
Sistema complemento e dor: uma importante interface entre sistema imune e sensorial**Andreza Urba de Quadros ***

No início do século XX, Jules Charles Bordet, um estudante de Metchnikoff, um dos primeiros pesquisadores a identificar a existência e função dos anticorpos no organismo, iniciou seu trabalho no Instituto Pasteur. Ao chegar, foi desafiado a entender o experimento de um pesquisador alemão, em que animais previamente imunizados com fragmentos da bactéria da cólera, que eram posteriormente infectados por este patógeno, morriam muito mais rapidamente que animais que nunca haviam entrado em contato com a bactéria. Já se sabia que isso acontecia devido à produção de anticorpos, mas pouco se sabia sobre como eles agiam. Bordet então incubou o soro fresco de animais imunizados a 37 °C, com a bactéria da cólera e observou que havia lise bacteriana intensa, o que causava a eliminação do patógeno, mas também a morte dos animais.

O mais interessante desse experimento, entretanto, é que Bordet observou que o ensaio só funcionava se ele usasse soro fresco de animais imunizados. Bordet já sabia que os anticorpos eram estáveis ao aumento da temperatura, e por isso, suspeitou de que haveria um segundo componente antibacteriano no soro desses animais. Ele aqueceu as amostras a 55 °C e observou que a capacidade bacteriolítica do soro de animais imunizados era perdida, mas também, que poderia ser recuperada com a adição de soro fresco, mesmo que este fosse proveniente de animais não imunizados. Bordet concluiu então que, além dos anticorpos específicos, havia no soro de qualquer animal um componente inespecífico, termolábil, também capaz de eliminar patógenos. Ele os chamou inicialmente de alexinas, que mais tarde, foram renomeados para complemento. Esta e outras inúmeras contribuições de Bordet ao campo da imunologia o levaram a ganhar o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1919.

O sistema complemento é o mais antigo mecanismo de defesa que se conhece. Data de cerca de 700 milhões de anos, e mesmo animais primitivos, incapazes de montar uma resposta imune adaptativa, produzem componentes do complemento como mecanismo de proteção. O complemento é composto por diversas proteínas inativas ou pouco ativas, solúveis ou de membrana, produzidas majoritariamente pelo fígado e presentes na corrente sanguínea. Diante de um estímulo, algumas dessas proteínas são ativadas, levando a consequente ativação de outras proteínas, em forma de cascata, da mesma maneira que a coagulação. Há basicamente cinco formas de se ativar a cascata do complemento: pela via clássica, lectina, alternativa, C2 *bypass* ou ainda por vias extrínsecas. Não entraremos em detalhes destas vias por não ser o objetivo deste editorial, mas você pode contar com excelentes revisões indicadas ao final deste texto.

Nos últimos anos, descobrimos que o sistema complemento não participa apenas do combate a patógenos, mas também é responsável pela eliminação de células defeituosas e mortas, contribuindo para a homeostase do organismo. Uma célula humana saudável expressa em sua membrana uma quantidade significativa de proteínas reguladoras da cascata do complemento, impedindo assim que haja dano celular enquanto a cascata proteolítica é ativada a seu redor. Uma vez que células microbianas não expressam esses reguladores, além de ser ativada na superfície dessas células, a cascata é ainda amplificada, levando à morte microbiana por lise e desequilíbrio osmótico e facilitando a fagocitose (opsonização), além de permitir a liberação de mediadores inflamatórios potentes: C3a e C5a. Esses dois componentes são importantes elementos quimiotáticos, recrutando leucócitos para o local de ativação; promovendo a liberação de grânulos de histamina, que aumenta a permeabilidade vascular (favorecendo a diapedese), sendo por isso chamados de anafilotoxinas; além de serem capazes de ativar fatores de transcrição inflamatórios, como o NFκB, induzindo a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1β e

TNF- α . Em células apoptóticas, a cascata é ativada, mas fracamente amplificada, permitindo que essas células sejam eliminadas por fagocitose, mas que o tecido circunjacente seja preservado. Se qualquer desequilíbrio acontece nesse delicado sistema, há dano em células saudáveis. De fato, diversas condições inflamatórias e autoimunes têm sido direta ou indiretamente relacionadas a disfunções no complemento, seja por uma ativação inadequada da cascata ou por alterações na expressão e função de proteínas reguladoras. Alguns exemplos são a sepse, psoríase, miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, doença de Chron, artrite reumatoide, rejeição a transplantes, câncer, asma, em diversas condições renais, em situações de injúria tecidual por isquemia e reperfusão, como no infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e cirurgias de circulação sanguínea extracorpórea, e ainda em doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer.

Mas, e na dor? O que sabemos? Já existem opções terapêuticas baseadas no sistema complemento?

Os primeiros estudos relacionando o sistema complemento e a dor foram feitos por John Levine, em 1985. Buscando entender a importância dos leucócitos polimorfonucleares na dor, Levine administrou C5a na pata de ratos, a substância quimiotática mais caracterizada até então. Ele observou que, além de induzir a migração de neutrófilos para o local, esses animais apresentaram um limiar à dor bastante reduzido. Mais tarde, nas décadas de 80 e 90, alguns artigos mostraram que os neurônios, tanto periféricos como centrais, além das células da glia (astrócitos, microglia, células satélite e Schwann) expressavam constitutivamente componentes do complemento, e que esta expressão era aumentada diante de estímulos bacterianos, virais, inflamatórios ou diante de dano tecidual (como uma lesão do nervo, por exemplo).

Entretanto, os trabalhos que avaliaram diretamente o papel do sistema complemento na dor vieram apenas a partir de 2006. Embora se saiba que C3a e C5a são, por si, capazes de induzir dor quando administrados na pata ou por via intratecal, e de várias evidências deixarem claro que esses dois componentes têm papel crucial na sensibilização dos neurônios nociceptivos, ainda sabemos muito pouco sobre os mecanismos pelos quais eles fazem isso. Os dados que trazemos aqui, embora resumidos, abrangem todos os trabalhos já publicados a respeito, e você poderá perceber que ainda há muito para ser feito.

Em modelo experimental de dor pós-incisional (pós-cirúrgica), Clark e colaboradores mostraram que o tratamento sistêmico com um antagonista do receptor de C5a (C5aR) reduz a dor e o edema induzidos pela incisão, e o mecanismo responsável por isso parece ser a redução da liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e pró-nociceptivas na pata. Liang mostrou os mesmos resultados ao induzir o modelo em animais nocaute para o receptor de C5a. Mais tarde, o trabalho de Jang reforçou esses resultados, e ainda mais, mostrou que a expressão de C5a e de seu receptor estão aumentadas na pele em torno da incisão. Além disso, ensaios *ex vivo* mostram que C5a sensibiliza fibras C ao calor, reduzindo seu limiar de ativação.

O trabalho que melhor descreveu os mecanismos envolvendo a participação de C5a na dor explorou diferentes modelos de dor inflamatória. Ting e colaboradores demonstraram a capacidade de um antagonista do receptor de C5a, administrado localmente (na pata), de reduzir significativamente a dor inflamatória envolvendo tanto o sistema imune inato como. Diferente do que foi observado em modelos de dor pós-incisional, este trabalho mostra que o tratamento com o antagonista não reduz a liberação de citocinas na pata dos animais após a administração de zimosan ou carragenina, embora reduza de maneira importante a dor causada pelas citocinas, quando administradas diretamente na pata. Além disso, o tratamento com o antagonista de C5aR não afeta a migração de leucócitos induzida por carragenina, mas se os leucócitos foram abolidos da pata por tratamento prévio com vimblastina, a injeção de C5a não causa mais dor, mostrando que, nesses modelos, a dor induzida por C5a não depende da migração de

leucócitos para o local da lesão, mas é diretamente dependente da presença de leucócitos no tecido. Possivelmente, C5a está ativando esses leucócitos a liberarem produtos pró-nociceptivos, como IL-1 β e TNF- α .

Na dor neuropática é indiscutível que o sistema complemento participa. De que forma, ainda sabemos pouco. Dois importantes trabalhos, de Griffin e Levin, fizeram ensaios de *microarray* no nervo periférico, gânglio da raiz dorsal (GRD) e medula espinal, buscando encontrar os genes mais expressos durante três diferentes modelos de neuropatia. Eles encontraram que genes responsáveis pela expressão de componentes do sistema imune eram os mais expressos, comuns entre os diferentes modelos experimentais e dentre eles, os mais importantes eram C3a e C5a. Surpreendente! Seguindo os estudos, o trabalho de Twinning mostra que o tratamento com um análogo solúvel do receptor *decoy* sCR1, reduz a dor neuropática causada por diferentes estímulos e esses dados são confirmados por outros trabalhos, seja por meio do tratamento com drogas ou mesmo com os animais nocautes para o receptor de C5a, em diferentes modelos experimentais de neuropatia. O que sabemos a respeito dos mecanismos? Localmente, o trabalho de Li mostra que a inibição da cascata do complemento reduz a presença de macrófagos e linfócitos T no nervo periférico ao redor da ligação do nervo no modelo de PSNL. No GRD, Levin mostra que há um aumento na expressão do componente C3a nas células satélite e a redução na expressão da proteína reguladora DAF nos neurônios, caracterizando um desequilíbrio que leva à sensibilização. Na medula espinal, observa-se o aumento da expressão de vários componentes do sistema complemento, como C1q, C3 e C4 após lesão no nervo, bem como aumento da expressão do receptor de C5a no corno dorsal. Tanto esses componentes, como o receptor de C5a estão expressos majoritariamente na microglia. Além disso, a liberação de C3a pela microglia é fortemente estimulada por IL-1 β e TNF- α , reforçando a tese de que não apenas o estímulo inflamatório da periferia ativa a glia espinal, como também, a própria glia libera estímulos inflamatórios que sensibilizam o neurônio a longo prazo, levando à cronificação da dor.

Mas, e terapeuticamente, o que podemos dizer?

Existem duas drogas disponíveis no mercado, que têm como alvo o sistema complemento. São elas o eculizumab, anticorpo monoclonal humanizado de longa ação contra C5a e um inibidor de C1, o C1INH. Além destes, temos outros diversos fármacos já em fase clínica de testes, embora nenhum deles tenha sido testado na dor. A boa notícia é que, recentemente, a indústria farmacêutica italiana Dompé, em colaboração com pesquisadores da USP de Ribeirão Preto (a saber, do grupo que gerencia o DOL), desenvolveu e testou um novo antagonista alostérico do receptor de C5a, desenvolvido por planejamento racional (*in silico*), com boa disponibilidade se administrado por via oral e com parâmetros farmacocinéticos promissores. Os dados de atividade mostram que o tratamento com esta droga é capaz de reduzir a dor causada por estímulos como carragenina, zimosan e CFA, além da dor neuropática, em diferentes esquemas terapêuticos.

Estes dados são apenas o começo do que sabemos. Ainda há muito por ser feito e saibam, está sendo feito! Esperamos que, em breve, o complemento como alvo terapêutico possa ser eficaz não apenas na redução da dor, mas no tratamento de diversas outras condições.

"Uma conexão oculta é mais forte que uma óbvia", Heraclitus de Éfeso (535–475 AC).

Bibliografia:

- Clark JD (2006) *Anesthesiology* 104(6):1274-82;
- Griffin RS (2007) *J Neurosci.*27(32):8699-708;
- Jang JH (2010) *Pain* 148(2):343-52;
- Jang JH (2011) *J Neuroinflammation.*7:8:80;
- Klos A (2013) *Pharmacol Rev.* 65(1):500-43;

- Levin ME (2008) Pain 137(1):182-201;
- Li M (2007) Eur J Neurosci. 26(12):3486-500;
- Liang DY (2012) Pain 53(2):366-72;
- Mathern DR & Heeger PS (2015) Clin J Am Soc Nephrol., only on line;
- Moriconi A (2014) PNAS 111(47):16937-42;
- Nie F (2013) Int J Mol Med. 31(6):1333-42;
- Ricklin D & Lambris JD (2013) Adv Exp Med Biol 735:1-22;
- Ricklin D & Lambris JD. (2013) J Immunol. 190(8):3831-8;
- Ricklin D & Lambris JD. (2013) J Immunol. 190(8):3839-47;
- Ricklin D (2010) Nat Immunol. 11(9):785-97;
- Ting E (2008) Br J Pharmacol 153(5):1043-53;
- Twining CM (2004) Pain 110(1-2):299-309;
- Twining CM (2005) J Pain 6(3):174-83.

* Farmacêutica, doutoranda do Laboratório de Dor do Depto. de Farmacologia da FMRP-USP