

LORENA BAVIA

**CONTRIBUIÇÃO DO COMPONENTE C5
DO SISTEMA COMPLEMENTO
EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE
DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

BAVIA, L. **Contribuição do componente C5 do sistema complemento em modelo experimental de doença hepática alcoólica.** 2013. 248 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A imunidade inata contribui efetivamente para o desenvolvimento da Doença Hepática Alcoólica (DHA). Dentre os componentes da imunidade inata, em um contexto inflamatório, a ativação do sistema complemento pode ser um importante fator ligado à patogenia desta doença. Modelos murinos de DHA mostraram evidências da contribuição de C3 para o acúmulo de triglicerídeos no fígado e também no tecido adiposo. Já a proteína C5 parece estar envolvida com a injúria e inflamação hepática após o consumo crônico de etanol. Portanto, tivemos como objetivos: a) investigar a contribuição do componente C5 no estabelecimento e manutenção da DHA aplicando as linhagens C57Bl/6 (B6) e A/J, e a congênica B6 C5 deficiente (B6.A-Hc⁰); e, b) desenvolver duas linhagens congênicas para introduzir o gene *c5* mutante da linhagem A/J em fundo genético B6, e vice-versa. Para isso, camundongos B6 e A/J machos com 10 semanas de idade foram tratados com a dieta hiperlipídica de Liber-DeCarli modificada contendo etanol, ou maltodextrina, ou apenas a dieta, por 6, 8 e 10 semanas. Ao final de cada semana determinamos o número de leucócitos circulantes, coletamos material para análise histopatológica, determinamos a quantidade de triglicerídeos hepáticos, e quantificamos citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-10) hepáticas por ELISA. Observamos que em ambas as linhagens que receberam etanol houve hepatomegalia acompanhada de acúmulo de triglicerídeos, e redução das citocinas IL-6 e IL-12 ao longo das semanas de tratamento. A linhagem A/J tratada com etanol apresentou aumento de leucócitos circulantes, de IL-10 e de NO hepáticos. Além disso, apresentou menor acúmulo de triglicerídeos hepáticos em relação à linhagem B6. A linhagem B6 tratada com etanol apresentou aumento de IL-1 β e redução de IL-10 hepáticos. Dessa forma, a linhagem A/J sofreu mais danos inflamatórios que a B6, mas esteve mais protegida do acúmulo de triglicerídeos hepáticos. Uma vez validados por sequenciamento de nucleotídeos, ensaio hemolítico da Via Alternativa, imunodifusão dupla e por microssatélite, os camundongos B6.A-Hc⁰ e B6 foram tratados com as mesmas dietas anteriores por 10 semanas. Incluímos nas análises a concentração sérica de aspartato aminotransferases, fosfatase alcalina, albumina, glicose, triglicerídeos e colesterol. Coletamos materiais para análise histopatológica e ainda determinamos as quantidades de triglicerídeos e colesterol hepáticos. Por fim, quantificamos a concentração das citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TGF- β) e a produção de NO no tecido hepático. Observamos que o tratamento com etanol aumentou a concentração de IL-17 e IL-10 e reduziu IL-1 β e TGF- β hepáticas nos camundongos B6.A-Hc⁰ em relação aos B6. Encontramos também diferenças entre as linhagens, mas independente da dieta, onde os animais B6.A-Hc⁰ apresentaram maior concentração de todos os parâmetros séricos avaliados, exceto glicose. E ainda observamos na linhagem B6.A-Hc⁰ menor concentração hepática de IL-6, IL-12 e IFN- γ . Concluímos que o C5 favoreceu um ambiente hepático pró-inflamatório ao mesmo tempo que parece ser importante para o controle sérico das enzimas de função e síntese hepática, assim como do perfil lipídico no modelo de DHA.

Palavras-chave: Sistema complemento. Componente C5. Doença Hepática Alcoólica. Inflamação. Citocinas. Camundongos congênicos C5 deficientes e C5 suficientes.

ABSTRACT

BAVIA, L. **Contribution of murine complement component C5 in experimental alcoholic fatty liver disease.** 2013. 248 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Innate immunity contributes effectively to the development of Alcoholic Liver Disease (ALD). The complement system activation may play an important role in the pathogenesis of this disease. Murine models of ALD have showed evidences of the C3 contribution to the accumulation of triglycerides in liver and in adipose tissue. On the other hand, C5 protein seems to be involved with inflammation and liver injury after chronic ethanol consumption. In this work we investigated the contribution of the C5 component in the establishment and maintenance of ALD employing C57Bl/6 (B6) and A/J, and B6 C5 deficient congenic mice (B6.A-*Hc*⁰). We also developed two congenic strains introducing the mutant gene *c5* of A/J in genetic background of B6 mice, and the other way around. Ten-week old B6 and A/J male mice were treated with modified Liber-DeCarli diet, containing or not, ethanol or maltodextrin. To determine the time of treatment which most highlights the differences among the strains, mice were treated daily for 6, 8 and 10 weeks. After this period, tissue samples were collected for histopathological analysis and we quantified the number of circulating leukocytes, the amount of hepatic triglycerides and the liver cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-10). We observed that in both strains treated with ethanol there was hepatomegaly, accumulation of triglycerides in the liver, and a reduction of IL-6 and IL-12. The A/J mice group had increased numbers of circulating leukocytes, and increased levels of IL-10 and NO in the liver. They also showed a reduction in liver triglycerides compared to B6 mice, which had increased IL-1 β and reduced IL-10. Therefore, A/J strain presented more inflammatory liver damage than B6, but was more protected from hepatic triglyceride accumulation. The next step of this work was to study the congenic B6.A-*Hc*⁰ and B6 mice. Before starting the diet administration, these animals were validated by nucleotide sequencing, alternative pathway hemolytic assay, immunodiffusion and microsatellite. Then, the congenic B6.A-*Hc*⁰ and B6 mice were treated with the same diets above described for 10 weeks. The following parameters were analyzed: serum aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, albumin, glucose, triglycerides and cholesterol. We also collected tissue samples for histopathological analysis, determined the amounts of liver triglycerides, and quantified the concentration of liver cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TGF- β) and NO production. We observed that treatment with ethanol increased the concentration of IL-17 and IL-10 and reduced IL-1 β and TGF- β in the liver of B6.A-*Hc*⁰ mice compared to B6. We also found differences between the strains regardless the diet. B6.A-*Hc*⁰ mice presented higher concentrations of all serum parameters evaluated, with the exception of glucose. These animals also had a lower concentration of IL-6, IL-12 and IFN- γ in the liver. We conclude that the C5 component contributes to liver inflammation. The presence of this molecule seems to be important for the control of liver homeostasis and serum lipid profile in the model of DHA.

Keywords: Complement system. Complement component C5. Alcoholic Fatty Liver Disease. Inflammation. Cytokines. Congenic mice C5 deficient and C5 sufficient.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema complemento

O sistema complemento é formado por 30 ou mais proteínas plasmáticas e de membrana. É um dos protagonistas centrais da imunidade inata, desempenhando importante papel na defesa contra a invasão de patógenos. Uma das relevantes funções do complemento é a opsonização de partículas ou microorganismos facilitando sua fagocitose e remoção. Ele também pode participar ativamente da resposta inflamatória por meio da produção de fatores quimiotáticos (C3a, C4a, C5a) que atraem células inflamatórias para o sítio de ativação (RICKLIN et al., 2010). O complemento pode ainda solubilizar e remover imunocomplexos evitando deposição e injúria tecidual (MILLER; NUSSENZWEIG, 1974), assim como ativar linfócitos B, estimulando-os para a síntese de imunoglobulinas (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001), além da lise de microorganismos pela formação do complexo de ataque à membrana (KONDOS et al., 2010).

1.1.1 Vias de ativação

1.1.1.1 Via Clássica

O início desta via depende principalmente da presença de imunocomplexos formados por anticorpos ligados especificamente a antígenos. O complexo protéico C1 é formado por uma molécula de C1q e duas moléculas de C1r e de C1s (C1qC1r₂C1s₂). C1q inicia a ativação da via clássica ao ligar-se ao imunocomplexo, quando sofre uma mudança conformacional e passa a ativar C1r. Após este ser ativado, ele exibe atividade de serino-protease e ativa C1s que, por sua vez, também passa e exibir um sítio catalítico de serino-protease podendo clivar C4 e C2. C4 cliva-se em C4a e C4b, e a este último liga-se C2 que então sofre ação enzimática de C1s ativado, formando C2a e C2b. Os fragmentos C4b2a formam a C3 convertase, responsável esta pela clivagem de C3 em C3a e C3b. Quando fragmentos C3b ligam-se ao complexo C4b2a [C4b2a3b_n], forma-se então a C5 convertase (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**). A ação desta enzima será abordada na página seguinte.

1.1.1.2 Via Alternativa

A ativação desta via inicia-se a partir da hidrólise espontânea da ligação tiól-éster localizada na cadeia α do componente C3 gerando C3(H₂O). Esta molécula exibe sítio reativo para a proteína plasmática fator B (fB), formando o complexo C3(H₂O)B. Nesta condição, o fB pode ser clivado, pela enzima fator D (fD), em Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado ao C3(H₂O)Bb, formando a primeira C3 convertase desta via, que agora apresenta atividade de serino-protease e cliva C3 em C3a e C3b. C3b, assim como C3(H₂O), apresenta sítio para a ligação do fB, o qual, uma vez ligado a C3b, sofrerá clivagem pelo fD, resultando no complexo C3bBb, a segunda C3 convertase desta via. Quando C3 se liga ao complexo C3bBb forma C3bBb3b_n, o qual exerce atividade de C5 convertase (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**).

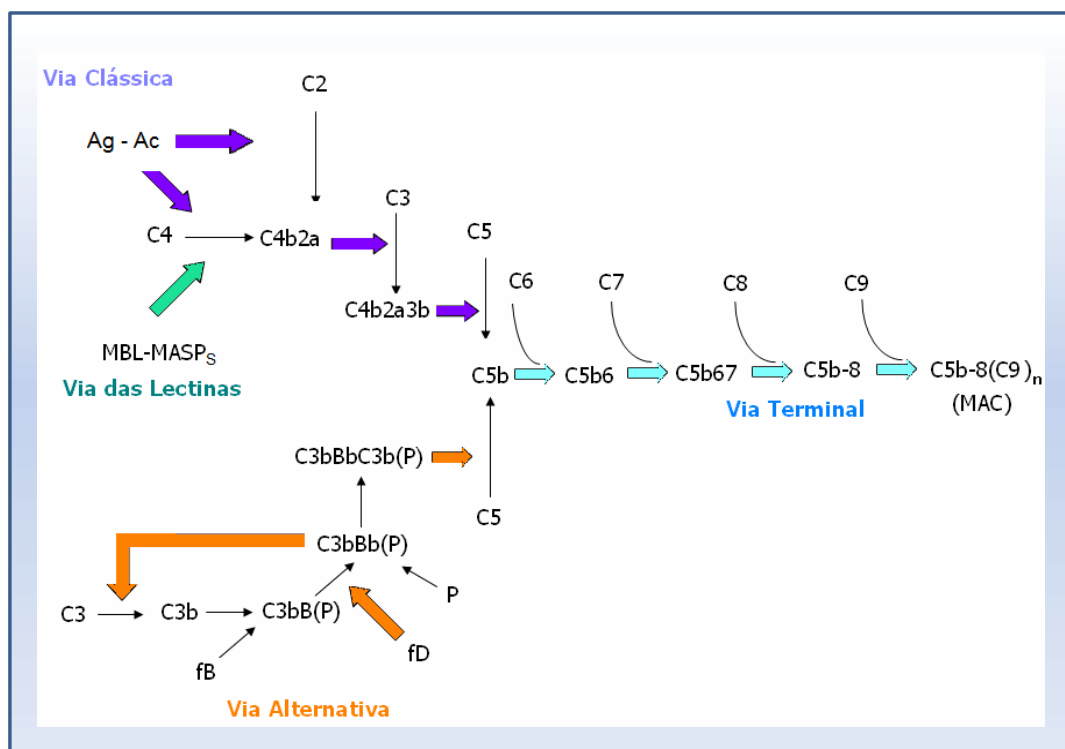
1.1.1.3 Via das Lectinas

Esta via inicia-se a partir da ligação de açúcares como manose a lectinas, como a lectina ligadora de manose (*mannose binding lectin* - MBL). A MBL tem estrutura semelhante a C1q, mas se liga a resíduos de manose, N-acetil-glicosamina, frutose, glicose, entre outros resíduos abundantes na superfície de microorganismos (TURNER, 2003). À MBL estão associadas três serino-proteases, *mannose-binding lectin-associated serine protease-1* (MASP-1), MASP-2, MASP-3, que são ativadas quando a MBL se liga a açúcares. Essa ativação leva à clivagem de C4 e de C2, resultando na formação de C3 convertases e C5 convertases, semelhantes às convertases geradas na via clássica (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**).

1.1.2 Via terminal comum

As C5 convertases formadas tanto pelas vias clássica/das lectinas (C4b2a3b) como pela via alternativa (C3bBb3b) clivam o componente C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b adere à superfície celular e a ele o componente C6 se liga, formando o complexo C5b6. A este complexo incorpora-se também o componente C7, C8 e até 18 moléculas de C9, formando o complexo de ataque à membrana (MAC) C5b678(9)_n. O MAC se insere na célula como um canal transmembrânico, favorecendo o desequilíbrio iônico e aumento do volume intracelular levando ao rompimento da membrana celular (lise) (KONDOS et al., 2010) (**Figura 1**).

Figura 1 - Ativação geral do sistema complemento.



Ativação do Sistema de Complemento. As três vias culminam na Via terminal comum com a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC), causando a lise da célula.
Fonte: Adaptado de Morgan e Harris (1999).

1.2 O componente C5

O componente C5 pertencente à via terminal comum será o alvo de estudo em nosso trabalho. Sua biossíntese é realizada principalmente nos hepatócitos (MORGAN; GASQUE, 1997). No entanto, sítios secundários também sintetizam C5 como: pulmão, baço, intestino fetal, monócitos, macrófagos e células alveolares tipo II (WETSEL, 2000).

C5 é uma glicoproteína com 190 kDa que consiste de 2 cadeias polipeptídicas, cadeia α e cadeia β , com massa molecular de 155 e 75 kDa, respectivamente, as quais são ligadas entre si por ponte dissulfídica (TACK; MORRIS; PRAHL, 1979). É sintetizada inicialmente como uma única cadeia precursora, Pró-C5, de 1676 aminoácidos (aa) incluindo um peptídeo líder com 18 aa e uma sequência de ligação rica em arginina. O precursor de C5 (Pró-C5) é processado intracelularmente, originando as duas cadeias α e β , que se mantêm juntas por ligação dissulfídica e forças não-covalentes (WETSEL, 2000). Carney e colaboradores (1991)

determinaram que o gene *c5* contém 41 éxons os quais abrangem uma região genômica de 79 kb.

Por meio de estudo com células somáticas hibridadas com DNA complementar (cDNA) e por hibridação *in situ*, Jeremiah e colaboradores (1987,1988) localizaram o gene *c5* humano no cromossomo 9q22-q34. No mesmo período, Wetsel e seu grupo (1987) também contribuíram para a análise molecular do gene *c5* humano na banda cromossômica 9q32-q34, com maior concentração na região 9q34.1 . D'Eustachio et al. (1986) estudando a localização cromossômica de genes que codificam os componentes do complemento C5 e fator H em camundongos, ratos e hamster chinês, encontraram que o gene estrutural *c5* murino localiza-se no cromossomo 2. Wetsel, Fleischer, Haviland (1990) observaram que a deleção de dois pares de base (pb), uma timina e uma adenosina (TA), no éxon 7 próximo a extremidade 5' do gene *c5* (HAVILAND et al., 1991) era responsável pela deficiência de C5 em camundongos. A deleção de TA, afeta a sequência de leitura, gerando um códon de parada prematura (UGA) a quatro pares de base do local da deleção.

1.3 Os receptores de C5a

O fragmento C5a exerce a maioria de suas atividades biológicas através da ligação com seus receptores. O gene codificador para o receptor de C5a (C5aR) encontra-se no cromossomo 19q13.3 em humanos e no cromossomo 7 em camundongos e é encontrado em vários tipos celulares como eosinófilos, basófilos, neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos. A sua interação com C5a pode mediar a inflamação local e sistêmica (HAWLISCH et al., 2005) e também regular a liberação de citocinas e quimiocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-8 (EMBER; JAGELS; HUGLI, 1998). O receptor C5aR pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (KLOS et al., 2009), já o receptor semelhante ao receptor de C5a (C5L2), descoberto em 2000 pelo grupo de Ohno foi considerado um receptor órfão putativo e não indutor de sinalização. O receptor C5L2 liga C5a, entretanto liga-se com maior afinidade ao fragmento de C5a que sofreu remoção da última arginina pela ação de uma N-carboxipeptidase (C5adesArg) (MATTHEUS; MUELLER-ORTIZ; WETSEL, 2004). Até o momento seu papel exato na resposta imune ainda é objeto de estudo (BAMBERG, et al., 2010). Existem trabalhos que mostram a expressão do receptor C5L2 em tecido adiposo e a ligação dos fragmentos C3a e C3adesArg a este receptor estimula a captura de glicose e a síntese de triglicerídeos pelo tecido adiposo. (CIANFLONE; XIA; CHEN, 2003; KALANT et al., 2005). Por outro lado, outros ligantes de C5L2 como C5a, C5adesArg

e C4a não estimulam a síntese de lipídeos (GAO et al., 2005). Portanto, a real função deste receptor permanece ainda obscura.

1.4 As funções biológicas de C5

As funções biológicas de C5 dependem da atuação de C5a e C5b de receptores que interagem com o primeiro fragmento. Com a clivagem de C5 em C5a e C5b, o produto ativado do complemento, C5a, desempenha poderosas atividades biológicas que afetam a resposta inflamatória. O fragmento C5b é essencial para a formação do MAC, contribuindo para eliminação de células-alvo, como bactérias, fungos ou protozoários (KONDOS et al., 2010).

Assim como C3a, o fragmento C5a é uma anafilatoxina. C5a é um forte regulador da vasodilatação, aumentando a permeabilidade dos pequenos vasos e induzindo a contração da musculatura lisa. Em células como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, a ligação do fragmento C5a em seu respectivo receptor, C5aR, pode estimular a explosão respiratória. Já em células como mastócitos e basófilos, C5a estimula a liberação de histamina. O fragmento C5a ainda é considerado um poderoso quimioatraente, recrutando células como: macrófagos, neutrófilos, linfócitos B ativados, linfócitos T, basófilos e mastócitos para o sítio inflamatório. Todas estas funções podem tanto contribuir para as funções imunes protetoras, quanto causar danos aos tecidos (GUO; WARD, 2005; KLOS et al., 2009).

Em adição às propriedades pró-inflamatórias do fragmento C5a, descritas acima, estudos recentes mostram que este fragmento também desempenha importante papel em outros contextos. Em 2000, Karp et al. empregando técnicas de microarranjo, polimorfismo de nucleotídeos (SNP) e *Quantitative Trait Locus* (QTL) identificaram o gene codificador de C5 como *locus* de susceptibilidade para o desenvolvimento da asma alérgica experimental. Addis-Lieser, Kohl, Chiaramonte (2005) estudaram o papel de C5 no desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Estes autores observaram que durante a fase aguda C5 teve um papel protetor e anti-inflamatório, entretanto, durante o estágio crônico C5 contribuiu para o desenvolvimento de fibrose pulmonar. Estes dados sugerem o envolvimento de C5 tanto na inflamação quanto no reparo tecidual em modelos de fibrose induzido por bleomicina. Em modelos de fibrose hepática Hillebrandt et al. (2005) também empregaram a análise de QTL para identificar o *locus* que confere susceptibilidade à fibrose. O mesmo grupo também observou que C5 possui efeito fibrogênico tanto em modelos de fibrose murinos ou humanos. Complementando estes estudos sobre o papel fibrogênico do

componente C5 em modelo de fibrose biliar induzido pela técnica de ligação do ducto biliar aplicando camundongos C5 suficientes e C5 deficientes observou-se que nos camundongos C5 deficientes a inflamação tornou-se atenuada concomitante a redução significativa de fibrose biliar (SCHMITT et al., 2012). Estes estudos evidenciam o componente C5 como um potencial alvo para intervenções terapêuticas para o controle do desenvolvimento de fibrose.

Em modelo de malária cerebral os camundongos C57Bl/6 (C5 suficientes) são susceptíveis à infecção, já os camundongos A/J (C5 deficientes) são resistentes. Para investigar se esta susceptibilidade estaria associada ao componente C5 ou ao fundo genético, Patel et al. (2008) geraram camundongos congênicos C57Bl/6 (C5 deficientes) e A/J (C5 suficientes) e submeteram estes animais à infecção com *Plasmodium berghei*. Interessantemente, estes autores encontraram que os animais A/J C5 suficientes tornaram-se susceptíveis ao desenvolvimento da malária cerebral. Estes resultados implicam que C5 contribuiu para a patogênese da malária cerebral independentemente do fundo genético da linhagem de camundongo empregada no modelo. Da mesma forma, camundongos C5 ou C5aR deficientes também foram resistentes em desenvolver sepsis, quando submetidos ao modelo experimental de punção e ligação do ceco (WARD, 2008).

Outro exemplo da ação de C5, em especial de C5a, é a regulação da imunidade adaptativa em contexto tumoral. A geração de C5a no microambiente tumoral aumenta o crescimento do tumor, suprimindo linfócitos T CD8⁺. Esta supressão está associada com o recrutamento de células supressoras mielóides para o sítio tumoral. C5a estimula as células supressoras a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais inibem a especificidade antigênica das células TCD8⁺, que por sua vez deixam de atuar sobre as células tumorais permitindo o seu desenvolvimento (MARKIEWSKI et al., 2008).

Em modelo de artrite auto-imune, a ativação do sistema complemento e a geração dos seus produtos de ativação, como C5a, podem iniciar a diferenciação de células Th17 a partir de células TCD4⁺. A expansão da subpopulação Th17 pode piorar o quadro de doenças auto-imunes ou a própria resposta imunológica às infecções. O bloqueio do C5aR pode beneficiar o controle da inflamação e da progressão de doenças auto-imunes mediadas por Th17 (HASHIMOTO et al., 2010).

Além das funções citadas acima, os componentes do complemento, em especial C5, estão associados com a promoção de doenças neurodegenerativas em modelos animais. Empregando o modelo murino de Doença de Alzheimer, Fonseca et al. (2009) estudaram a contribuição de C5a e C5aR na patogênese e comportamento neste modelo de doença neurodegenerativa. Sabendo que C5a recruta e ativa células da microglia e astrócitos via

C5aR, estes autores administraram aos camundongos um peptídeo antagonista do C5aR. Após este tratamento, houve redução no quadro patológico desencadeado pela progressão da doença, melhora comportamental e cognitiva dos camundongos. Estes resultados sugerem que a inibição da função mediada por C5aR pode interferir na neuroinflamação e neurodegeneração em modelos murinos de Doença de Alzheimer. Trabalhos empregando a administração de peptídeos antagonistas do C5aR em doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) foram elegantemente discutidos na revisão de Woodruff e colaboradores (2010). Esta revisão mostrou que o uso de antagonistas para C5aR protegeu os camundongos em vários modelos de doenças degenerativas, injúrias agudas do SNC e infecções do SNC. Além disso, foi identificado que tanto o componente C5 quanto o seu receptor foram expressos durante o período de neurulação com expressão localizada na região cefálica do tubo neural. Em modelo de deficiência de ácido fólico durante o processo gestacional a remoção do gene C5aR ou após a administração de peptídeo antagonista ao C5aR em camundongos fêmeas prenhes houve má formação do tubo neural (DENNY et al., 2013). Assim sendo, além da promoção de doenças relacionadas aos SNC o componente C5 e C5aR também estão envolvidos com o desenvolvimento embrionário neurológicos em mamíferos.

Portanto, reunimos aqui algumas funções que envolvem o componente C5, que vão desde o seu papel clássico como anafilatoxina e como um componente pró-fibrogênico, até como um fator chave para o desenvolvimento de respostas inflamatórias severas em condições de malária cerebral e sepsis, ainda contribui para a progressão tumoral e para as doenças que acometem o SNC.

1.5 O componente C5 e a regeneração hepática

O fígado, além de ser um órgão fundamental para síntese e armazenamento de glicose, ele também é responsável pela síntese de colesterol, assim como pela lipogênese e metabolismo de proteínas. É o principal órgão desintoxicador do corpo, por meio do metabolismo de diversos fármacos e toxinas, e conseqüentemente, pela remoção dos produtos resultantes deste processo. O fígado, mesmo desempenhando estas inúmeras funções, também possui extraordinária capacidade regenerativa, regulando sua própria massa e crescimento (TAUB, 2004).

O componente C5 pode exacerbar a resposta inflamatória e conduzi-la a danos severos como citamos anteriormente. Mas, curiosamente, ele também pode desempenhar um papel

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

