P., Laviolette, M., Hebert, J., Atkins, P.C., Sirois, M., Brun, G., Lehner-Netsch, G., Delage, J.M., 1982. C3b inactivator deficiency with immune complex manifestations. *Clin. Exp. Immunol.* 47, 197–205.
- Turner, M.W., 1996. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 17, 532–540.
- Van Furth, R., van Zwet, T.L., Leijh, P.C.J., 1978. In vitro determinations of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir, D.M. (Ed.), *Handbook of Experimental Immunology*, 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 32.1–32.19.
- Vyse, T.J., Späth, P.J., Davies, K.A., Morley, B.J., Philippe, P., Athanassiou, P., Giles, C.M., Walport, M.J., 1994. Hereditary complement factor I deficiency. *Quart. J. Med.* 87, 385–402.
- Vyse, T.J., Morley, B.J., Bartok, J., Theodoridis, E.L., Davis, K.A., Webster, A.D.B., Walport, M.J., 1996. The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J. Clin. Invest.* 97, 925–933.
- Wahn, V., Rother, U., Rauterberg, E.W., Day, N.K., Laurell, A.B., 1981. C3b inactivator deficiency: association with an alpha-migrating factor H. *J. Clin. Immunol.* 1, 228–233.
- Whaley, K., Ruddy, S., 1976. Modulation of the alternative pathway by β 1H globulin. *J. Exp. Med.* 144, 1147–1163.
- Ziegler, J.B., Alper, C.A., Rosen, F.S., Lachmann, P.J., Sherington, L., 1975. Restoration by purified C3b inactivator of complement-mediated function in vivo in a patient with C3b inactivator deficiency. *J. Clin. Invest.* 55, 668–672.

RESULTADOS ADICIONAIS

Estudo da migração celular

O método utilizado foi adaptado da técnica de BOYDEN JR.(1962), no qual o fator quimiotático e a suspensão de células ficam em compartimentos distintos, separados por uma membrana com porosidade pré-determinada, através da qual as células vão migrar. Como fator quimiotático foi utilizado soro ativado (10%) com LPS (lipopolissacáride) da bactéria *Escherichia coli* cepa 026:B6 numa concentração de 100µg/ml. O soro utilizado foi de indivíduos normais ou de pacientes. Para avaliar a migração espontânea utilizou-se meio de Hanks no lugar do soro ativado. Após incubação por 2 horas as membranas foram fixadas e coradas. Os resultados foram analisados no microscópio óptico com aumento de 400 vezes, verificando-se a distância percorrida pelas células em micrômetros.

Observou-se redução da migração espontânea de mononucleares dos pacientes homozigotos para a deficiência do fator I, que pode ser devida a defeito intrínseco da célula (Gráfico 1). A quimiotaxia de mononucleares desses pacientes também está reduzida (Gráfico 2), entretanto há normalização dos resultados após adição de soro controle que contém quantidades normais dos fatores quimiotáticos derivados do complemento. Nos pacientes heterozigotos não se observou alterações na migração de mononucleares (Gráficos 1 e 2). Quanto aos polimorfonucleares, a migração espontânea é normal tanto nos homozigotos quanto nos heterozigotos (Gráfico 3). A quimiotaxia de polimorfonucleares está reduzida nos pacientes homozigotos (Gráfico 4), sem recuperação após administração de soro normal, evidenciando defeito de quimiotaxia. Nos pacientes heterozigotos a quimiotaxia de polimorfonucleares é normal (Gráfico 4).

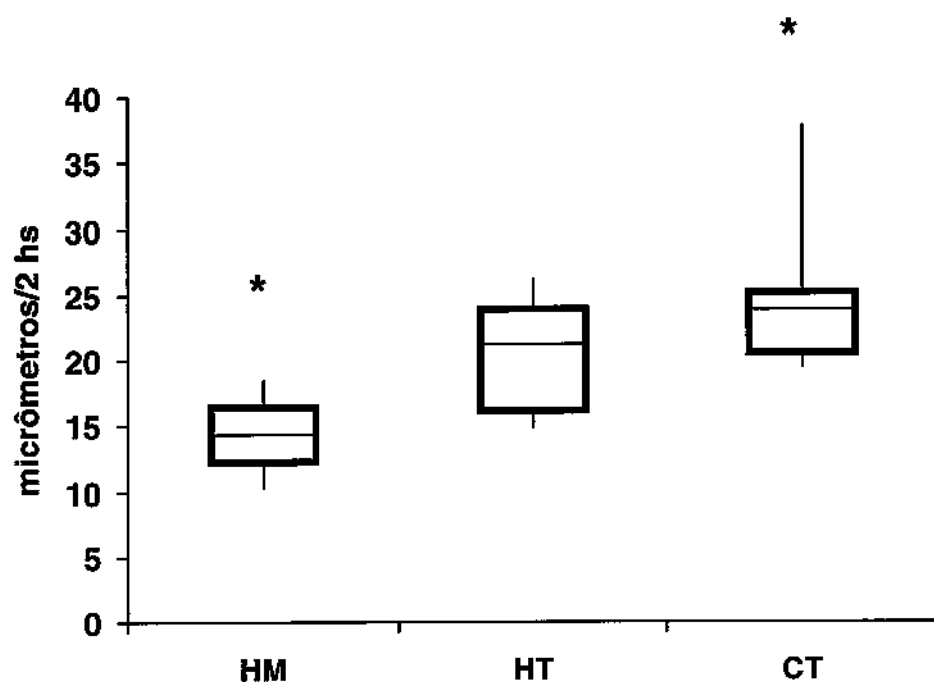


Gráfico 1- Migração espontânea de mononucleares.

Comparação da migração espontânea de células mononucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). A migração espontânea de HM foi significativamente menor que CT (* $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).

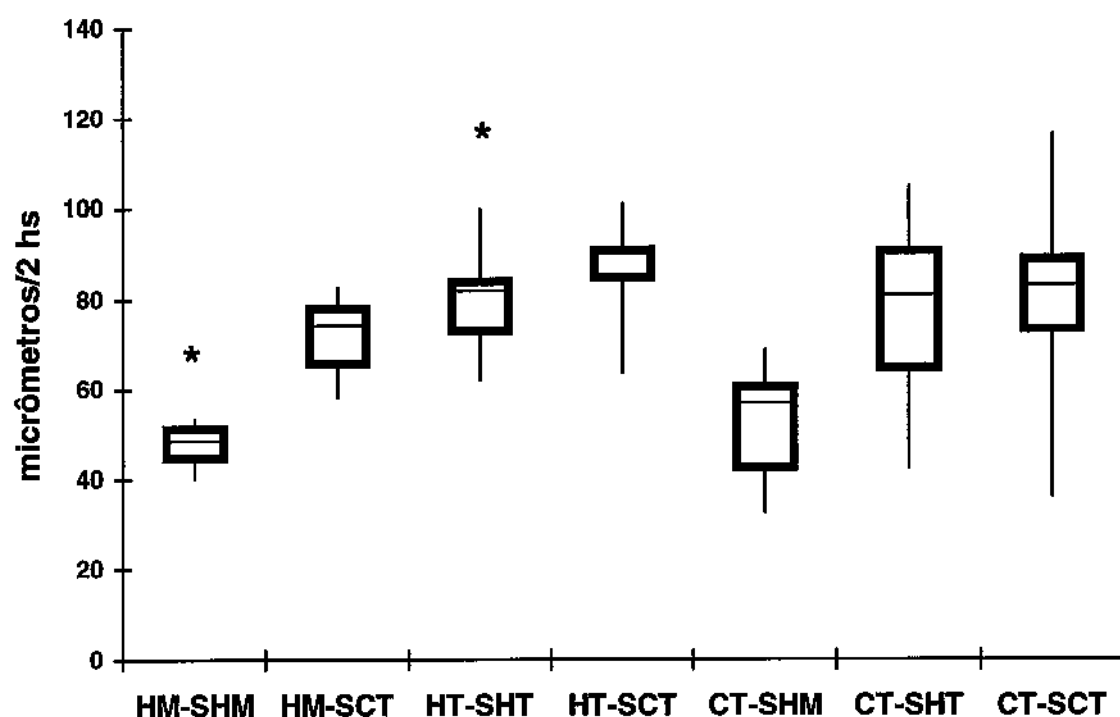


Gráfico 2 - Quimiotaxia de mononucleares.

Comparação da quimiotaxia de células mononucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT), utilizando-se como fator quimiotático soro do paciente homozigoto (SHM), soro do paciente heterozigoto (SHT) ou soro de controles sadios (SCT) ativado por LPS.

A quimiotaxia de HM-SHM foi significativamente menor que HT-SHT (* $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).

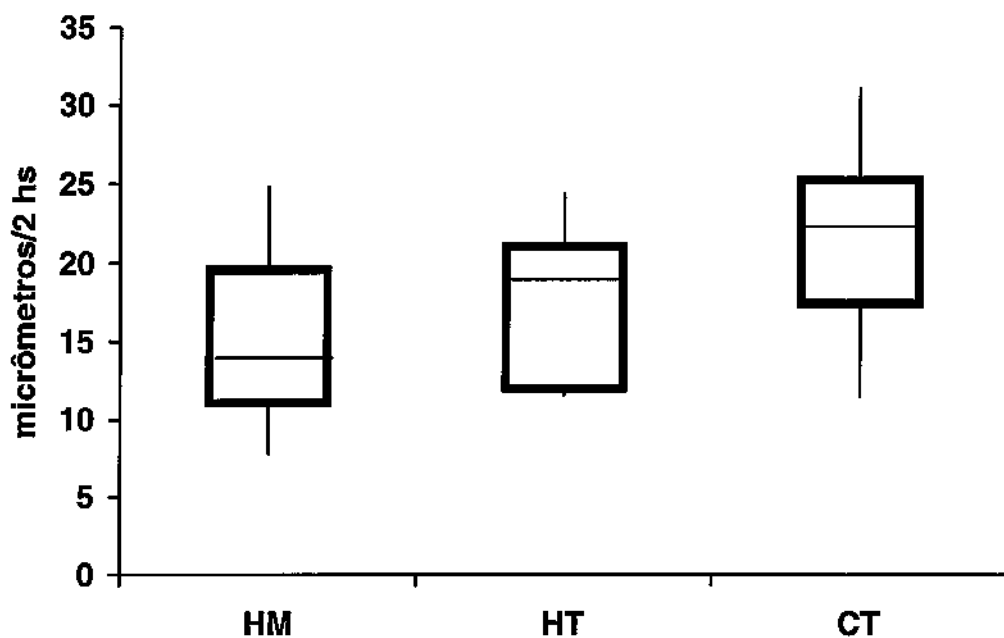


Gráfico 3- Migração espontânea de polimorfonucleares.

Comparação da migração espontânea de células polimorfonucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitey).

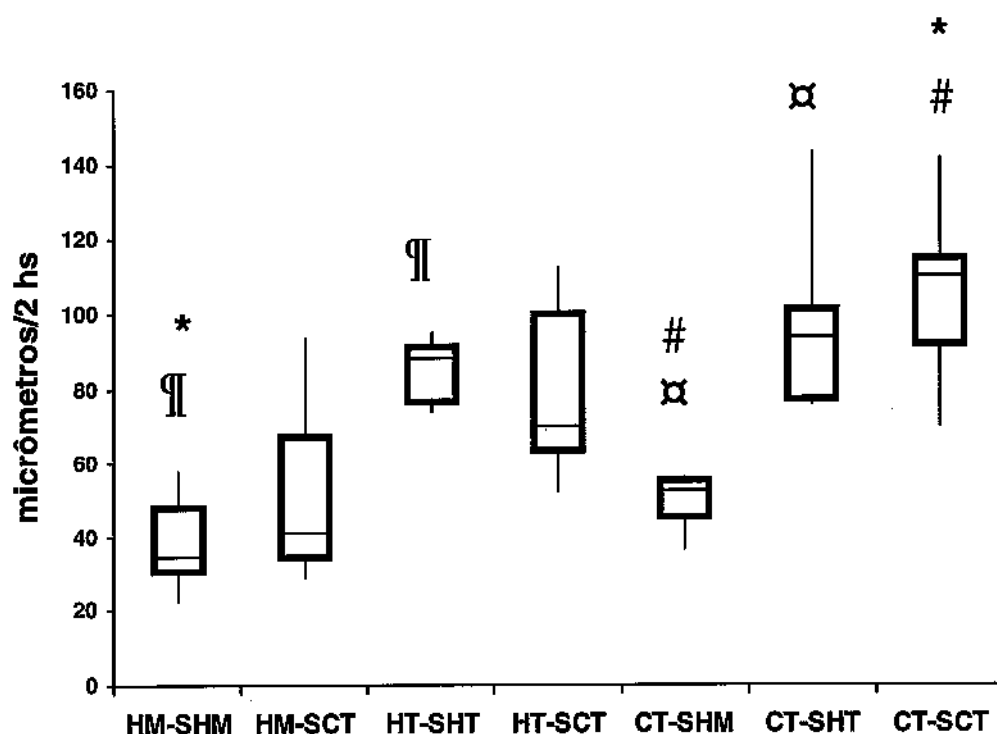


Gráfico 4 - Quimiotaxia de polimorfonucleares.

Comparação da quimiotaxia de células polimorfonucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT), utilizando-se como fator quimiotático soro do paciente homozigoto (SHM), soro do paciente heterozigoto (SHT) ou soro de controles sadios (SCT) ativado por LPS.

- A quimiotaxia de HM-SHM foi significativamente menor que CT-SCT (* $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).
- A quimiotaxia de HM-SHM foi significativamente menor que HT-SHT (¶ $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).
- A quimiotaxia de CT-SHM foi significativamente menor que CT-SHT (# $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).
- A quimiotaxia de CT-SHM foi significativamente menor que CT-SHT (♂ $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitney).

Fagocitose

A técnica utilizada foi a padronizada por VAN FURTH e colaboradores (1978), adaptada por VILELA e colaboradores (1989), descrita a seguir. Foram utilizados para o ensaio fagocítico eritrócitos de carneiro incubados com anticorpo de coelho antieritrócitos de carneiro (EA) para investigação dos fagócitos via receptores de Fc de IgG, e partículas de zimosan opsonizado com soro controle e soro do paciente para verificação da fagocitose via receptores de C3 do complemento. A fagocitose espontânea foi verificada utilizando-se zimosan não opsonizado. Monócitos foram colocados em lamínulas no tubo de Leighton e incubados por 30 minutos para que aderissem ao tubo. Posteriormente foram incubados por mais 30 minutos na presença da suspensão de partículas previamente opsonizadas a serem fagocitadas. A lamínula foi corada e o resultado verificado no microscópio óptico no aumento de 1000 vezes. Os resultados foram expressos em porcentagem de células que fagocitaram em relação ao número total de monócitos identificados, definido como índice fagocitário, e pelo número total de partículas fagocitadas por 100 monócitos, definido como capacidade fagocitária.

A fagocitose espontânea (Gráfico 5 e 6) e a fagocitose via Fc de IgG (Gráfico 7 e 8) foram normais nos dois grupos de pacientes. O índice fagocitário (Gráfico 9) e capacidade fagocitária (Gráfico 10) via receptores de C3 nos pacientes homozigotos foram reduzidos quando utilizado soro do paciente, havendo recuperação após administração de soro controle contendo níveis normais de C3. A fagocitose via receptores de C3 foi normal nos pacientes heterozigotos (Gráficos 9 e 10).

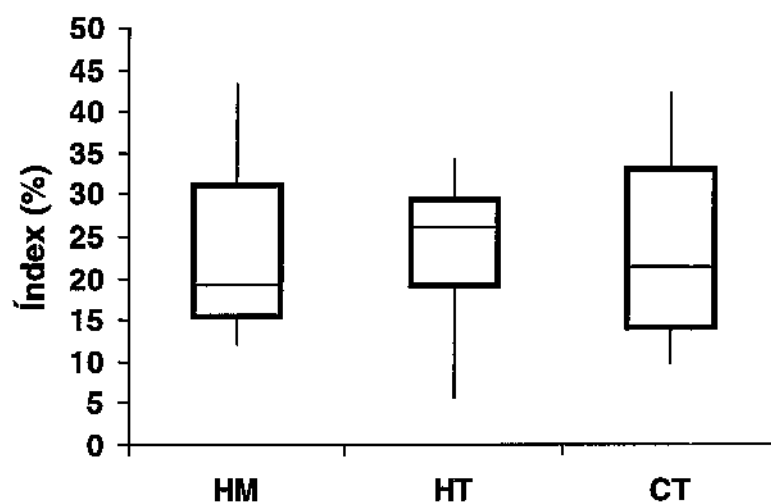


Gráfico 5- Índex fagocitário espontâneo

Comparação do índex fagocitário espontâneo de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação ao de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitey).

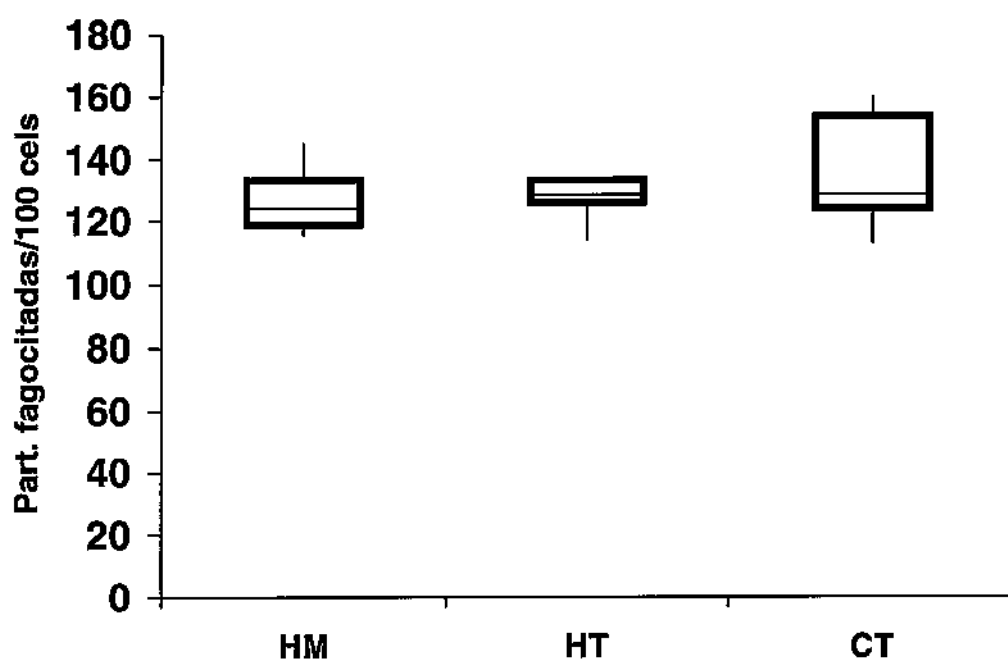


Gráfico 6- Capacidade fagocitária espontânea

Comparação da capacidade fagocitária espontânea de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitey).

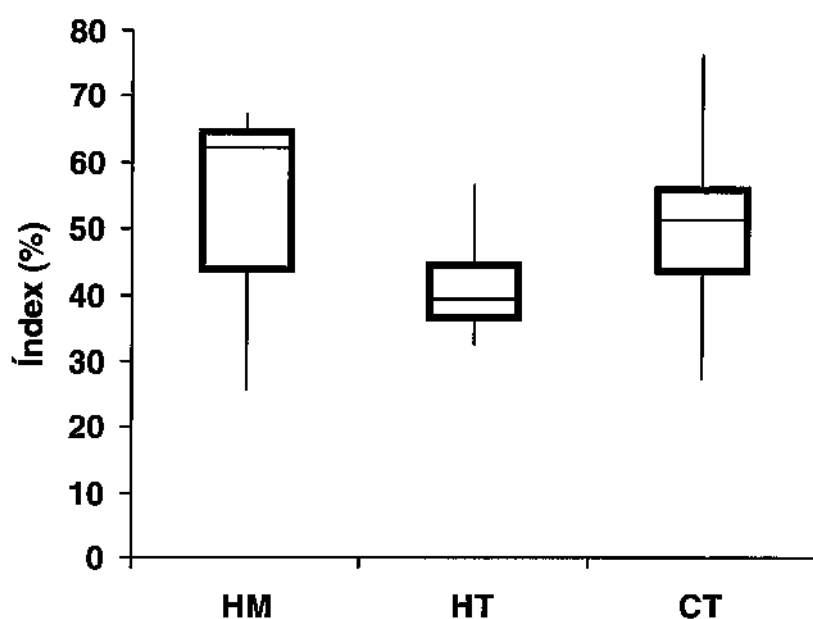


Gráfico 7- Índice fagocitário: hemácia de carneiro (EA) opsonizada por Ac-EA

Comparação do índice fagocitário via receptores de Fc de IgG de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação ao de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitey).

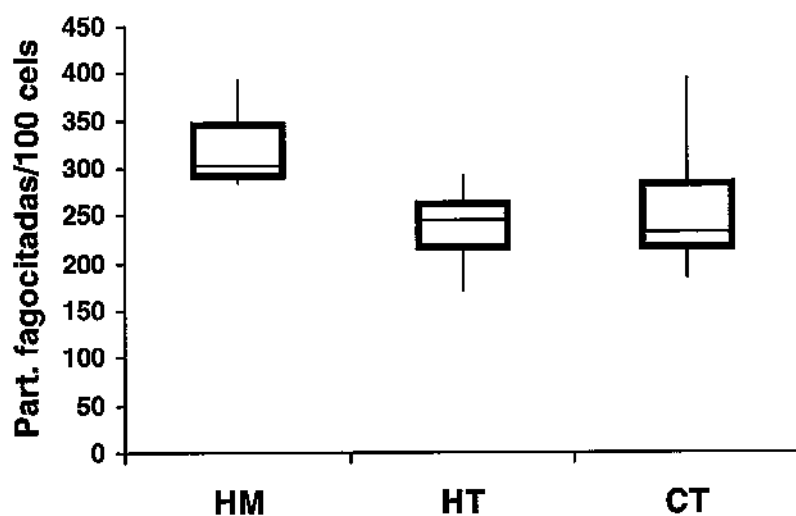


Gráfico 8- Capacidade fagocitária: hemácia de carneiro (EA) opsonizada por Ac-EA

Comparação da capacidade fagocitária via receptores de Fc de IgG de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitey).

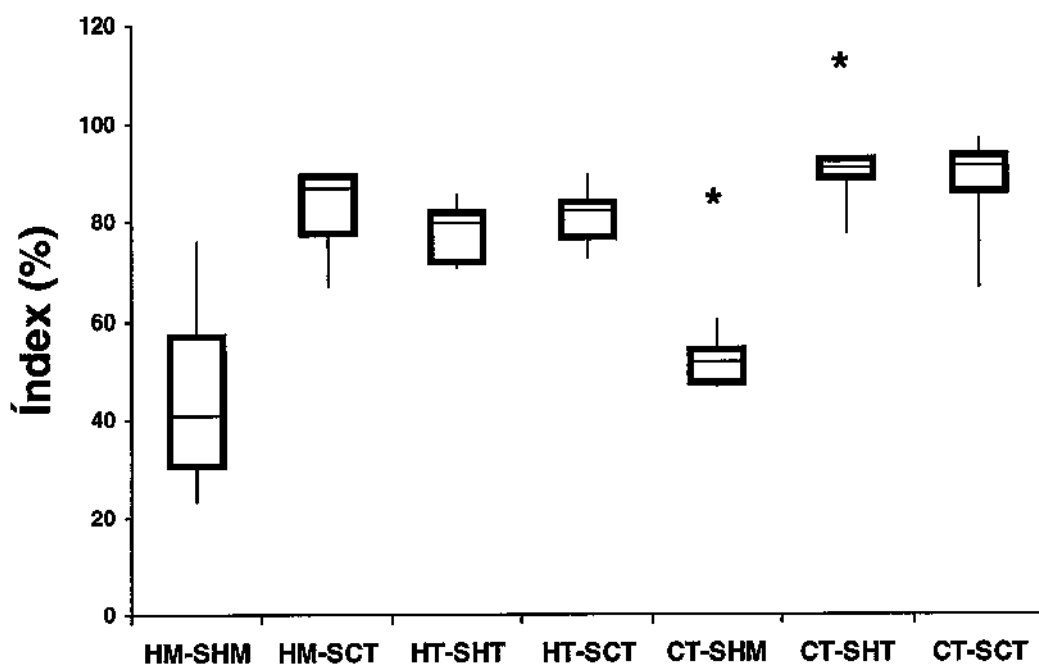


Gráfico 9- Índex fagocitário: zimosan opsonizado em soro

Comparação do índex fagocitário via receptores de C3 de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação ao de controles sadios (CT). O índex fagocitário de CT-SHM foi significativamente menor que CT-SHT(* $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitey).

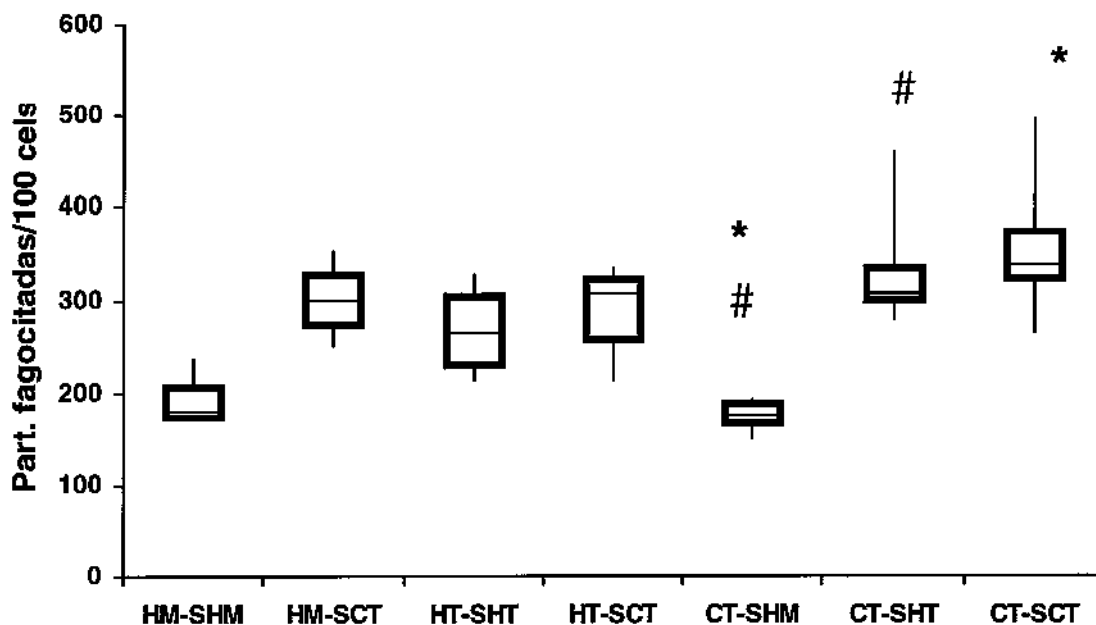


Gráfico 10- Capacidade fagocitária: zimosan opsonizado em soro

Comparação da capacidade fagocitária via receptores de C3 de monócitos dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT).

- A capacidade fagocitária de CT-SHM foi significativamente menor que CT-SCT (* $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitey).
- A capacidade fagocitária de CT-SHM foi significativamente menor que CT-SHT (# $p < 0,05$, $n=3$, teste de Mann-Whitey).

Atividade da NADPH oxidase

A quantificação do ânion superóxido liberado pelas células mononucleares e polimorfonucleares foi feita de acordo com a técnica de COHEN & CHOVANIC (1978), adaptada do método originalmente descrito por MCCORD & FRIDOVICH (1969). Resumidamente, as suspensões de células mononucleares e polimorfonucleares foram incubadas com forbol-miristato-acetato (PMA-30 nM), na presença de citocromo c (50 nM), durante 1 hora. A liberação espontânea de ânion superóxido foi avaliada usando-se meio de Hanks, ao invés de PMA. Metade dos tubos continha superóxido dismutase (SOD-60 U/ml) no início do experimento, como controle da redução inespecífica do citocromo c. A reação foi interrompida, colocando-se todos os tubos em banho de gelo e adicionando-se SOD (60 U/ml) aos que não a continham. Após centrifugar os tubos foi medida a absorbância de seus sobrenadantes a 550 nm. A produção de ânion superóxido foi calculada, usando-se um coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmols de $\text{O}_2^-/10^6 \text{ cels/h}$.

Não se observou alteração na atividade da NADPH oxidase nos deficientes do fator I, tanto nos heterozigotos quanto nos homozigotos (Gráficos 11 e 12).

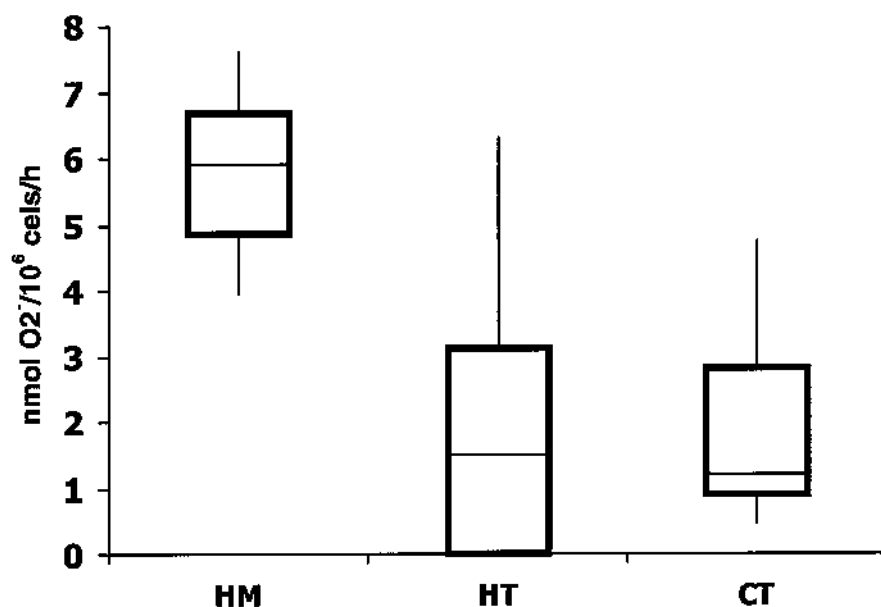


Gráfico 11- Atividade espontânea da NADPH oxidase de mononucleares

Atividade espontânea do sistema NADPH oxidase de células mononucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitney).

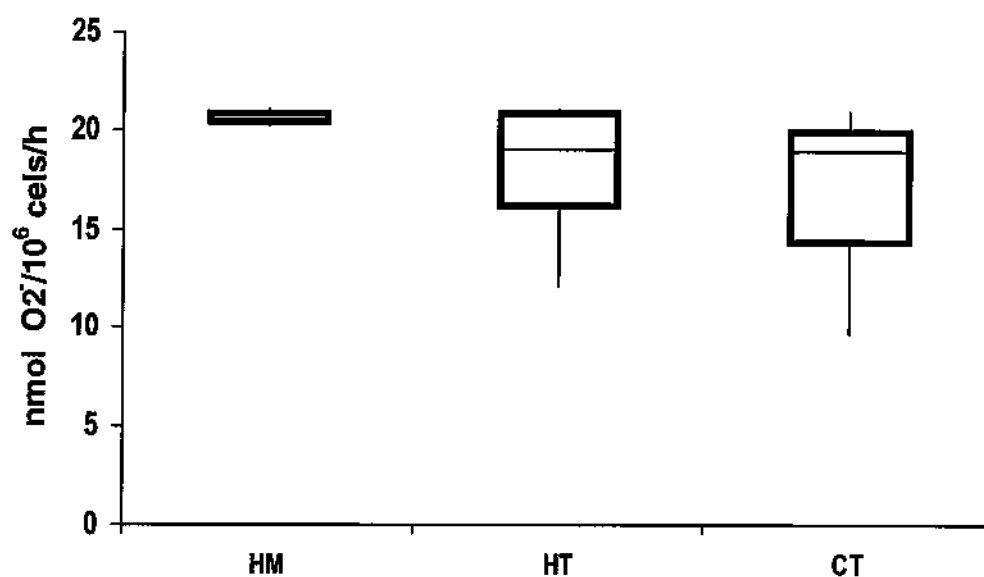


Gráfico 12 – Atividade estimulada da NADPH oxidase de mononucleares.

Atividade estimulada com PMA 30 nM do sistema NADPH oxidase de células mononucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitney).

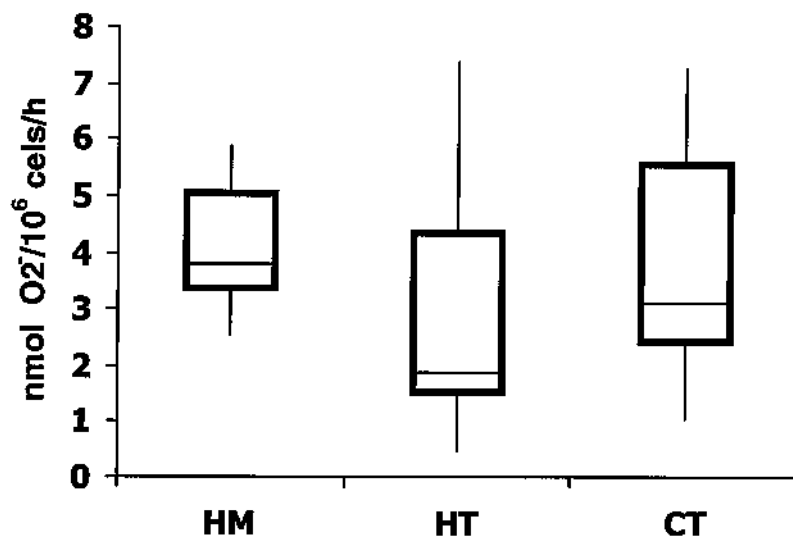


Gráfico 13 – Atividade espontânea da NADPH oxidase de polimorfonucleares.

Atividade espontânea do sistema NADPH oxidase de células polimorfonucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitney).

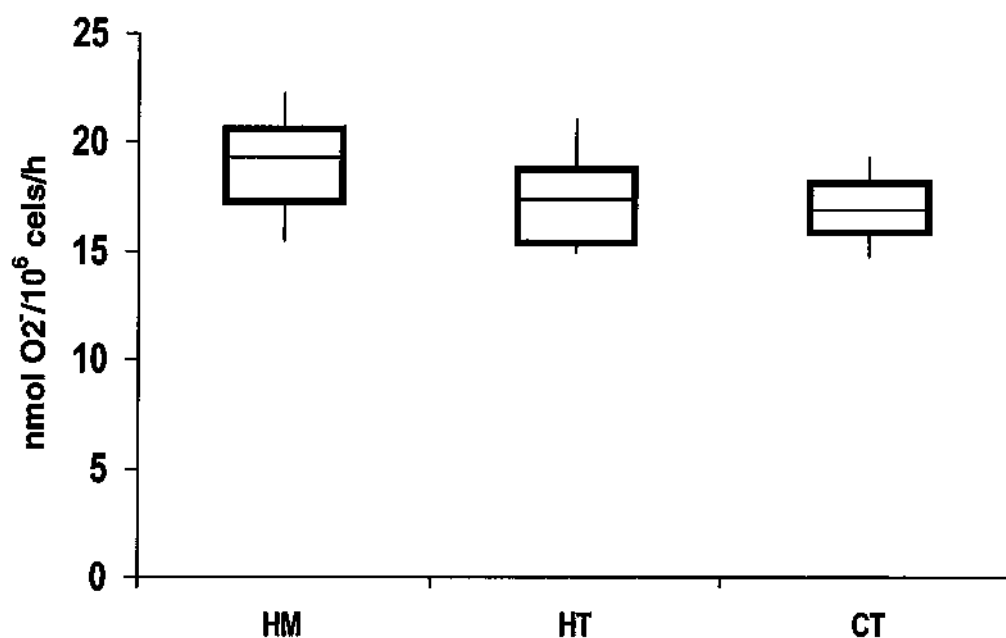


Gráfico 14 – Atividade estimulada da NADPH oxidase de polimorfonucleares.

Atividade estimulada com PMA do sistema NADPH oxidase de células polimorfonucleares dos pacientes homozigotos (HM) e heterozigotos (HT) para a deficiência do fator I, em relação a de controles sadios (CT). Não se observou diferença entre os três grupos (teste de Mann-Whitney).

DISCUSSÃO GERAL

Foram diagnosticados três indivíduos de uma mesma família com deficiência do fator I do complemento (homozigotos). Os pais desses pacientes, que são primos de segundo grau, e três dos irmãos apresentam redução de aproximadamente 50% dos níveis de fator I (heterozigotos). O padrão de transmissão genética identificado nesta família foi autossômico-recessivo.

O gene do fator I está localizado no cromossomo 4q25 (SIM et al., 1993). É formado por 13 éxons e existe uma estreita correlação entre a organização dos éxons e a estrutura da proteína. A alteração molecular da deficiência do fator I foi recentemente estudada por VYSE e colaboradores (1996) em duas famílias. Em uma das famílias havia dois indivíduos com deficiência do fator I, sendo um deles assintomático. O ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do fator I foi analisado por transcrição reversa (RT-PCR) seguida de amplificação por reação de polimerase em cadeia. Os dois irmãos foram homozigotos para a mesma alteração (adenina para tiamina) no nucleotídeo 1282 no ácido desoxirribonucléico complementar (DNAC). Esta mutação causa troca da histidina-400 por leucina. A segunda família estudada parece ser heterozigota. O primeiro alelo teve a mesma mutação que a outra família, entretanto o segundo alelo uma mutação que resultou na deleção do éxon 5.

A deficiência do fator I leva a uma ampla ativação da via clássica e principalmente da via alternativa, com hipercatabolismo das proteínas C3, fator B, fator H e properdina. Devido a redução dos níveis de C3 há prejuízo na opsonização de bactérias, e os pacientes se tornam susceptíveis a infecções das vias aéreas, meningite e sepsis. As manifestações clínicas observadas nesses pacientes são similares às descritas na literatura em pacientes com deficiência do fator I (ALPER et al., 1970; VYSE et al., 1994). Também há relato de aumento na incidência de doenças auto-imunes causada pela diminuição do "clearance" de imunocomplexos circulantes, o que não foi observado em nossos pacientes. O início das manifestações clínicas é precoce, com gravidade das infecções variável para cada paciente como pudemos observar na tabela de quadro clínico.

Além da redução do fator H por hipercatabolismo, a deficiência do fator I também leva a alteração em seu padrão eletroforético. Esta observação foi feita inicialmente por NAGAKI e colaboradores em 1978. Normalmente o fator H migra em $\beta 1$. Nos pacientes com deficiência do fator I, o fator H passa a migrar em α , na mesma posição que C3b, quando feita imunoeletroforese cruzada de C3. Após a reconstituição do soro desses pacientes com Fator I, o cofator H se dissocia do fragmento C3b e passa a migrar em $\beta 1$ (WAHN et al., 1981). DI SCIPIO (1992) demonstrou que a afinidade do fator H ao C3b não é diretamente afetada pelo fator I.

A redução dos níveis de C3 nos deficientes do fator I compromete a função dos fagócitos, resposta humoral e celular. A presença de receptores para os produtos de C3 em monócitos, macrófagos e linfócitos reforça a idéia que C3 possa influenciar na função dessas células.

SOLAL-CELIGNY (1982) e colaboradores estudaram as atividades quimiotática e fagocítica de um paciente com deficiência do fator I, tendo verificado redução da quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos. Em nosso estudo a migração espontânea dos polimorfonucleares foi normal nos pacientes homozigotos. A quimiotaxia foi reduzida, sem recuperação após administração de soro controle, sugerindo um defeito de quimiotaxia dependente não somente da diminuição dos fatores quimiotáticos séricos mas provavelmente por defeito intrínseco celular ou de receptores de membrana para o complemento nos polimorfonucleares. A atividade da NADPH oxidase de polimorfonucleares foi normal, sugerindo que a transdução de sinais nestas células é normal.

Foi verificado defeito na migração espontânea de mononucleares dos pacientes homozigotos, que pode ser devido a alteração intrínseca celular. Também foi verificado diminuição na quimiotaxia dos mononucleares revertida após administração de soro controle. A fagocitose espontânea e via Fc foram normais. A fagocitose via C3 foi

diminuída, entretanto com normalização após administração de soro com quantidades normais de C3. Não foi verificada alteração na atividade da NADPH oxidase de monócitos.

Quanto aos pacientes heterozigotos, os resultados para avaliação dos fagócitos foram normais.

Em relação ao tratamento, todos receberam imunização para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Os pacientes B6 e B7 fazem uso de antibioticoterapia profilática com penicilina benzatina a cada 21 dias, com boa evolução.

Propõe-se o uso de plasma fresco congelado para estes pacientes durante infecções agudas. Após infusão do plasma, os níveis do fator I permanecem normais na corrente sanguínea por 29-45 horas. A infusão de plasma induz a geração de C3d e C4d, aumenta as concentrações de fator B e C3. Os níveis de C3 permanecem elevados por 16 dias, enquanto que os níveis de fator B diminuem após 8 dias da administração do plasma. Efeito similar tem sido observado após administração do fator I purificado. Entretanto o uso freqüente de plasma fresco congelado pode acarretar em sensibilização ao fator I, reação anafilactóide ou transmissão de doenças infecto-contagiosas (BARRET & BOYLE, 1984).

Monócitos de sangue periférico de humanos sintetizam todos os componentes da via alternativa, incluindo as proteínas reguladoras fator I e H, sugerindo que o transplante de medula possa ser uma opção terapêutica para estes pacientes (BARRET et al., 1984). Entretanto, esta medida é discutível se levarmos em conta a relação risco-benefício (FLORET et al., 1991).

Concluimos que os pacientes deste estudo com deficiência do fator I (homozigotos) apresentam também defeito na migração de mononucleares e polimorfonucleares.

ANEXOS

Tabela 3 - Hemograma

	Hb	Leucócitos	LE	M	N	E	B	Plaquetas
	g/dl	(/mm ³)	(/mm ³)	(/mm ³)	(/mm ³)	(/mm ³)	(/mm ³)	(/mm ³)
F	15,7	6500	2795	65	2795	845		144000
M	13,8	8500	2966	408	4845	221	34	209000
B1	13	7000	2933	357	3451	203	49	204000
B2	12,7	5400	2240	44	2600	13	1	160000
B3	16,3	8000	2744	496	4416	320	24	178000
B4	15,5	6800	2298	510	3692	258	40	178000
B6	14,2	10300	3357	772	5634	484	41	223000
B7	11,9	6800	3264	285	2808	394	40	243000
B8	12,7	9700	4112	514	4462	543	67	258000

Tabela 4 - Teste de Hipersensibilidade Retardada

Paciente	Candidina	Streptoquinase	PPD	Tricofitina
F	10 mm	10 mm	10 mm	4 mm
M	4 mm	Negativo	Negativo	4 mm
B1	8 mm	8 mm	6 mm	6 mm
B2	6 mm	10 mm	8 mm	8 mm
B3	8 mm	Negativo	Negativo	5 mm
B4	Não avaliado	Não avaliado	Negativo	Não avaliado
B6	Negativo	Negativo	3 mm	Negativo
B7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
B8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 5 - Dosagem de Imunoglobulinas

Paciente	IgM (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgE (UI/ml)
F	117	1280	297	Não avaliado
M	318	1510	352	29
B1	277	2070	193	37
B2	135	1240	179	133
B3	256	1110	231	17
B4	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
B6	259	930	117	9
B7	451	1660	245	Não avaliado
B8	101	805	100	192

Tabela 6 - Contagem de Linfócitos T

Paciente	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
F	82,90	44,90	37,40	1,20
M	69,30	44	24,70	1,78
B1	69,80	50,10	22,80	2,20
B2	71,80	47	21,20	2,22
B3	67,90	44,10	23,40	1,88
B4	70,80	41,40	28	1,48
B6	67,10	38,10	25,30	1,51
B7	70,60	37,50	24,10	1,56
B8	73,40	46,20	20,80	2,22

- ALPER, C.A., ABRANSON, N., JOHNSON, J.B., JANDL, J.H., ROSEN, F.S. (1970) Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of the complement C3. *New Eng.J.Med.* **282**, 349-352.
- ALPER, C.A., ROSEN, F.S. (1981) Complement deficiencies in humans. In: Franklin, E.C.ed – *Clin.Immunol.update* New York, Elsevier, 59-75.
- AUSTEN, K.F., BENACERRAF, B., UNANUE, E.R. (1979) The classical and alternative complement sequence. – *Textbook of immunology*. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 218-238.
- BARRET, D.J., BOYLE, M.D.P. (1984) Restoration of complement function in vivo by plasm infusions in factor I (C3b inactivator) deficiency. *J. Pediatr.* **104**, 76-81.
- BOYDEN JR, S.V. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen in polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453-466.
- CARNEIRO, M.M.S., GRUMACH, A.S. (1992) *Alergia e Imunologia em Pediatria*, ed. Sarvier, 173.
- COHEN, H.J., CHOVANIC, M.E. (1978) Superoxide release measured continuously at 37o C by following SOD - inhibitable reduction of ferricytochrome C at 550 nm. *J. Clin Invest.* **61**, 1081-1085.
- COOPER, N.R., STITES, D.P., STOBO, J.D., FUDENBERG, H.H., WELLS, J.V. (1982) *Basic and Clinical Immunology*. 4th.ed. California, Lange Med. Publications, 124-135.

- DIAS DA SILVA, W., EISELE, J.W., LEPOW, I.H. (1967) Complement as a mediator of inflammation. Purification of the activity with anaphylotoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C3. *J.Exp.Med.* **126**, 1027-1048.
- DIAS DA SILVA, W., KIPNIS, T.L. (1984) Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. *Rev. Ass. Med. Brasil* **30**, 67-71.
- DI SPICIO, R.G., (1992) Ultrastructures and interactions of complement factor H and I. *J. Immunol.* **149**, 2592-2599.
- ERDEI, A., FUST, G., GERGELY, J. (1991) The role of C3 in the immune response. *Immunol. Today* **12**, 332-337.
- FLORET, D., STAMM, D., PONARD, D. (1991) Increased susceptibility to infection in children with congenital deficiency of Factor I. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**, 615-618.
- FRANK, M.M. (1992) Detection of complement in relation to disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 641-652.
- FIGUEROA, J.E., DENSEN, P. (1991) Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 359-395.
- GELFAND, J.A. (1984) How the complement components and fragments affect cellular immunological functions? *J.Trauma* **24**, 5118-5124.

- GUENTHER, L.C. (1983) Inherited disorders of complement. *J. Amer. Acad. Dermatol.* **9**, 815-839.
- HAYAKAWA, H., IWATA, T., YATA, J. (1981) Primary immunodeficiency syndrome in Japan. Overview of a nationwide survey on primary immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Immunol.* **1**, 31-39.
- HOSKING, C.S., ROBERTON, D.M. (1983) Epidemiology and treatment of hypogammaglobulinemia. Birth defects. *Original Articles Series* **19**, 223-227.
- KLEIN, J. (1982) Complement and other activation systems. In: Klein, J. – *Immunology: the science of self-nonself discrimination*. New York, Wiley & Sons, 310-346.
- KIRSCHFINK, M., BINDER, R. (1995) Deficiencies in the alternative pathway: Factor I and Factor H. In: Rother, K., Till, G.O., Hansch, G.M. (eds), *The complement system*. 2nd ed., 420-427.
- LACHMAN, P.J. (1984) Inherited complement deficiencies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **306**, 419-430.
- MARQUART, H.V., RASMUSSEN, J.M., LESLIE, R.G. (1997) Complement activating ability of leycocytes from patients with complement factor I deficiency. *Immunol.* **91**, 486-492.
- MCCORD, J., FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **224**, 6044-6055.

- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1968) Chemistry and reaction mechanisms of complement. *Adv. Immunol.* **8**, 1-80.
- MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 321-347.
- NAGAKI, K., IIDA, K., OKUBO, M., INAI, S. (1978) Reaction mechanisms of β 1H globulin. *Arch. Allergy Appl. Immunol.* **57**, 221-232.
- OCHS, H.D., WEDGWOOD, R.J., HELLER, S.R., BEATTY, P.G. (1986) Complement membrane glycoproteins and complement receptors: their role in regulation of the immune response. *Clin Immunol. Immunopathol.* **40**, 94-104.
- PANGBURN, M.K., SCHREIBER, R.D., MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1977) Human complement C3b inactivator: Isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein β 1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.*, **146**, 257-271.
- PANGBURN, M.K., SCHREIBER, R.D., MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J. Exp. Med.* **154**, 856-867.
- PERLMUTTER, D.H., COLTEN, H.R. (1986) Molecular immunobiology of complement biosynthesis: A model of single-cell control of effector-inhibitor balance. *Ann. Rev. Immunol.*, **4**, 231.

- POWIS, S.H., TROWSDALE, J. (1994) Human major histocompatibility complex genes. *Behring Inst. Mitt.* **94**, 17-25.
- RASMUSSEN, J.M., TEISNER, B., JEPSEN, H.H., SVEHAG, S.E., KNUDSEN, F., KIRSTEIN, H., BUHL, M. (1988) Three cases of factor I deficiency: the effect of treatment with plasma. *Clin. Exp. Immunol.* **74**, 131-136.
- ROBERTON, D.M., SHELTON, M.J., HOSKING, C.S. (1983) Incidence of primary immunodeficiency disorders in childhood (abstract). Fifth International Congress of Immunology.
- ROSS, S.C., DENSEN, P. (1984) Complement deficiency states and infection: epidemiology. Pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* **63**, 243-273.
- ROTHER, K., ROTHER, U. (1986) Hereditary and acquired deficiencies in animals and man. Karger, Basel.
- RYSER, O., MORELL, A., HITZIG, W.H. (1988) Primary immunodeficiencies in Switzerland: first report of the national registry in adults and children. *J. Clin. Immunol.* **8**, 479-485.
- SIM, R.B., KOLBLE, K., MCALLER, M.A., DOMINGUEZ, O., DEE, V.M. (1993) Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Int. Rev. Immunol.* **10**, 65-86.

- SOLAL-CELIGNY, P., LAVIOLETTE, M., HEBERT, J., ATKINS, P.C., SIROIS, M., GAETANEBRUN, GERTRUDELEHNER-NETSCH, DELÂGE, J.M. (1982) C3b inactivator deficiency with immune complex manifestations. *Clin. Exp. Immunol.* **47**, 197-205.
- TEISNER, B., BRANDSLUND, I., FOLKERSEN, J., RASMUSSEN, J.M., POULSEN, L.O., SVEHAG, S.E. (1984) Factor I deficiency and C3 nephritic factor: immunochemical findings and association with *Neisseria meningitidis* infection in two patients. *Scand J. Immunol.* **20**, 291-297.
- TURNER, M.W. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today* **17**, 532-540.
- VAN FURTH, R., VAN ZWET, T.L., LEIJH, P.C.J. (1978) In vitro determinations of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir, D.M. ed., *Handbook of Experimental Immunology* 3rd ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford 32.1- 32.19.
- VEITCH, J., LOVE, C., CHAUDHURI, A.K.R., WHALEY, K. (1983) Complement deficiency syndromes and bacterial infections. *Prog. Brain Res.*, **59**, 69-80.
- VILELA, M.M.S., SAMPAIO, M.M.S., COSTA, F.F. , BRANDALISE, S.R. (1989) Reduced phagocytic activity mediated by C3b and monocyte receptors from children with sickle-cell disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **22**, 725-728.

- VYSE, T.J., SPATH, P.J., DAVIES, K.A., MORLEY, B.J., PHILIPPE, P., ATHANASSIOU, P., GILES, C.M., WALPORT, M. J. (1994) Hereditary complement factor I deficiency. *Q. J. Med.* **87**, 385-421.
- VYSE, T.J., MORLEY, B.J., BARTOK, I., THEODORIDIS, E.C., DAVIES, K.A., WEBSTER, A.D.B. (1996) The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J. Clin. Invest.* **97**, 925-933.
- WAHN, V., GOBEL, U., DAY, N.K. (1984) Restoration of complement function by plasma infusion in factor I (C3b inactivator) deficiency. *J. Pediatr.* **105**, 673-674.
- WAHN, V., ROTHER, U., RAUTERBERG, E.W., DAY, N.K., LAUREL, A.B. (1981) C3b inactivator deficiency: association with an alpha-migrating factor H. *J. Clin. Immunol.* **1**, 228-233.
- WALPORT, M., LACHMANN, P. (1984) C3 receptors, complement deficiency and SLE. *Brit. J. Rheumatol.*, **23**, 3-5.
- WYATT, R.J., FORRISTAL, J., DAVIS, C.^a, COLEMAN, T.H., WEST, C.D. (1980) Control of serum C3 levels by β 1H and C3b inactivator. *J. Lab. Clin. Med.* **95**, 905-917.