

## Comparative biology of the complement system in fish\*

*Biología comparada del sistema de complemento en peces*

*Biologia comparativa do sistema complemento em peixes*

Miguel Macgayver Bonilla Morales<sup>1</sup>, Lic. Producción Agropecuaria;  
Iang Schroniltgen Rondón-Barragán<sup>1,2\*</sup>, MVZ MSc.

*\*Autor para la correspondencia: Iang Schroniltgen Rondón Barragán, Laboratorio de Diagnóstico Veterinario, Bloque 33 L105, Universidad del Tolima, Santa Helena. Ibagué, Tolima. E-mail: isrondon@ut.edu.co*

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos, Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), Universidad de los Llanos, Km 12 Vía Puerto López, Villavicencio, Colombia. E-mail: espacioinmune@gmail.com

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Inmunología y Fisiopatología Animal - IFA, Universidad del Tolima, Departamento de Sanidad Animal, Ibagué, Colombia, E-mail: isrondon@ut.edu.co

*(Recibido: 30 de Agosto de 2011; aceptado: 05 de Diciembre de 2011)*

### Abstract

Within the humoral immune response can be found components that maintain an organism's homeostasis via control of pathogenic agents using opsonization, chemotaxis of phagocytic cells which facilitates the process of elimination of foreign bodies, or in its absence, the formation of pores in the cellular membrane. One of these groups of components, of protein origin, is referred to as the complement system, which has 3 means of activation (Classic, Alternative, and Lectins) and functions as anaphylactic toxins, regulators and receptors. The aim of this review is to discuss the different components of the complement system in the animal kingdom, focusing principally on teleost fish and mammals, as model organisms in the search to elucidate their differences, homologies, and answers.

\* Para citar este artículo: Bonilla MM, Rondón-Barragán IS. 2011. Biología comparada del sistema de complemento en peces. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (2): 74-90

## Key words

*Innate immunity, complement system, classic pathway, lectin pathway, alternative pathway, vertebrates.*

## Resumen

Dentro de la respuesta inmune humoral se encuentran componentes que mantienen la homeostasis de los organismos a través del control de agentes patógenos por medio de la opsonización, quimiotaxis de células fagocíticas facilitando el proceso de eliminación de lo extraño o sin su acompañamiento, en el caso de la formación de poros en la membrana celular. A un grupo de este conjunto de componentes de origen molecular proteico se denominó sistema del complemento, el cual posee tres vías de activación (Clásica, Alternativa y Lectinas), funciona como anafilatoxinas, reguladores y receptores. La presente revisión tiene como objetivo discutir acerca de los diferentes componentes del sistema del complemento en la escala animal enfocándose principalmente en peces teleósteos y mamíferos, como organismos modelos en busca de elucidar sus diferencias, homologías y respuestas.

## Palabras clave

*Inmunidad innata, sistema del complemento, vía clásica, vía de lectinas, vía alternativa, vertebrados.*

## Resumo

Dentro da resposta imune humoral encontram-se componentes que mantêm a homeostase do organismo através do controle de patógenos, por opsonização, quimiotaxia de células fagocíticas que facilita o processo de eliminação de corpos estranhos, ou na sua ausência, a formação de poros na membrana celular. Este conjunto de componentes moleculares de origem protéica são chamados de sistema complemento, que tem três vias de ativação (clássica, alternativa e lectinas), funciona como anafilatoxinas, reguladores e receptores. Esta revisão tem como objetivo discutir os vários componentes do sistema complemento na escala animal focando principalmente em peixes teleósteos e mamíferos como organismos modelos na busca de elucidar suas diferenças, homologias e respostas.

## Palavras chave

*Imunidade inata, sistema complemento, via clássica, via da lectinas, via alternativa, vertebrados.*

## Introducción

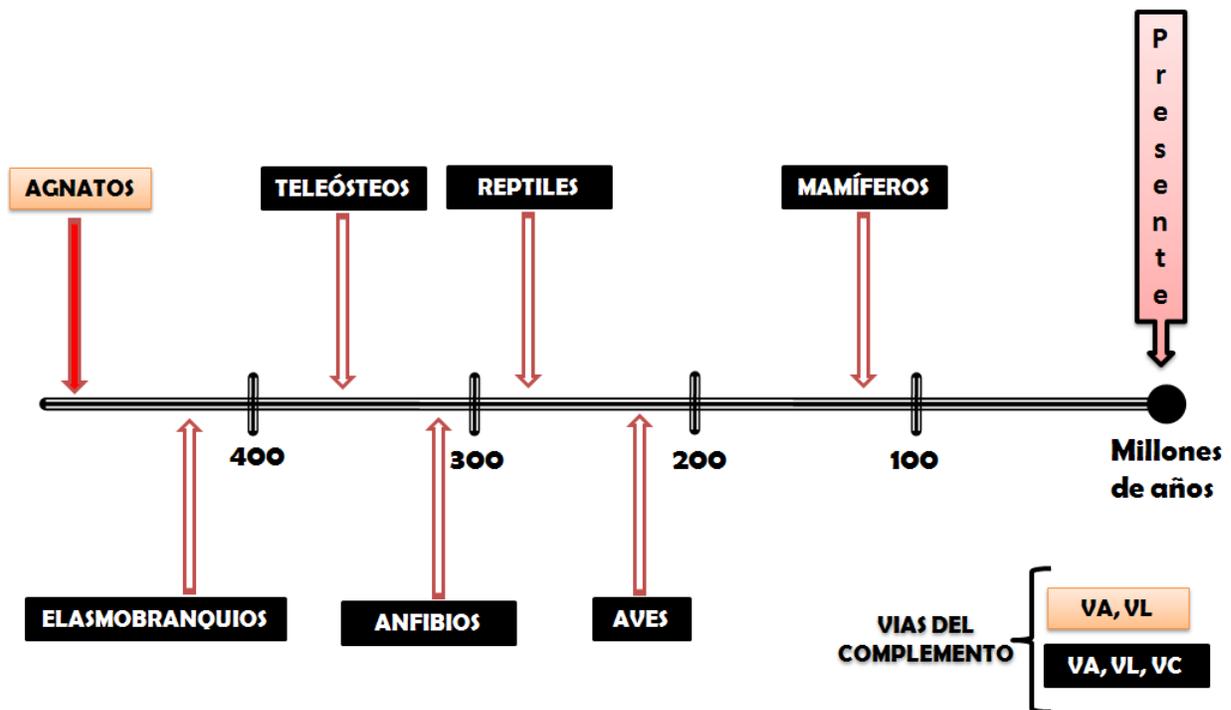
El complemento fue descrito por Jules Bordet en París en el siglo XIX como una proteína termo-lábil en antisuero de oveja que complementa la respuesta mediada por anticuerpos a temperatura estable en la muerte de *Vibrio cholerae*<sup>32</sup>. Posteriormente, Paul Ehrlich en Berlín en un experimento similar le acuña el término de complemento, definido como “la actividad del suero de la sangre que complementa la acción de los anticuerpos”<sup>54</sup>.

El origen de los primeros componentes del complemento se calcula en un rango aproximado de 600-700 millones de años<sup>104</sup>, que se convalida con la inmunofilia y evolución de los componentes que han sido encontrados en diversas especies que derivan de los protostomos y deuterostomos, pero con mayor desarrollo de las vías de activación en los últimos. Primordialmente, se conoce un mayor desarrollo de la actividad del complemento desde los peces hasta los mamíferos<sup>74, 76</sup> (Figura 1),

donde los teleósteos es el grupo que resalta por su diversidad. Los componentes del complemento de mamíferos son inactivados con calor a 56 °C, mientras que en peces la destrucción completa de los mismos se presenta a 45 °C<sup>93</sup>, siendo más termolábiles en estos últimos.

El sistema del complemento lo componen más de 35 moléculas circulantes en el plasma sanguíneo, distribuidas en las membranas celulares, que regulan la respuesta inmune innata y la adaptativa<sup>49, 92, 95</sup>.

La activación del complemento se presenta a través de tres vías: la clásica (dependiente de inmunocomplejos), la alternativa (independientes de anticuerpos) y las lectinas<sup>24</sup>; las cuales tienen como objetivo formar el Complejo de Ataque de Membrana (CAM) para la lisis de la célula diana a través de la formación de múltiples poros en la membrana, ocasionando la pérdida fatal del balance electrolítico celular<sup>82</sup>, además de mediar respuesta de opsonización así como quimiotaxis y vasodilatación<sup>107</sup>.



**Figura 1.** Relación en escala de tiempo de las clases de deuterostomos vertebrados con sus correspondientes vías de activación del complemento.

VA: Vía alternativa; VL: Vía de las lectinas; VC: Vía clásica.

Sin embargo, los componentes del complemento presentan diferentes funciones que se caracterizan por inducción de lisis celular y subcelular (bacterias, virus, etc.), la opsonización de agentes no propios del huésped que promueven la fagocitosis, la quimioatracción celular, la respuesta inflamatoria y la limpieza de inmunocomplejos<sup>107</sup>.

Además, se ha encontrado que proteínas del complemento contribuyen a diversas funciones biológicas, como

la hematopoyesis temprana en el tejido óseo y vascularización<sup>5</sup>, regeneración de tejidos y órganos, normal reproducción, desarrollo del sistema nervioso central<sup>8</sup>, apoptosis y sobrevivencia de neuronas e inmunocitos<sup>44, 61, 62</sup>. Aun, en la preñez y preclamsia en humanos<sup>20</sup>, incluyendo su papel en patologías neuronales, hipersensibilidad tipo III, procesos autoinmunes<sup>21, 54</sup>, respuestas inflamatorias crónicas y susceptibilidad a infecciones por variación genética<sup>90</sup>.

## Componentes del complemento

El sistema del complemento está compuesto por proteínas y glicoproteínas que son sintetizadas principalmente por el hígado, aunque en mamíferos también son producidas por las células epiteliales del tracto gastrointestinal y genitourinario, monocitos, macrófagos y neutrófilos en mamíferos<sup>45</sup>, sin embargo, en peces se incluye células epiteliales del esófago, músculo esquelético, células musculares del corazón, condrocitos, lamelas branquiales<sup>59, 60</sup>, en el huevo por transferencia embrionaria<sup>26, 106</sup>, durante el desarrollo en neuronas de la espina cordal, capas formadoras de plexo, células foto receptoras y ganglio en la retina del ojo, trabécula y cordón espinal<sup>51</sup>; y en anfibios involucrados en la reproducción del *Bufo arenarum*<sup>58</sup> y la regeneración del miembro y cristalino del ojo en el *triton*<sup>44</sup>.

Los componentes del complemento son designados por número (C1-C9), por letras (e.g. factor D) o nombre trivial (e.g. factor de restricción homólogo). La activación de los componentes forman fragmentos peptídicos que son denotados por letras minúsculas en el que la fracción más grande “b” y el “a” la pequeña (e.g. C4b y C4a) con excepción de C2 que se comporta a la inversa<sup>45</sup>.

En la sangre la circulación de los componentes se presenta en forma inactiva como proenzima, *i.e.* zimógeno, hasta el clivaje proteolítico, que remueve el fragmento inhibitorio y expone el sitio activo. Aunque, el clivaje de C3 se da también por hidrólisis espontánea<sup>32</sup>. Estas subunidades interactúan con otras formando complejos funcionales que tiene la propiedad enzimática la cual se designa usualmente con una barra encima o debajo como la C3 convertasa de la vía alternativa C3bBb.

## Activación del complemento

La activación del complemento se puede presentar por tres vías, la primera que se describió en peces mandibulados fue la vía clásica (VC), y las más antiguas, la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa

(VA) por lo que se propone que la VL es más primitiva que la alternativa ya que en invertebrados no se ha encontrado el factor D (FD) indispensable para la formación de la convertasa de C3 de la vía alternativa<sup>24</sup> y si componentes que probablemente corroboren la VL como el C1q<sup>22</sup>. La finalidad de estas vías es formar la C3 convertasa VC/VA para aumentar el C3b, unirlo a la convertasa y así obtener la C5 convertasa que tiene la capacidad de clivar C5 en C5b que se estabilizará con otros componentes (C6-C9) formando el CAM<sup>70</sup> (Figura 2).

### La vía clásica (VC)

La vía clásica del complemento emerge en la aparición de la inmunidad adaptiva lo cual remonta a la división de peces carentes de mandíbula (Ciclostomos) a mandibulados (Teleósteos y Elasmobranquios), su nombre se debe por ser la primer vía descubierta; ya que las otras dos fueron conocidas después de múltiples ensayos en vertebrados, por lo que son consideradas más antiguas.

La activación de la VC empieza cuando los anticuerpos de Inmunoglobulina M (IgM) o IgG (en humanos existen subclases IgG1, IgG2 y IgG3) que se unen a un antígeno (inmunocomplejo), por lo que la molécula adquiere nuevas propiedades en su fracción cristalizable (Fc) que se dispone para la unión de C1q<sup>46</sup>. Otros isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgD e IgE) no pueden activar el complemento a través de esta vía<sup>7</sup>.

El C1 es un complejo pentamolecular dependiente de calcio conformado por una molécula de C1q, dos de C1r y dos de C1s, que pertenece a una de las familias de las colectinas, unida por 3 subunidades que presenta forma de “Y” y en cada rama una cabeza globular de unión al inmunocomplejo y un tallo de tipo colágeno de unión a los componentes del complemento. La unión de C1q al inmunocomplejo se hace en CH2 en IgG y en el CH3 de la estructura polimérica de la IgM (específica para peces), esta inmunoglobulina facilita el acceso hacia dos sitios de activación cuando está en forma de “grapa”, siendo más potente, ya que lo opuesto sucede con la primera pues necesita de dos

muy cercanas para activar la cascada del complemento, requiriendo de cientos para estimular la respuesta <sup>48, 107</sup>. C1r/C1s son subcomponentes del C1 que activan la vía clásica del complemento en su unión al C1q, además, Bork <sup>13</sup>, propone que son proteínas que regulan el desarrollo de *Xenopus laevis* debido a su mosaico estructural que incluye un factor de crecimiento epidérmico (EGF) homólogo a las región del factor de crecimiento epidermal de erizo de mar (uEGF) de la superfamilias de los EGF.

Al inmunocomplejo-C1q se adhiere el C1r que convierte a la otra subunidad de C1r en una proteasa de serina, que a su vez cliva C1s y está a su homólogo, C1s, generando una enzima similar que la anterior que tiene como sustratos al C4 y C2 <sup>25, 111</sup>. El C4 es una glicoproteína que contiene 3 cadenas polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  pertenecientes a las proteínas de enlace tioester (TEP). En humanos y en peces se ha encontrado dos isoformas C4-A y C4-B <sup>9, 39</sup>.

El C1s hidroliza el fragmento (C4a con propiedades anafilotóxicas) amino terminal de la cadena  $\alpha$  exponiendo el sitio de unión del C4b que en milisegundos genera un ataque nucleófilo formando enlaces covalentes con el grupo amino o hidroxilo pertenecientes a las superficies celulares vecinas o en su mayoría siendo inactivado iC4b. El cimógeno C2 se une no covalente a C4b establecido en una superficie <sup>84</sup> siendo sustrato de C1s (no lo puede clivar si no está unido al C4b), que es escindido liberando C2b y el C2a quedándose unido al C4 conformando la C3 convertasa de la VC (C4b2a), que resulta ser una potente proteasa del C3, permitiendo formar la C5 convertasa de la VC (C4b2a3b).

En peces teleósteos se presenta el FB y el C2 homólogos debido a la similitud de las secuencia de proteínas en estructura de mosaico que consiste en Secuencias Repetidas Cortas (SRC), el factor von Willebrand y los dominios de proteasa de serina que las caracterizan <sup>96</sup> donde probablemente constituyen una sola proteasa como en la carpa (*Cyprinus carpio*) con varias isoformas BF/C2 (BF/C2-A1, BF/C2-A2 y BF/C2-A3) <sup>39</sup>, donde su función esté relacionada en la VA y VC, en

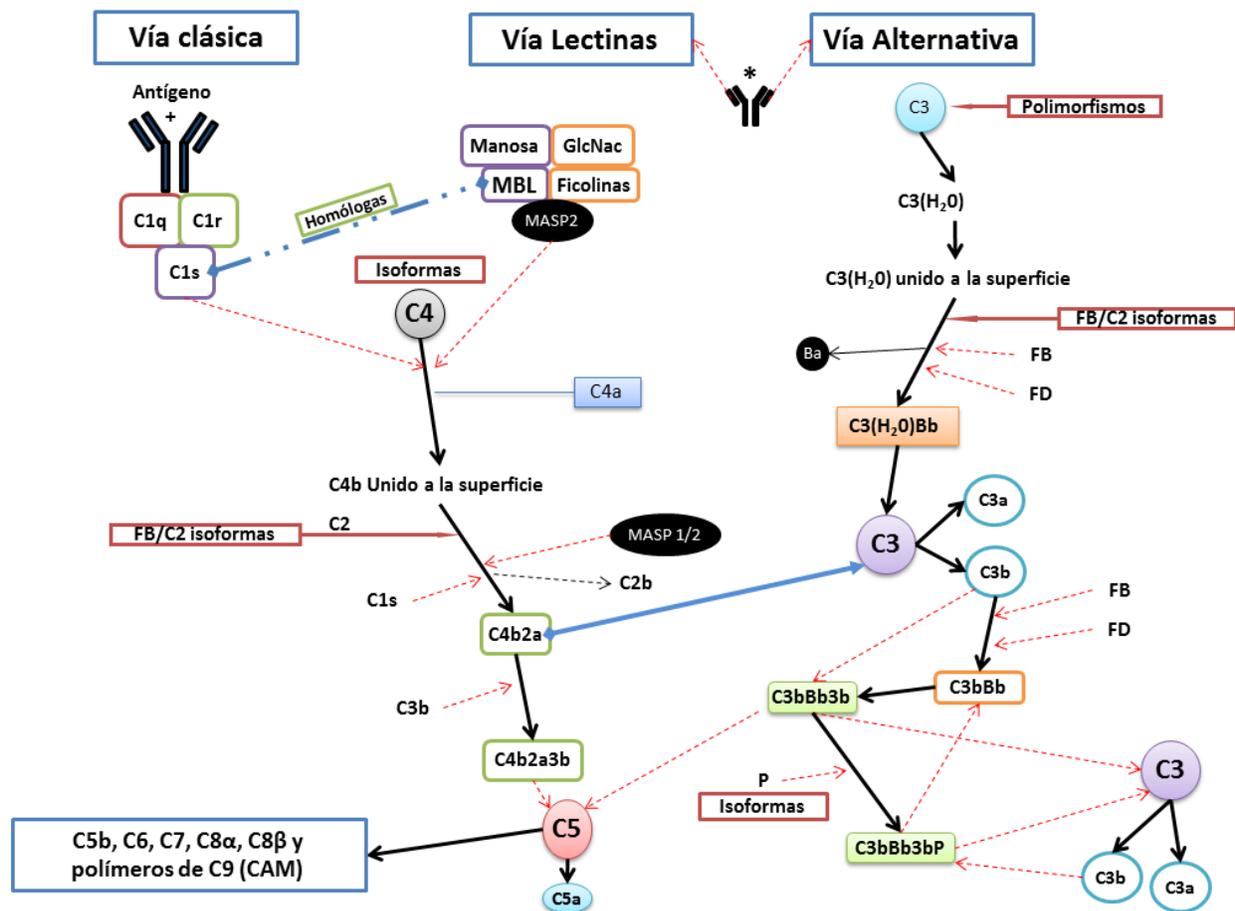
primera estancia con los componentes polimórficos de C3b, y en segunda con C4. Igualmente, se supone que en elasmobranquios, tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) las isoformas del FB/C2-1 y 2 <sup>99</sup> cumplan la misma función.

Los miembros de la familia de las pentraxinas como lo son proteína C-reactiva (CRP) y el amiloide P-sérico (SAP) que han sido identificadas similares en mamíferos y en peces teleósteos, donde estas proteínas de fase aguda (APP) tienen la capacidad de interactuar con C1q y activar la VC o funcionar como opsoninas mejorando la fagocitosis <sup>113</sup>.

#### *La vía de las lectinas*

Esta vía hace parte de la inmunidad innata por lo que su activación u opsonización de parte de sus componentes se realiza a través de lectinas que funcionan como receptores de reconocimiento de patrón (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a lo patógenos (PAMPs) específicamente de carbohidratos asociados a glicoproteínas y glicolípidos (e.g. N-acetilglucosamina) donde en vertebrados se encuentran las lectinas de tipo-C (dependientes de calcio) que tienen la capacidad de discriminar entre lo propio y no-propio <sup>110</sup>. No obstante, se ha reportado la activación de la VA y VL por IgA e IgM en humanos no en peces <sup>19</sup>. Dicha activación se presenta por los diferentes patrones de glicosilación de las inmunoglobulinas, (e.g. Formas agalactosiladas de IgG en las cuales su fracción cristizable terminan en dos residuos de N-acetilglucosamina, IgA polimérica y ciertas glicofomas de la IgM la cuales tienen una alta incidencia de terminales glicanos de N-acetil glucosamina) <sup>7</sup>.

Cuando los macrófagos en mamíferos y los monocitos/macrófagos en peces ingieren componentes bacterianos u otros extraños, producen citocinas proinflamatorias como la interlequina-1 (IL-1), Interlequina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que estimulan la producción de proteínas de fase aguda (APP) en los hepatocitos, liberando componentes del complemento, proteína reactiva-C (CRP) y lectinas de unión a manosa (MBL) <sup>105</sup>.



**Figura 2.** Esquema de las vías de activación del complemento.\*Se ha descrito que las inmunoglobulinas A y M pueden activar la VA y VL del complemento<sup>7</sup>

En mamíferos, se han identificado dos isoformas de MBL (MBL-A y MBL-C) en conejo, mono, cerdo, ratas y ratón, excepto en bovinos y humanos, y en aves ha sido identificada y descrita MBL-A<sup>53</sup>. La MBL en humanos existe como un oligómero de 3 cadenas de polipéptidos donde cada una contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y un dominio similar a colágeno que se une a *N*-acetilglucosamina (GlcNac) y a manosa, igualmente, sucede en las ficolinas (humanos ficolina p/34 y antígeno Hakata) que pertenecen a la misma familia, aunque presentan un dominio similar a fibrinógeno y un dominio similar a colágeno<sup>63</sup>. Ambas interactúan con las proteasas de serina asociadas MBL (MASP: MASP-1, MASP-2 y MASP-3) y a una troncada forma de MASP-2 (sMAP o MAP19) para formar complejos enzimáticos<sup>34</sup>, capaces de clivar a C4 y C2 y formar la C3/C5 convertasa VC. En contraste la VL puede generar en cuatro tiempos más la C3/C5 convertasa que la VC<sup>85</sup>.

En lamprea, un pez agnato, el C1q es un oligómero que tiene un 35 % de similitud con el de mamíferos, que a diferencia de los vertebrados mandibulados posiblemente funcione como molécula de reconocimiento en la vía de las lectinas debido a su unión GlcNac y forme complejos con las MASPs (MASP-1, MASP-A y MASP-B) igual que en la MBL con la capacidad de clivar C3/C4 generando C3/C4b en esta especie, por eso, la VC es considerada a ser una rama de la VL en que la especificidad de C1q para carbohidrato ha sido reclutado para el reconocimiento de la Fc de las Igs<sup>22, 28</sup>.

#### Vía alternativa

Esta vía independiente de anticuerpos y parte de la inmunidad innata humoral tiene como componente central el C3, que hace parte de la familia de proteínas α<sub>2</sub>-macroglobulina (α<sub>2</sub>-M) que incluye el C4 y C5. Naturalmente, sucede una activación espontánea

(hidrólisis) del componente central de complemento, C3(C3b(H<sub>2</sub>O)), que se une a la superficie de agentes patógenos, siendo capaz de interactuar no covalentemente con el FB y luego con el FD, formando la convertasa de C3 de la VA(C3(H<sub>2</sub>O)Bb) que cliva a C3<sup>14</sup>, en C3a (ver en anafilatoxinas) y el C3b que forman enlaces covalentes con grupos hidroxilos y aminos en las estructuras más cercanas<sup>32</sup>.

Las membranas fosfolipídicas con altos niveles de ácido siálico contribuyen a la rápida inactivación de este fragmento, en su defecto se une el factor B (C3bB)<sup>37</sup> que sirve de sustrato para el clivaje dependiente de Mg<sup>2+</sup> de la proteína enzimática (proteasa de serina), factor D (FD)<sup>38</sup>, liberando un fragmento pequeño (Ba) y generando la C3 convertasa de la VA (C3bBD) análoga a la VC que cliva a C3 (Circuito de amplificación); y tiene una vida media de 5 minutos, aunque cuando se une la properdina (C3bBDP) la extiende a media hora que al ligarse otro C3b forman la C5 convertasa (C3bBbPC3b) en mamíferos<sup>45</sup>.

En aves, se ha determinado la actividad de C3 y el factor B (FB) en activación de la VA y VC<sup>79, 80</sup>. En reptiles, se presenta una relación del C3 con el Factor de veneno (FV) donde se propone que el FV proviene de una duplicación del C3 que generó C3-1, C3-2 y AVF-1, AVF-2; reportada en la serpiente cabeza de cobre australiana (*Austruleaps superbus*) y en la cobra C3 y CVF-1<sup>86, 87</sup>. Existen 3 genes C3 demostrados en la cobra. El primero codifica una proteína C3 funcional en el suero y los dos restantes son expresados en la glándula de veneno y codifican moléculas que forman una convertasa de C3 estable en presencia del factor B<sup>107</sup>. Sin embargo, al igual que en lagartos, tortugas y cocodrilos se presenta activación de la VA en suero<sup>66</sup>. Además, trabajos realizados en anuros *Bufo arenarum* y *Xenopus laevis* determinan la presencia de C3 con capacidad de activación de la VA<sup>57</sup>, así como la activación de proteínas del complemento en el suero de Anfiuma de tres dedos (*Amphiuma tridactylum*)<sup>65</sup>.

En peces, con respecto a los ciclostomos, la lamprea (*Lampetra japonica*) presenta el C3 similar a C4 por la

estructura de tres cadenas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y un factor B/C2, y en pez bruja (*Eptatratrus souti*) el C3 presenta solamente dos cadenas. A diferencia de los elasmobranquios, y aún más en teleósteos, se presenta diversidad de varios de los componentes del complemento que permite expandir la capacidad de reconocimiento de la respuesta inmune innata debido a sus múltiples isoformas que varían en estructura y función<sup>81, 104</sup>. Por eso, en el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) se caracterizan dos isoformas de C3 (GcC3-1 y GcC3-2)<sup>36</sup> y dos de FB/C2-1 y 2 que probablemente interactúe con C4b de la VC y C3b de la VA<sup>99</sup>.

El C3 ha sido identificado y caracterizado en un amplia gama de teleósteos, bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)<sup>23</sup>, pez lobo manchado (*Anarhichas minor Olafsen*)<sup>1</sup>, halibut del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus L*)<sup>50</sup>, salmón de atlántico (*Salmo salar*)<sup>60</sup>, cabeza dorada de mar (*Sparus auratus*), trucha de mar (*Dicentrarchus labrax*)<sup>64</sup> donde se encuentra conservada la unión  $\alpha$ - $\beta$  característica para realizar el clivaje y generar un C3b que posee los sitios de unión similares que en mamíferos. Sin embargo, se ha encontrado moléculas polimórficas en carpa (*Cyprinus carpio*) de C3 (C3-H1, C3-H2, C3-S, C3-Q1 y C3-Q2) C5 (C5-I y C5-II) y el BF/C2 (BF/C2-A1, BF/C2-A2 y BF/C2-A3)<sup>39</sup>, en trucha arcoíris el C3 (C3-1, C3-2, C3-3 y C3-4) y el FB (FB-1 y FB-2) similar al C2 entre otras especies<sup>104, 113</sup>. Por lo que se ha postulado: 1) que el FB/C2 tiene la capacidad de interactuar en la VA con C3b y en la VC con C4b en la formación de las convertasa y 2) las múltiples isoformas de C3 que se unen a diferentes componentes tienden a expandir el reconocimiento de la respuesta inmune innata, incluyendo altos títulos y el sostenimiento de la actividad a rangos de temperatura más amplios (15 y 25 °C y se puede mantener activa de 0-4 oC)<sup>113</sup>; ya que en este grupo de vertebrados la respuesta inmune adaptativa no es tan eficiente como en mamíferos<sup>27</sup>.

Los peces agnatos presentan proteínas del complemento que poseen acción como opsoninas<sup>47</sup> y ha sido posible el aislamiento de una proteína relacionada con la C3<sup>73</sup> la cual muestra una homología alta con la proteína C5 de los mamíferos lo cual implica que pudiese cumplir una función anafiláctica en este grupo animal<sup>47</sup>.

Probablemente, al dímero de C3b (1-5)-FB/C2 se une el FD encontrado en trucha y carpa <sup>35</sup> formando la C3 convertasa VA, a la cual se le une una de las isoformas del factor P o properdina (P1, P2 y P3 halladas en trucha) para estabilizar la convertasa y prolongarle su tiempo de vida; lo más probable es que la diversidad de properdina se encuentren para la interacción de diferentes convertasas de C3 <sup>18</sup>.

### Vía lítica

La citotoxicidad humoral es causada por componentes del complemento que conducen a la formación del CAM, un compuesto macromolecular de proteínas no enzimáticas que incluye C5b, C6, C7, C8 y C9 <sup>75</sup> producidos por los procesos finales de la VC, VA y VL, de la C5 convertasa. Sin embargo, se ha concluido que la activación del CAM es más rápida por la VC que por la vía alternativa en exposición a bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*) en humanos y peces <sup>41</sup>.

El ensamblaje del MAC empieza con el clivaje proteolítico de C5 que contiene solamente dos cadenas de proteínas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) a través de la C5 convertasa de la VC o la VA generando C5a (ver más adelante en anafilatoxinas) y C5b. Una vez formado el producto de C5b que es lábil (menos de 2 minutos tiempo de vida media) se une a la célula diana e interactúa con C6 que lo estabiliza a través de una unión en un dímero C5b6, con la subsecuente unión de C7 produce C5b-7, un complejo trimérico que expresa un sitio de unión de alta afinidad lipídica lo que le permite ser anfifílico y atravesar las membranas fosfolipídicas <sup>97, 101</sup>.

Este complejo asociado con la membrana diana donde su subsecuente se integra la triada de subunidades que componen a C8 ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) o sea, C5b-8 tetramérico sobre la superficie, causando fuga de pequeñas vesículas lipídicas, causando la ligera lisis de eritrocitos, pero no de células nucleadas <sup>15</sup>. Este compuesto facilita la unión y polimerización de 12- 18 moléculas de C9 (familia de las perforinas) a formar una estructura circular. Las moléculas pequeñas y los iones pueden difundirse libremente a través de los “poros” de la célula que no permiten mantener la estabilidad osmótica, flujo

de agua e iones, generando la muerte <sup>95</sup>. En trabajo de Mikrou & Zarkadis <sup>68</sup>, en *Gallus gallus* se caracterizó C6 determinando que la estructura espacial permite la unión de los demás componentes para la formación del CAM. El C9 en equinos es un potente bactericida de Gram negativas con actividad citotóxica y homóloga al de humanos <sup>29</sup>.

En gnatostomos se especula la activación del CAM en el caso del pez bruja <sup>88</sup>, aunque la actividad lítica ha sido descrita en suero de lampreas <sup>113</sup>. En cartilagosos se han caracterizado varios componentes como el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) que puede ser clivado a formar el fragmento C5b <sup>36</sup>, el C6 en tiburón (*Mustelus manazo*) y C8 $\beta$  en quimera (*Chimaera phantasma*) <sup>43</sup>, C8 (GcC8  $\alpha$ ) <sup>6</sup> con excepción del C7 y el polímero de C9, pero los diferentes ensayos de actividad hemolítica del complemento han sido positivos.

Los teleósteos presentan las tres vías de activación. En carpa herbívora, pez cebrá y trucha arco iris se ha caracterizado el C6 con homología de unión a C7 <sup>64</sup>. El C8 está compuesto de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y el C9 de singulares polipéptidos en carpa homólogo a mamíferos <sup>30</sup>. El componente homólogo a la proteína C9 del complemento mamífero ha sido descrito en peces, en los cuales este posee un dominio de trombospondina en el extremo C-terminal, confiriendo una arquitectura similar a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína C8 <sup>47</sup>. El C9 (gsC9) es identificado en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) siendo un ortólogo en mamíferos <sup>55</sup>. En esta especie las transcripciones son detectadas en todos los órganos examinados incluyendo hepatopáncreas, bazo, piel, riñón craneal, riñón caudal, cerebro, músculo, branquias, sangre, corazón e intestino <sup>55</sup>.

## Regulación del sistema del complemento

La fuerza del sistema del complemento para controlar patógenos, principalmente agentes infecciosos, necesita ser regulado para prevenir la destrucción de tejidos o células propias del hospedador <sup>102</sup>, por lo que ha desarrollado componentes controladores solubles y unidos a la membrana. El inhibidor de C1 (C1-INH)

soluble se ha sido identificado como inhibidor de C1r y C1s, MASP-2 y en pequeña proporción a C3b, que regula componentes de las tres vías de activación del complemento, aunque se considera como principal inhibidor de la MASP-2 <sup>72</sup>.

La proteína de unión a C4b (C4BP) soluble que posee varias isoformas de siete cadenas- $\alpha$  de unión a C4b, heparina, SAP, CD40 y CD154, mientras la cadena- $\beta$  lo hace a la vitamina K-dependiente de la proteína S anticoagulante <sup>109</sup>; el complejo C4b-C4bP interactúa con el FI clivando al C4b (C4c y C4d) inhibiendo la activación de la vía clásica y de la lectinas.

Las proteínas de membrana reguladoras del complemento que son el factor de aceleración del decaimiento (DAF, CD55), la proteína cofactor de membrana (MCP, CD46), el receptor del complemento tipo-1 (CR1, CD35), el gen relacionado-1 con el receptor del complemento/ proteína Y (Crry) que pertenecen a la familia de genes reguladores de la actividad del complemento (RCA) y que contienen un dominio repetido de consenso corto (SCR), y CD59 <sup>42</sup>.

La MCP actúa como cofactor de la proteasa de serina del FI que media el clivaje de C3b y C4b, evitando la formación de la C3/C5 convertasa <sup>67</sup>. El CR1 es uno de los miembros más versátiles de las proteínas reguladoras del complemento pues se une a C3b y C4b <sup>112</sup> y posee actividad de decaimiento de la C3 convertasa de la VC y la VA y actividad de cofactor con el FI para la degradación de C3b y C4b <sup>67</sup>. El CrrY es una proteína transmembrana expresado en eritrocitos de ratón donde es un potente acelerador del decaimiento de C3 convertasa de la VC. El DAF es una proteína de membrana anclada-GPI que acelera el decaimiento de las preformadas C3 y C5 convertasa de la VC y la VA inhibiendo la activación de C3 y C5 <sup>42</sup>.

El CD59 es una glucoproteína anclada-GPI no tiene dominios SCR que controla la citólisis del hospedador por homólogos del complemento a través de su unión a C8 y C9 en mamíferos <sup>49</sup>. En trabajos realizados por Remedios *et al.* <sup>88</sup> en pez bruja (*Eptattretus stouti*) se halló un homólogo del CD59 donde posiblemente cumpla las mismas funciones.

El FI es un multidominio de proteasa de serina que cliva a C3b a iC3 y C3f en presencia de alguno de los siguientes cofactores, el factor H (FH), la MCP y CR1; y C4b a C4c y C4d en presencia de C4BP o CR1 o MCP <sup>108</sup>. En peces teleosteos, *e.g.* la carpa (*Cyprinus carpio*), se han caracterizado isoformas del FI (FI-A y FI-B) <sup>35</sup> presente en todos los tejidos <sup>2</sup>, igualmente, en cartilagosos, *e.g.* tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) cuatro isotipos del FI (FI-1, FI-2, FI-3 y FI-4) presenten la misma actividad <sup>98</sup>, aunque posiblemente regulando una mayor diversidad de fragmentos de C3b y C4b.

El FH posee tres sitios de unión para C3b, C3c y C3d y C4b y una mitad terminal de unión a heparina, ácido siálico o sobre receptores de patógenos <sup>49</sup> por lo que es una proteína codificada por genes RCA que regula al sistema del complemento plasmático y protege a las células tejidos del daño por la activación <sup>89</sup>, además, actúa específicamente como cofactor del FI para la inactivación proteolítica de C3b y C4b <sup>3</sup>.

Por último, la vitronectina inhibe la unión del complejo C5b-7 a la membrana, evitando indirectamente la unión de C8 y la formación del poro por la polimerización de C9 regulando el CAM, permitiendo no dañar los tejidos del hospedero.

## Receptores del complemento

Los receptores del complemento CR1 (CD 35), CR2 (CD21), CR3 (CD 11b/18) y CR4 (CD 11c/18) han sido principalmente caracterizados en mamíferos, aunque varios de ellos son encontrados también en peces.

El CR1 se une a fragmentos de C3b, iC3b y C4b y son expresados en células B, células dendríticas foliculares (FDC), eritrocitos, polimorfonucleares y macrófagos en humanos <sup>67</sup>. El C3 del pez lobo manchado (*Anarhichas minor Olafsen*) en análisis realizado presenta sitios de unión a CR1 <sup>1</sup>.

El CR2 se une a ligandos de iC3b y C3dg expresado principalmente en FDCs y células B, donde es requerida para el eficiente encerramiento de los IC debido a que se

une de manera covalente a los antígenos coestimulando la respuesta en son de evitar la anergia clonal, respectivamente<sup>17</sup>. En este caso los componentes del complemento son indispensables para generar respuesta inmune adaptativa. En carpas (*Cyprinus carpio*) ha sido reportada que el clivaje de isoformas de C3 presenta iC3b y C3d (molécula adyuvante) derivados del C3-H con mayor afinidad y C3-S menor con capacidad de unión al CR2, este receptor no requiere Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> comparado con los mamíferos<sup>69</sup>.

El CR3 es una integrina que se une al C3b e iC3b se asocia con CD59 y mejoran en leucocitos polimorfonucleares (PMNs) la unión a las ICAM (moléculas de adhesión intercelular) de células endoteliales y la co-captura<sup>49</sup>. También está presente en FDCs y células NK (asesinas naturales). Al igual CR4 pertenece a la familia de las integrinas y es expresado en neutrófilos, monocitos y macrófagos<sup>91</sup>.

## Funciones del complemento

### Opsonofagocitosis

Generalmente los receptores del complemento promueven la unión y el engullimiento de patógenos cubiertos con opsoninas del complemento en células fagocíticas<sup>12</sup>. La activación de C3 en leche de humanos y bovinos genera los fragmentos C3b, iC3b y C3dg son opsoninas que aceleran el proceso de eliminación de bacterias<sup>83</sup>, e.g. *Escherichia coli*<sup>77</sup> entre otro tipo de patógenos. El C1q se une a componentes bacterianos, opsonizando y aumentando los procesos de fagocitosis y explosión respiratoria<sup>46</sup>. El C5a incrementa la permeabilidad vascular, quimiotaxis de células inflamatorias, la fagocitosis, la explosión respiratoria, la liberación de citocinas y quimiocinas<sup>61</sup>. En lampreas (*Lampetra japonica*) y pez bruja (*Eptatretus stouti*) el C3 actúa como opsonina mejorando la fagocitosis<sup>88, 113</sup>.

### Quimiotaxis

El C1q es un potente quimioatractivo reclutando células polimorfonucleares y eosinófilos a sitios de infección e inflamación<sup>46</sup>. El C3a y C5a es un componente quimotáctico de monocitos, eosinófilos y mastocitos

generando la liberación de componentes proinflamatorios<sup>61</sup>. Sin embargo, en peces, solamente el C5a ha sido caracterizado como quimotáctico<sup>103</sup>.

### Inflamación

Los componentes del complemento median las respuestas infecciosas y de injuria en tejidos, por lo que juegan un papel en la respuesta inflamatoria inicial<sup>40</sup>. Además, se relaciona con diferentes tipos de enfermedades en humanos<sup>4</sup>.

### Limpieza de los complejos antígeno-anticuerpo, restos celulares y depuración de anafilatoxinas

Diferentes componentes del sistema del complemento tienden a eliminar los IC inespecíficamente<sup>52</sup>, como en el caso de C1q es capaz de unirse, solubilizar y limpiar los IC<sup>46</sup>, al igual que C3b y C4b a fragmentos de FC, y a la inversa, neutralizando anafilatoxinas, C3a y C5a, a través del dominio constante de unión a antígeno (Fab) con baja afinidad depurando y regulando fragmentos que pueden causar inmunorreacciones perjudiciales<sup>7</sup>.

Con el fin de evitar procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes que pueden resultar de células necróticas o en las apoptóticas donde el C1q está involucrado en la unión directa o indirecta a través de CRP, SAP, PTX3 (pentraxina-3)<sup>46, 71, 100</sup>, IgM y MBL opsonizan los componentes nucleares (detritos) que permiten hacer una fagocitosis “silenciosa”, caracterizada por la liberación de citocinas antiinflamatorias<sup>31</sup>.

En eritrocitos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) presentan CR1 con encerramiento del complejo C3b-IC que es transportado en la circulación y limpiado en el sistema retículo endotelial de los elipsoides esplénicos, estas mismas funciones son encontradas en humanos<sup>94</sup>.

## Anafilatoxinas

Las anafilatoxinas (C3a, C4a y C5a) son pequeñas moléculas (9 kDa) generadas a partir de la actividad C3, C4 y C5, respectivamente, en mamíferos y peces, pero con mayor diversidad de los componentes en los últimos<sup>103</sup>. En mamíferos median la quimiotaxis de

mastocitos y eosinófilos y liberación de histamina y gránulos enzimáticos, respectivamente, incluyendo en el endotelio el incremento de la permeabilidad vascular, la expresión de moléculas de adhesión y la contracción del músculo liso vascular (indirectamente) y en los cardiocitos reducción de la contractibilidad, entre otras funciones <sup>61</sup>.

Según trabajos de Manthey *et al.* <sup>61</sup>, el componente C5a del complemento la anafilatoxina más potente, producto del clivaje de C5 (C5 convertasa VC/VA o trombina) sintetizado principalmente por hepatocitos o células fagocíticas, es un mediador proinflamatorio, que es metabolizado por carboxipeptidasas para formar una subunidad menos potente, C5adesArg, que se puede unir al igual que C5a a un receptor acoplado a una proteína G (CD 88) o no, C5L2 (GPR77), pero con más potencia a esta última. Por lo que se ha considerado que las anafilatoxinas ejercen su función al unirse a receptores de C3a y C5a (C3aR y C5aR) que pertenecen a la familia de las rodopsinas <sup>103</sup>.

En peces, la liberación de anafilatoxinas en la carpa (*Cyprinus carpio L.*) como el C3aH-1, C4a-2, y C5a con mayor afinidad, y los receptores de anafilatoxinas (C3a-H-1-desR, C4a-2-desR, C5a-I-des y C5a-II-desR) en células granulares y monocitos, con capacidad de generar quimiotaxis homologa al de los mamíferos <sup>36</sup> el C5a es más susceptible a la carboxipeptidasa del suero. Al igual en leucocitos del riñón craneal de trucha arcoíris C3-1a, C3-3a y C3-4a producen fagocitosis y explosión respiratoria <sup>92</sup>, semejante a C5a, sin embargo, este si produce quimiotaxis, además en ambos fragmentos se ha identificado un similar CR3a y un CR5a <sup>103</sup>.

Los receptores de C5a son C5aR y los péptido de N-formilado (fmlFR) encontrados en oocitos de sapo *Xenopus laevis*, presentando un receptor acoplado a una proteína G (GPCR), Gα16 para la transducción de señal <sup>16</sup>.

## Utilización de complemento por parte de patógenos

La activación del complemento específico de patógenos requiere directo reconocimiento del patógeno o la

ausencia de mecanismos de control del complemento sobre su superficie <sup>78</sup>.

La actividad regulatoria del complemento de C4BP no solo beneficia al hospedador, sino es explotada por patógenos, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* K1 y *Moraxella catarrhalis* a través de su unión por medio de porinas (Por 1A y Por 2B), proteína M, ompA (proteína de membrana externa) y la Usp 1 y 2 (proteínas de superficie ubicuas), respectivamente <sup>11</sup>. Algunas de estas bacterias, incluyen componente siálicos para la unión del FH o ligandos (FHL) siendo más eficiente su proceso de evasión <sup>10</sup>. La proteína PfEMP1 del *Plasmodium falciparum*, expresada en eritrocitos, juega un papel en la patogénesis de la malaria por la unión CR1 sobre células no infectadas y promover la formación en roseta; y en el caso de la expresión de CR2 en células B y epiteliales que se une al virus de Epstein-barr <sup>56</sup>.

## Conclusiones

Las tres vías de activación del complemento se presentan tanto en vertebrados como en peces teleósteos y cartilagosos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, con una excepción en peces gnatostomos donde solamente se ha encontrado la vía alternativa y de las lectinas. Con respecto a los peces teleósteos a diferencias de las otras especies se ha encontrado isoformas de los componentes centrales de la respuesta del sistema del complemento, C3, C4, C5 y FB/C2, donde el C3 es altamente polimórfico teniendo la capacidad de ampliar y diversificar la respuesta a diferentes tipos de patógenos comparado con los demás. Pues en peces, la respuesta inmune innata del complemento resulta ser más eficiente que la adaptativa, comparando el gasto energético de producción, la temperatura y la cantidad de títulos de anticuerpos.

En peces mandibulados posiblemente el componente C1q se active por la vía de las lectinas al tener reconocimiento de GlcNAc, considerando que su uso en la vía clásica será en vertebrados mandibulados, después de la divergencia.

Los componentes del complemento como se conocen en la actualidad en mamíferos son el resultado de una serie de duplicaciones genéticas (Factor D/C1s/C1r, Factor B/C2, C3/C4/C5, C6/C7, C8a/C8b). Un aspecto evolutivo importante del comportamiento del complemento en peces implica que la ausencia de dichas duplicaciones permite llevar otras funciones al poseer proteínas separadas<sup>47</sup>. Esta característica abre nuevos campos de investigación en biología básica en peces así como en biomedicina de aplicación a medicina humana.

De la misma manera la presencia de formas diméricas y pentaméricas de IgM en peces así como otras inmunoglobulinas, e.g. IgNAR de los elasmobranquios particularmente, pueden representar mecanismos de activación adicionales, para las VA y VL en peces que podrían resultar en una respuesta inmune innata más eficiente, no obstante el estudio de estas posibilidades aun es incipiente.

## Referencias

1. Abelseth T, Stensva K, Espelid S, Nygaard R, Ellingsen T, *et al.* 2003. The spotted wolffish (*Anarhichas minor Olafsen*) complement component C3: isolation, characterization and tissue distribution. *Fish & Shellfish Immunol*; 15:13-27.
2. Abernathy J, Lu J, Liu H, Kucuktas H, Liu Z. 2009. Molecular characterization of complement factor I reveals constitutive expression in channel catfish. *Fish & Shellfish Immunol*; 1-6.
3. Alexander J, Quigg R. 2007. The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving. *Mol Immunol*; 44:123-132.
4. Anderson D, Radeke M, Gallo N, Chapin E, Johnson P, *et al.* 2010. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. *Progress in Retinal and Eye Res*; 29:95-112.
5. Andrades J, Nimni M, Becerra J, Eisenstein R, Davis M, *et al.* 1996. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Exp Cell Res*; 227:208-213.
6. Aybar L, Shin D-H, Smith S. 2009. Molecular characterization of the alpha subunit of complement component C8 (GcC8a) in the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Fish & Shellfish Immunol*; 27(3):397-406.
7. Basta M. 2008. Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system: Activation versus inhibition. *Mol Immunol*; 45:4073-4079.
8. Bénard M, Raoult E, Vaudry D, Leprince J, Falluel-Morel M, *et al.* 2008. Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol*; 45:3767-3774.
9. Blanchong C, Chung E, Rupert K, Yang Y, Yang Z, Zhou B, Moulds J, Yu C. 2001. Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Slp and C4. *Int Immunopharmacol*; 1:365-392.
10. Blom A, Hallström T, Riesbeck K. 2009. Complement evasion strategies of pathogens-Acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol*; 46:2808-2817.
11. Blom A, Villoutreix B, Dahlbäck B. 2004. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system?. *Mol Immunol*; 40:1333-1346.
12. Bohana-Kashtan O, Ziporen I, Donin N, Kraus S, Fishelson Z. 2004. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol*; 41:583-597.
13. Bork P. 1991. Complement components C1r/C1s, bone morphogenic protein I and *Xenopus laevis* developmentally regulated protein UVS.2 share common repeat. *Federation of Eur Biochem Soc*; 281(1):9-12.
14. Boshra H, Li J, Sunyer J. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunol*; 20:239-262.

15. Brannen C, Sodetz J. 2007. Incorporation of human complement C8 into the membrane attack complex is mediated by a binding site located within the C8 $\beta$  MACPF domain. *Mol Immunol*; 44:960-965.
16. Burg M, Rafftetseder, Grove M, Klos A, Kohl J, Bautsch WG. 1995.  $\alpha$ -16 complement the signal transduction cascade of chemotatic receptors for complement factor C5a (C5aR) and N-formilated peptides (FMLF-R) in *Xenopus laevis* oocytes: G $\alpha$ -16 couples to chemotatic receptors in *Xenopus* oocytes. *Febs Letter*; 377 (3):426-428.
17. Carroll M, Fisher M. 1997. Complement and immune response. *Curr Opin Immunol*; 9:64-69.
18. Chondrou M, Papanastasiou A, Spyroulias G, Zarkadis L. 2008. Three isoforms of complement properdin factor P in trout: Cloning, expression, gene organization and constrained modeling. *Dev Comp Immunol*; 32:1454-1466.
19. Daha N, Banda N, Roos A, Beursken F, Bakker J, Daha M, Trouw L. 2011. Complement activation by (auto-) antibodies. *Molecular Immunology*; 48:1656-1665.
20. Derzy Z, Prohaszka Z, Rigós J, Fust G, Molvarec A. 2010. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol*; 47:1500-1506.
21. Docal P, Contreras D, García N. 2005. Complemento y sistema nervioso central. *Revista Mexicana Neurociencia*; 6(4):310-314.
22. Dodds A, Matsushita M. 2007. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology*; 212:233-243.
23. Dodds A, Smith S, Levine R, Willis A. 1998. Isolation and initial characterization of complement components C3 and C4 of the nurse and channel catfish. *Dev Comp Immunol*; 22:207-216.
24. Dodds A. 2002. Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement?. *Immunobiology*; 205:340-354.
25. Duncan R, Wijeyewickrema L, Pike R. 2008. The initiating proteases of the complement system: controlling the cleavage. *Biochimie*; 90:397-395.
26. Ellingsen T, Strand C, Monsen E, Bøgwald J, Dalmo R. 2005. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Fish & Shellfish Immunol*; 18:351-358.
27. Ellis A. 1998. Fish immune system. *Encyclopedia of immunology*. Academic Press, New York. 920-926
28. Endo Y, Takahashi M, Fujita T. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*; 211:283-293.
29. Esser A, Tarnuzzer R, Tomlison S, Tatar L, Stanley K. 1996. Horse complement protein C9: Primary structure and cytotoxic activity. *Mol Immunol*; 33:725-733.
30. Eumura T, Yano T, Shiraishi, Nakao M. 1996. Purification and characterization of the eight and ninth components of carp complement. *Mol Immunol*; 33:925-932.
31. Flierman R, Daha M. 2007. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*; 212:363-370.
32. Fredslund F, Jenner L, Husted L, Nyborg J, Andersen G, *et al.* 2006. The structure of bovine complement component 3 reveals the basis for thioester function. *J Mol Biol*; 361:115-127.
33. Fujita T, Endo Y, Nonaka M. 2004. Primitive complement system—recognition and activation. *Mol Immunol*; 41:103-111.
34. Gál P, Dobó J, Závodszy P, Sim R. 2009. Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol Immunol*; 46:2745-2752.

35. Gonzalez S, Buchmann K, Nielsen M. 2007. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dev Comp Immunol*; 31:576-586.
36. Graham M, Shin DH, Smith S. 2009. Molecular and expression analysis of complement component C5 in the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) and its predicted functional role. *Fish & Shellfish Immunol*; 27:40-49.
37. Hinshelwood J, Spencer D, Edwards Y, Perkins S. 1999. Identification of the C3b binding site in a recombinant vWF-A domain of complement factor b by surface-enhanced laser desorption-ionisation affinity mass spectrometry and homology modelling: implications for the activity of factor B. *J Mol Biol*; 294: 587-599.
38. Johnson D, Gagnon J, Reid K. 1984. Amino acid sequence of human factor D of the complement system. *FEBS*; 166:2.
39. Kato Y, Nakao M, Shimizu M, Wariishi H, Yano T. 2004. Purification and functional assessment of C3a, C4a and C5a of the common carp (*Cyprinus carpio*) complement. *Dev Comp Immunol*; 28:901-910.
40. Keeeling K, Hicks R, Mahesh J, Billings B, Kotwal G. 2000. Local neutrophil influx following lateral fluid-percussion brain injury in rats is associated with accumulation of complement activation fragments of the third component (C3) of the complement system. *J Neuroimmunol*; 105:20-30.
41. Kilpi M, Atosuo J, Lilius E-M. 2009. Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Dev Comp Immunol*; 33:1102-1110.
42. Kim D, Song W-C. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*; 118:127-136.
43. Kimura A, Nonaka M. 2009. Molecular cloning of the terminal complement components C6 and C8b of cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunol*; 27(6): 768-772.
44. Kimura Y, Madhavan M, Call M, Santiago W, Tsonis P, et al. 2003. Expression of Complement 3 and Complement 5 in Newt Limb and Lens Regeneration. *J Immunol*; 170:2331-2339.
45. Kindt TJ, Goldsby R, Osborne B. 2006. *Immunology*. WH FREEMAN. Sixth Edition (International Edition).
46. Kishore U, Ghai R, Greenhough T, Shrive A, Bonifati D, et al. 2004. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology Letters*; 95:113-128.
47. Koch C. Complement system. Chapter II: Immunology of fishes. In: Pastoret Pp, Griebel P, Bazin H, Govaerts A. 1998. *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press, San Diego, 39-41.
48. Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. 2010. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol*; 47:2154-2160.
49. Lambris J, Reid K, Volanakis J. 1999. The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Trends immunology Today*; 20(5):207.
50. Lange S, Bambir S, Dodds A, Bowden T, Bricknell I, et al. 2006. Complement component C3 transcription in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish & Shellfish Immunol*; 20:285-294.
51. Lange S, Dodds A, Magnadóttir B. 2004. Isolation and characterization of complement component C3 from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunol*; 16:227-239.
52. Laufer J, Katz Y, Paswell J. 2001. Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation. *Mol Immunol*; 38:221-229.
53. Laursen B, Nielsen O. 2000. Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Dev Comp Immunol*; 24:85-101.

54. Lezama P. 2007. Importancia del sistema del complemento. *Revista Medica Vallejana*; 4:1.
55. Li L, Chang M, Nie P. 2007. Molecular cloning, promoter analysis and induced expression of the complement component C9 gene in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Vet Immunol Immunopathol*; 118:270-282.
56. Lindahl G, Sjöbring U, Johnsson E. 2000. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Curr Opin Immunol*; 12:44-51.
57. Llanos R, Miceli D, Valz-Gianinet J, Whitacre C. 1999. A simple procedure for isolation of *Bufo arenarum* C3 complement fraction and preparation of antiserum. *Comp Biochem Physiol*; 124:1-5.
58. Llanos R, Whitacre C, Miceli D. 2000. Potential involvement of C3 complement factor in amphibian fertilization. *Comp Biochem Physiol*; 127:29-38.
59. Løvoll M, Dalmo R, Bøgwald J. 2007. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol*; 23 721-731.
60. Løvoll M, Johnsen H, Boshra H, Bøgwald J, Sunyer J, *et al.* 2007. The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunol*; 23:542-552.
61. Manthey H, Woodruff T, Taylor S, Monk P. 2009. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol*; 41:2114-2117.
62. Mastellos D, Lambris D. 2002. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens?. *TRENDS in Immunol*; 23:10.
63. Matsushita M, Endo Y, Naotaka Hamasaki N, Fujita T. 2001. Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int Immunopharmacol*; 1:359-363.
64. Mauri I, Romero A, Acerete L, Mackenzie S, Roher N, *et al.* 2011. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish & Shellfish Immunol*; 30:182-188.
65. Mayor S, Fontenot C, Pojman J, Pojman J, Merchant M. 2011. Serum complement activity in the three-toed amphiuma (*Amphiuma tridactylum*). *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*; 34:115-121.
66. Merchant M, McFatter J, Mead S, McAdon C, Wasilewski J. 2010. Identification and characterization of serum complement activity in the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *Vet Immunol Immunopathol*; 133:165-169.
67. Miwa T, Song W-C. 2001. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol*; 1:445-459.
68. Mikrou L, Zarkadis I. 2010. Cloning of the sixth complement component and, spatial and temporal expression profile of MAC structural and regulatory genes in chicken. *Develop Comp Immunol*; 34:485-490.
69. Nakao M, Miura C, Itoh S, Nakahara M, Okumura K, *et al.* 2004. A complement C3 fragment equivalent to mammalian C3d from the common carp (*Cyprinus carpio*): generation in serum after activation of the alternative pathway and detection of its receptor on the lymphocyte surface. *Fish & Shellfish Immunol*; 16:139-149.
70. Näreaho A, Saari S, Meri S, Sukura A. 2009. Complement membrane attack complex formation and infectivity of *Trichinella spiralis* and *T. nativa* in rats. *Vet Parasitol*; 159:263-267.
71. Nayak A, Ferluga J, Tsolaki A, Kishore U. 2010. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol letter*; 139-150.

72. Nielsen E, Waage C, Fure H, Brekke Ole, Sfiroera G, et al. 2007. Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Mol Immunol*; 44:1819-1826.
73. Nonaka M, Fujii T, Kaidoh T, Natsuume-Sakai S, Yamaguchi N, et al. 1984. Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of mammalian complement system. *J Immunol*; 133: 3242-3249.
74. Nonaka M, Smith S. 2000. Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunol*; 10:215-228.
75. Nonaka M, Yoshizaki F. 2004. Evolution of the complement system. *Mol Immunol*; 40:897-902.
76. Nonaka M. 2001. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*; 13:69-73.
77. Ogundele M. 2000. Activation and deposition of human breast-milk complement C3 opsonins on serum sensitive *Escherichia coli* 0111. *J Rep Immunol*; 48:99-105.
78. Pangburn M, Ferreira V, Cortes C. 2008. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine*; 26S:I15-I21.
79. Parmentier H, Baelmans RC, Nieuwland M, Dorny P, Demey F. 2002. Haemolytic complement activity, C3 and factor B consumption in serum in chickens divergently selected for antibody response to sheep red blood cells. *Vet Immunol Immunopathol*; 90:91-101.
80. Parmentier H, Baelmans RC, Savelkoul H, Dorny P, Demey F, et al. 2004. Serum haemolytic complement activities in 11 different MHC (B) typed chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol*; 100:25-32.
81. Plouffe D, Hanington P, Walsh J, Wilson E, Belosevic M. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*; 12:266-277.
82. Rabson A, Roitt I, Delves P. 2005. Really essential medical immunology. Blackwell Publishing. 2nd Edition.
83. Rainard P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res*; 34(5):647-70.
84. Rawal N, Pangburn K. 2001. Structure/function of C5 convertases of complement. *Int Immunopharmacol*; 1:415-422.
85. Rawal N, Rajagolopalan R, Salvi P. 2009. Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). *Mol Immunol*; 46: 2902-2910.
86. Rehana S, Kini R. 2008. Complement C3 isoforms in *Austrelaps superbus*. *Toxicon*; 51:864-881.
87. Rehana S, Kini R. 2007. Molecular isoforms of cobra venom factor-like proteins in the venom of *Austrelaps superbus*. *Toxicon*; 50:32-52.
88. Remedios N, Ramsland P, Hook H, Raison R. 1999. Identification of a homologue of CD59 in a cyclostomes: implications for the evolutionary development of the complement system. *Dev Comp Immunol*; 23:1-14.
89. Rodríguez S, Esparza-Gordillo J, Gocoechea E, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*; 41:355-367.
90. Rodríguez S, Harris C, Morgan B, Llorca S. 2011. Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta*; 1812:12-22.
91. Roitt I, Brostoff J, Male D. 1999. *Inmunología*. 4ta Edición. Harcourt Brace, España.
92. Rotllant J, Parra D, Peters R, Boshra H, Sunyer J. 2004. Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: Role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Dev Comp Immunol*; 28:815-828.

93. Sakai D. 1981. Heat inactivation of complements and immune hemolysis reaction in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. *Bull Jap Sci Soc Fish*; 47:979-991.
94. Schraml B, Baker M, Realli B. 2006. A complement receptor for opsonized immune complexes on erythrocytes from *Oncorhynchus mykiss* but not *Ictalurus punctatus*. *Mol Immunol*; 43:1595-1603.
95. Schreck S, Parker C, Plumb M, Sodetz J. 2000. Human complement protein C8 $\gamma$ . *Biochimica et Biophysica Acta*; 1482:199-208.
96. Seeger A, Mayer W, Klein J. 1996. A complement factor B-like cDNA clone from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Mol Immunol*; 33: 6, 511-520.
97. Shen Y, Zhang J, Xu X, Li J. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the complement component C6 gene in grass carp. *Vet Immunol Immunopathol*; 141(1-2):139-143.
98. Shin DH, Webb B, Nakao M, Smith S. 2009. Characterization of shark complement factor I gene(s): Genomic analysis of a novel shark-specific sequence. *Mol Immunol*; 46:2299-2308.
99. Shin DH, Webb B, Nakao M, Smith S. 2007. Molecular cloning, structural analysis and expression of complement component Bf/C2 genes in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Dev Comp Immunol*; 31:1168-1182.
100. Sjöwall C, Wettero J, Bengtsson T, Askendal A, Almroth G, et al. 2007. Solid-phase classical complement activation by C-reactive protein (CRP) is inhibited by fluid-phase CRP-C1q interaction. *Biochem Biophys Res Commun*; 352:251-258.
101. Slade D, Lovelace L, Chruszcz M, Minor Wlebioda L, Sodetz J. 2008. Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 $\alpha$  in complex with the C8 $\gamma$  subunit. *J Mol Biol*; 379:331-342.
102. Smith G, Smith R. 2001. Membrane-targeted complement inhibitors. *Mol Immunol*; 38:249-255.
103. Sunyer J, Boshra H, Li J. 2005. Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: Insights from the study of fish complement. *Vet Immunol Immunopathol*; 108:77-89.
104. Sunyer J, Zarkadis L, Lambris J. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunology today*; 19:11.
105. Swain P, Nayak S, Nanda P, Dash S. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunol*; 25(3):191-201.
106. Swain P, Nayak S. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunol*; 27:89-99.
107. Tizard I. 2009. *Veterinary Immunology: An introduction*. WB Saunders Company. 8th Edition.
108. Ullman C, Chamberlain D, Ansari A, Emery V, Haris P, et al. 1998. Human complement factor I: its expression by insect cells and its biochemical and structural characterization. *Mol Immunol*; 35:503-512.
109. Villoutreix B, Blom A, Webb J, Dahlbäck B. 1999. The complement regulator C4b-binding protein analyzed by molecular modeling, bioinformatics and computer-aided experimental design. *Immunopharmacology*; 42:121-134.
110. Whyte S. 2007. The innate immune response of finfish-A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunol*; 23:1127-1151.
111. Wallis R, Mitchel D, Schmid R, Schwaeble W, Keeble A. 2010. Paths reunited: Initiation of classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiol*; 215:1-11.
112. Yu J, Heck S, Debnath A, Yazdanbakhsh K. 2007. Identification of a complement receptor 1 peptide for inhibition of immune hemolysis. *Biochem Biophys Res Commun*; 353:363-368.
113. Zarkadis I, Mastellos D, Lambris J. 2001. Phylogenetic aspects of the complement systems. *Develop Comp Immunol*; 25:745-762.