

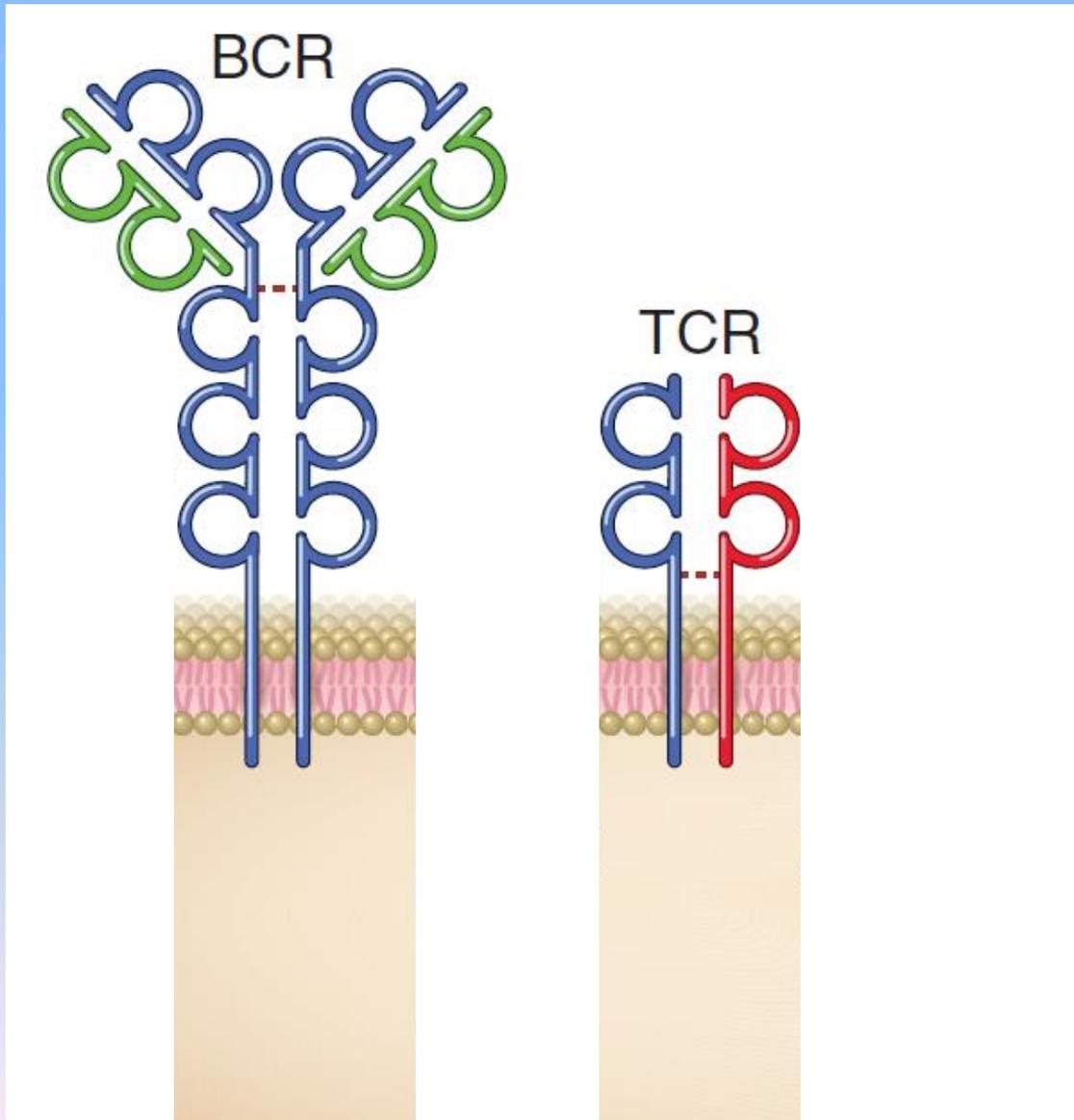
***Curso de Odontologia***  
***Disciplina BMI0277 – Imunologia***

# ***Ontogenia e Ativação de*** ***Linfócitos***

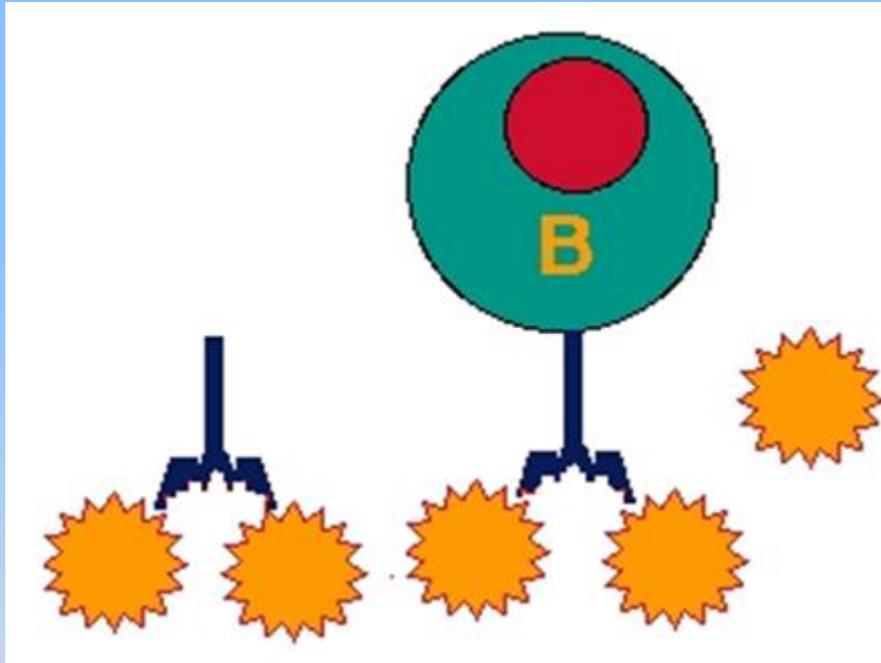
***Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes***

***Departamento de Imunologia***  
***Instituto de Ciências Biomédicas***  
***Universidade de São Paulo***

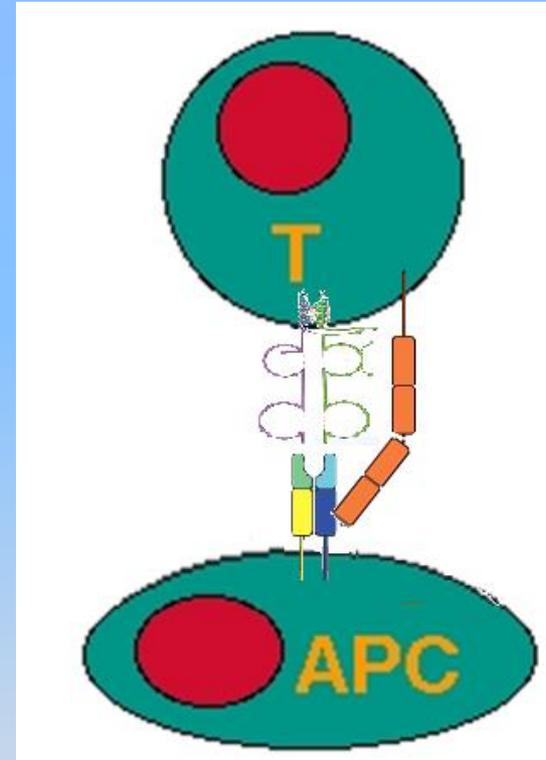
# Receptores Antigênicos da Imunidade Adquirida



# ***Reconhecimento de Antígenos pelos Linfócitos e Conceito de Clonalidade***

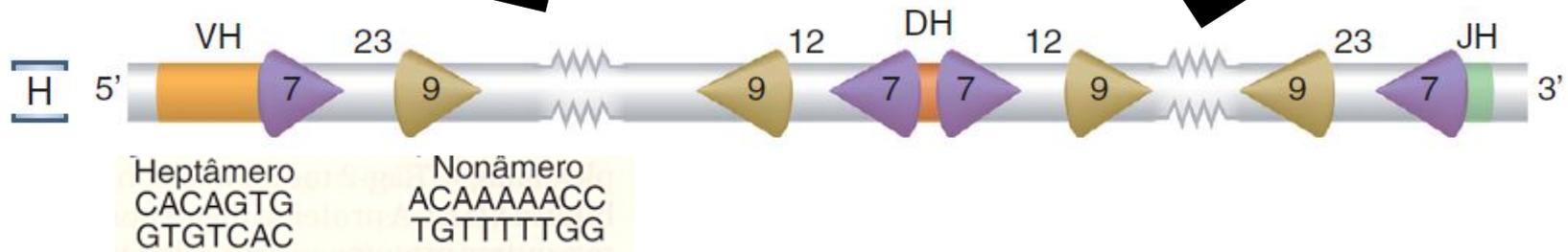
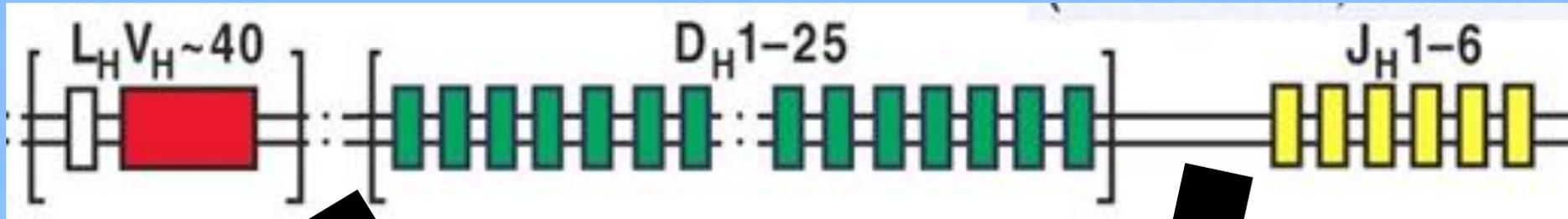


***Antígenos na conformação nativa são reconhecidos pelos linfócitos B***

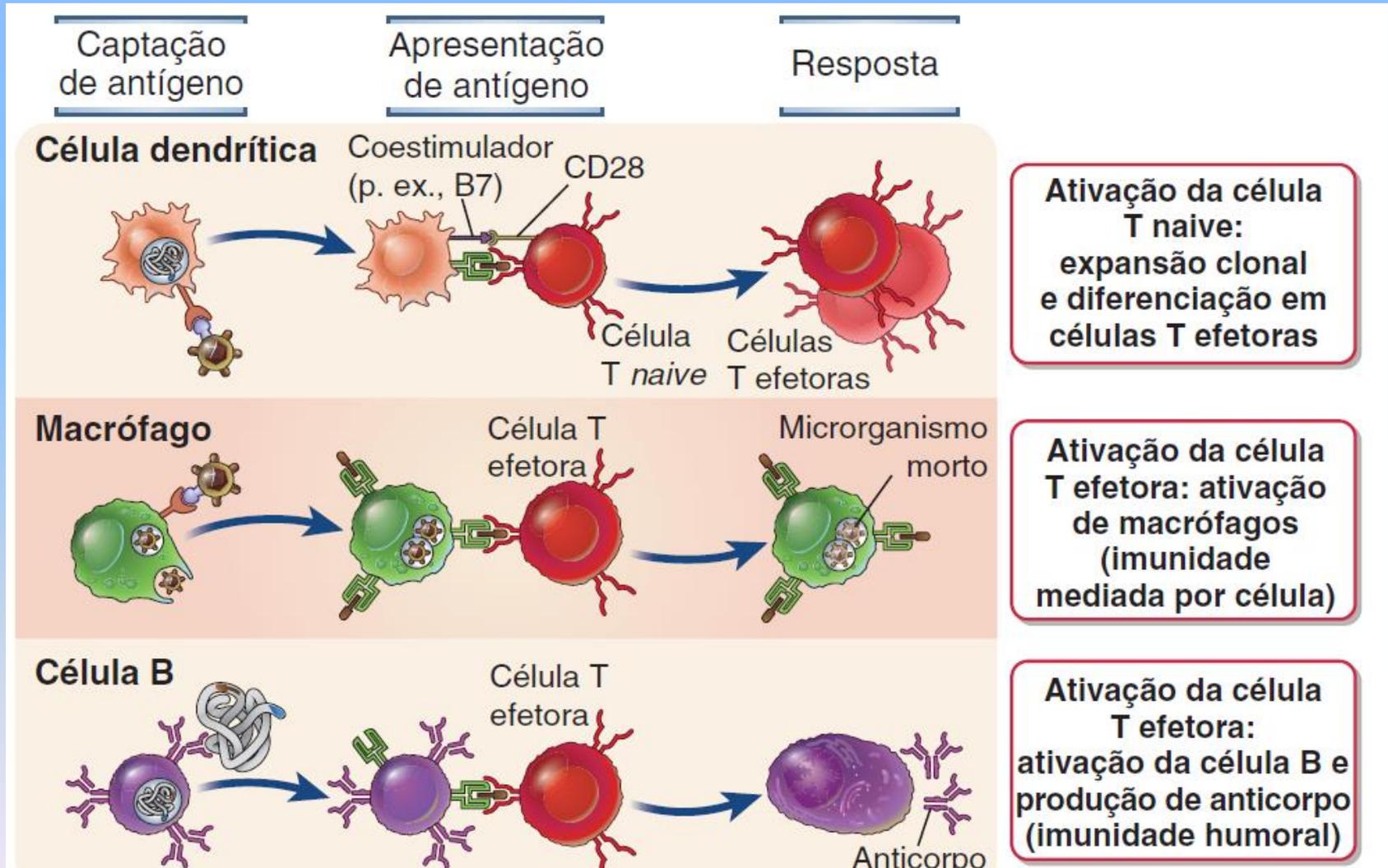


***Linfócitos T não reconhecem antígenos diretamente. Os antígenos precisam ser “processados” e “apresentados” pelas células apresentadoras de antígenos***

# Sequência Sinal de Recombinação (RSS) da Cadeia Pesada

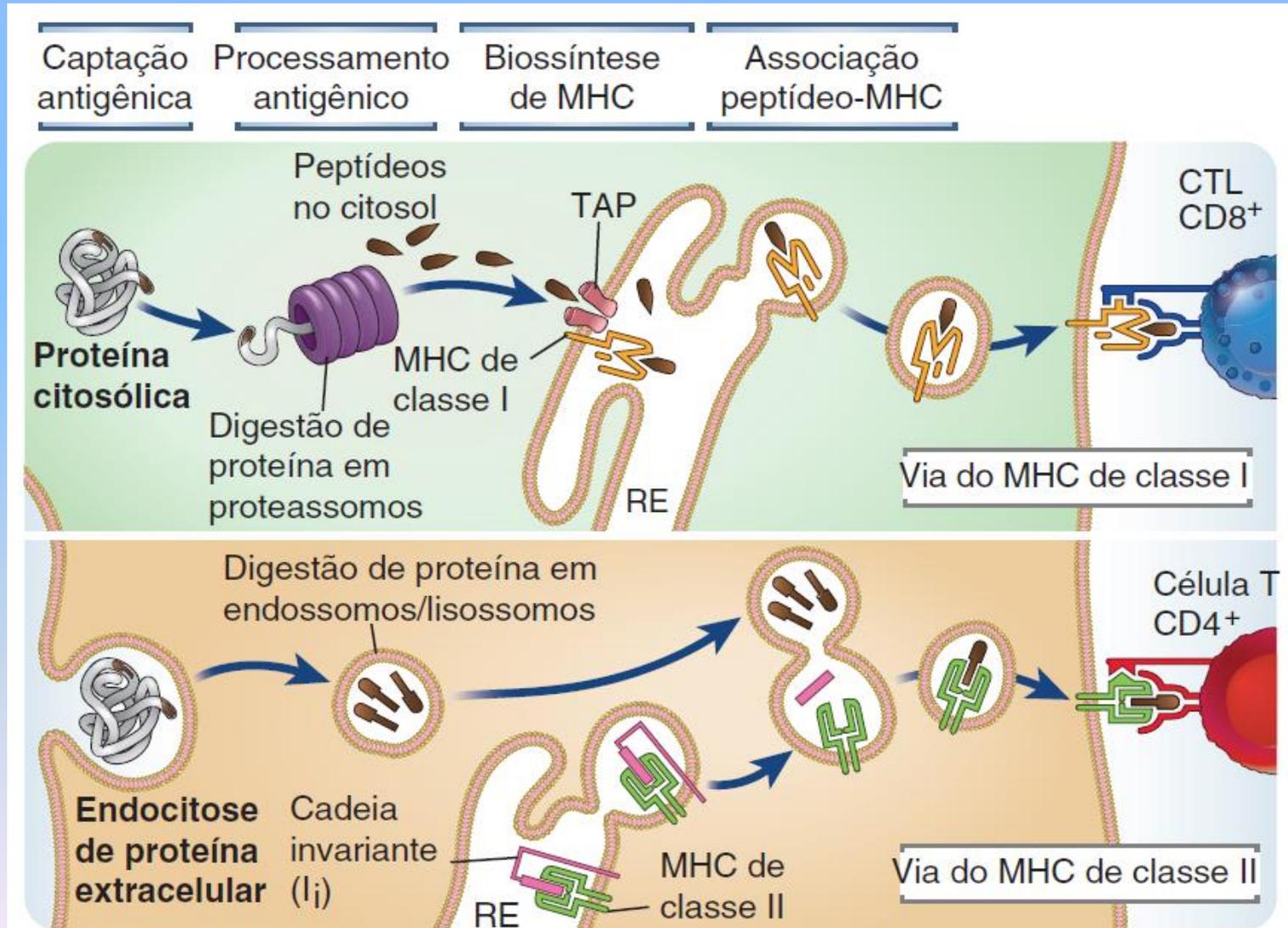


# Células Apresentadoras de Antígeno (APC)





# Processamento e Apresentação dos Antígenos



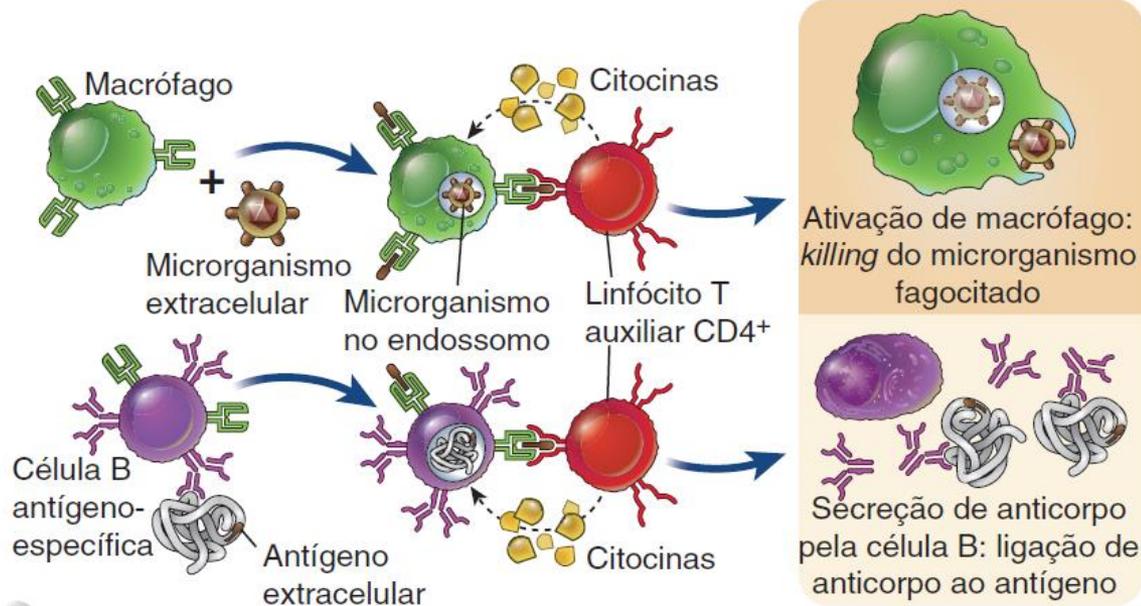
# Funções Efetoras das Células T Ativadas

Captação ou síntese de antígeno

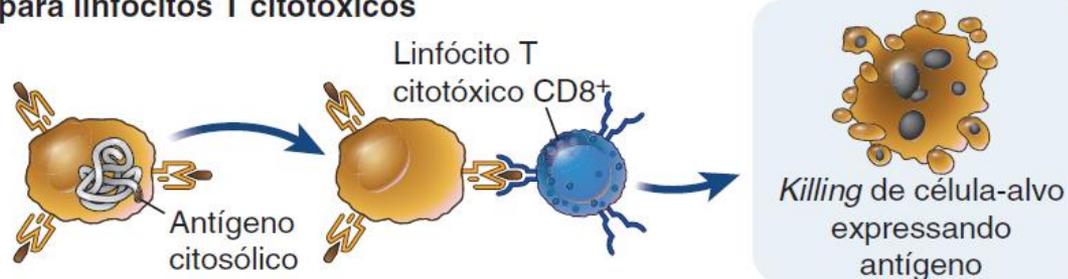
Apresentação de antígeno

Funções da célula T efetora

## A Via do MHC de classe II: apresentação de antígeno a células T auxiliares



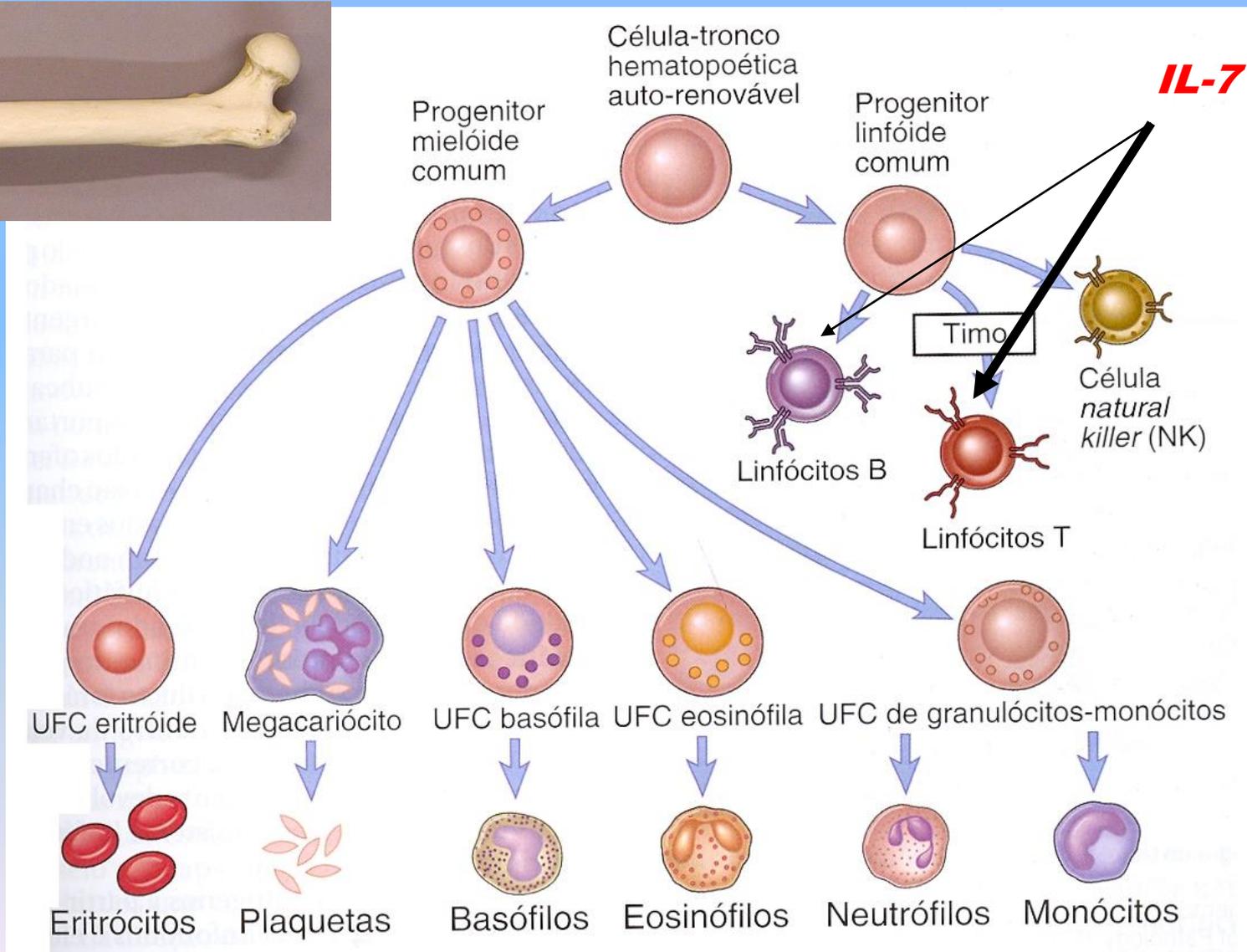
## B Via do MHC de classe I: apresentação de antígeno para linfócitos T citotóxicos



## ***Tópicos Essenciais da Aula***

- 1. Conhecer os estágios de desenvolvimento dos linfócitos, a sequência de sinais e as moléculas que regulam cada estágio.***
- 2. Contextualizar o processo de geração de diversidade dos receptores nas fases de desenvolvimento dos linfócitos.***
- 3. Discutir os processos de seleção positiva e negativa dos linfócitos.***
- 4. Reconhecer os locais onde a ativação dos linfócitos T e B ocorrem.***
- 5. Conhecer as fases, a sequência de sinais e as moléculas que participam da ativação dos linfócitos T e B.***

# Elementos Celulares do Sangue

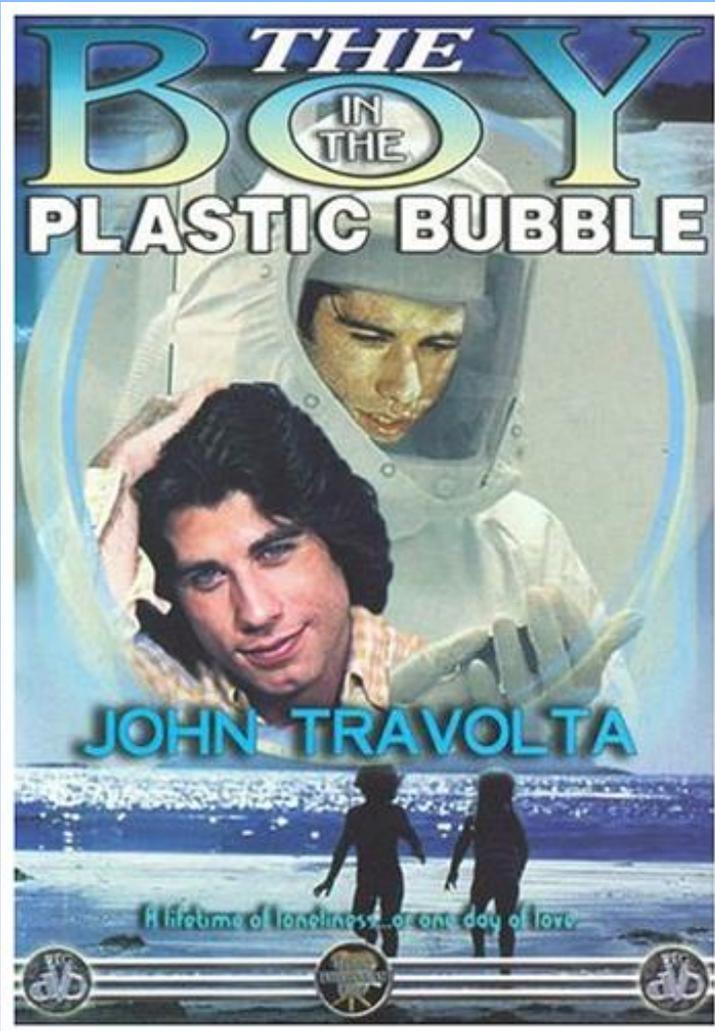


# ***Distúrbios Congênitos da Imunidade Adaptativa*** ***Imunodeficiência Combinada Severa (SCID)***

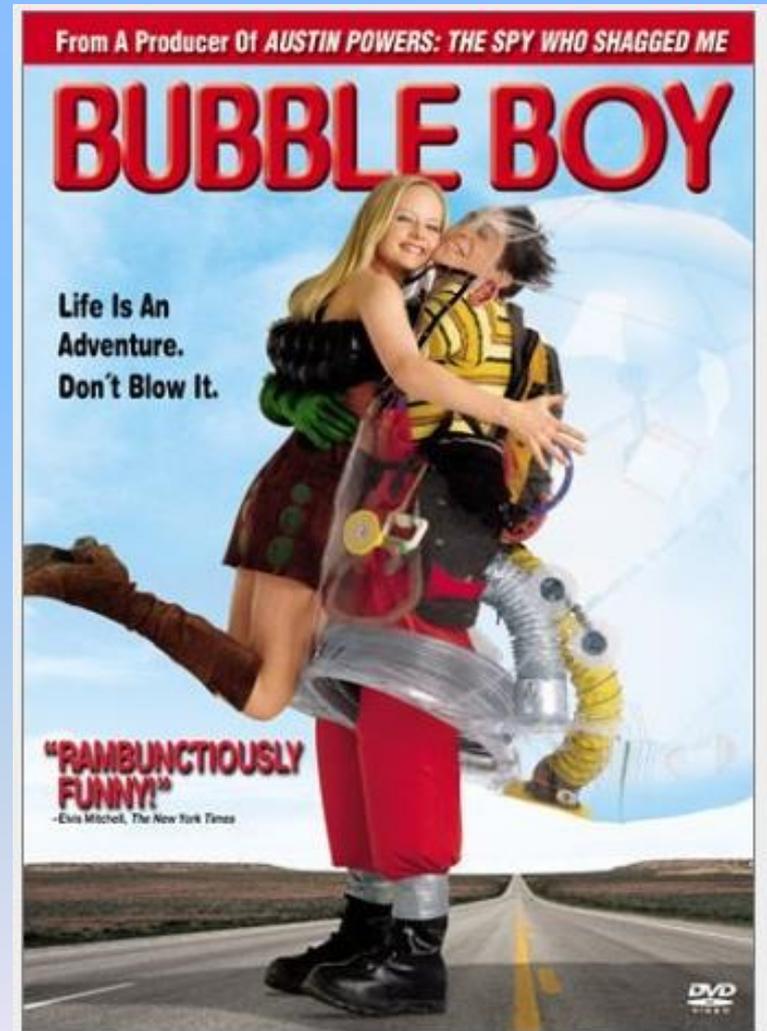


***David Vetter - "Bubble Boy"***  
***(1971-1984)***

# ***Distúrbios Congênitos da Imunidade Adaptativa Imunodeficiência Combinada Severa (SCID)***

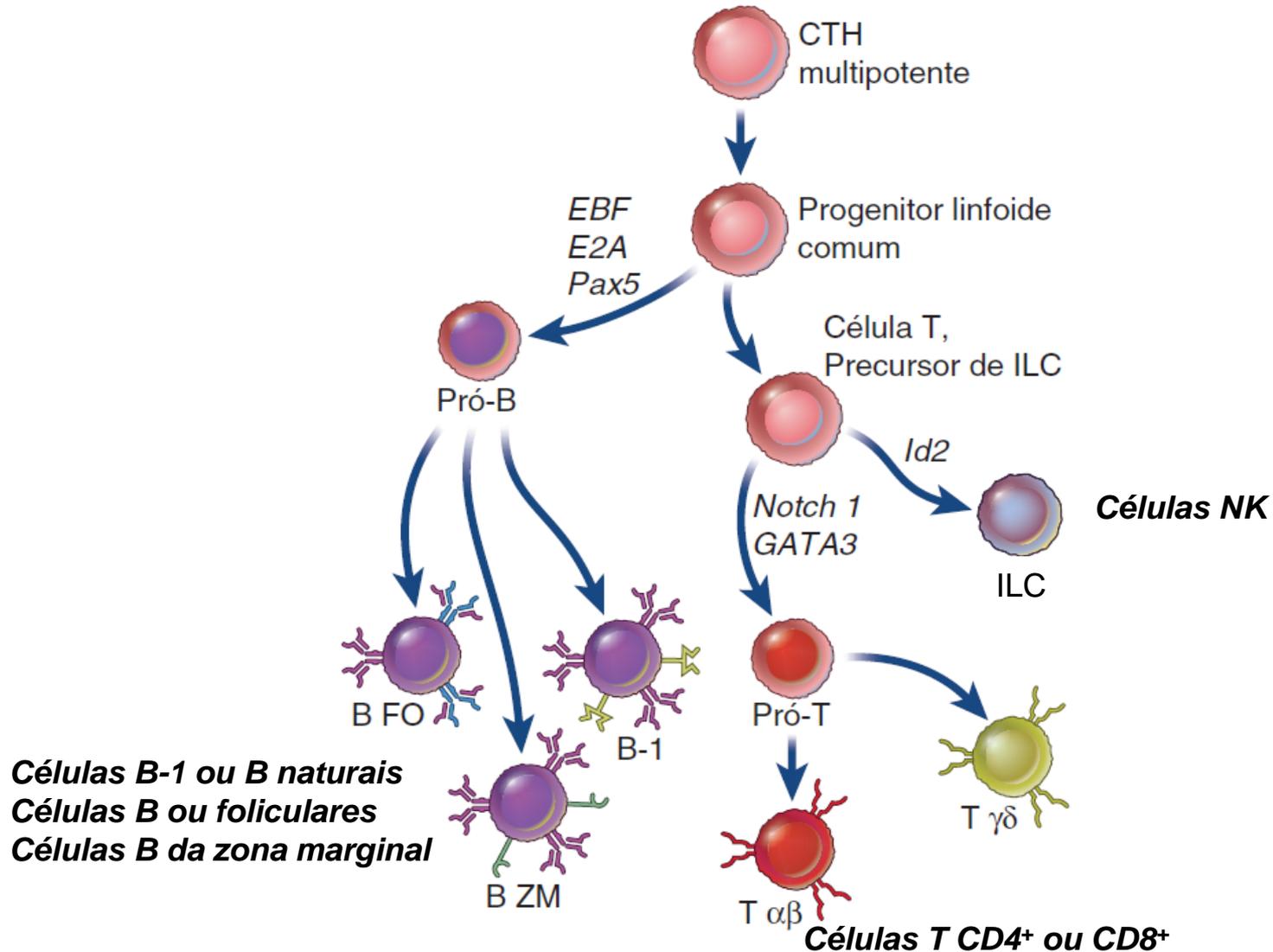


***O Menino da Bolha de Plástico  
(John Travolta - 1976)***



***Jimmy Bolha  
(Jake Gyllenhaal - 2001)***

# Tipos Celulares Derivados do Progenitor Linfóide Comum



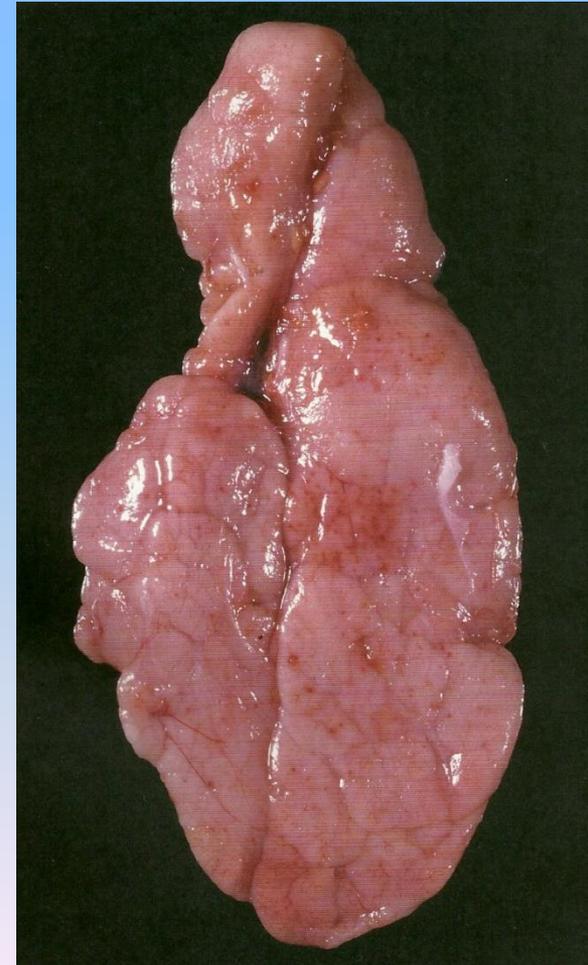
# Órgãos Linfóides Primários ou Centrais (Geradores)



<https://www.gettyimages.com/photos/femur>

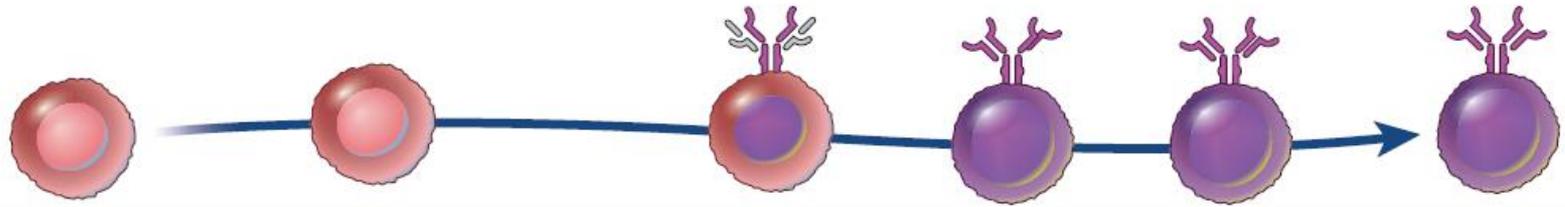


Tizard, *Imunologia Veterinária*, Saunders-Elsevier, 2009.



Parham, 3a. Edição, 2011.

# Estágios de Desenvolvimento dos Linfócitos



<b>Estágio de Maturação</b>	Célula-tronco	Pró-linfócito	Pré-linfócito	Linfócito imaturo	Subpopulações de linfócito	Linfócito maduro
-----------------------------	---------------	---------------	---------------	-------------------	----------------------------	------------------

<b>Principais Eventos</b>	Proliferação, comprometimento mediado por fator de crescimento	Iniciação de rearranjo do gene de receptor antigênico	Seleção de células que expressam pré-receptores antigênicos	Seleção de repertório	Maturação de subpopulações de células T e B funcionalmente distintas	
---------------------------	--	---	---	-----------------------	--	--

<b>Sítio Anatômico</b>	Órgão gerador (medula óssea ou timo)				Tecido ou órgão linfoide periférico	
------------------------	--------------------------------------	--	--	--	-------------------------------------	--

<b>Dependência de Antígeno</b>	Não		Autoantígeno			
--------------------------------	-----	--	--------------	--	--	--

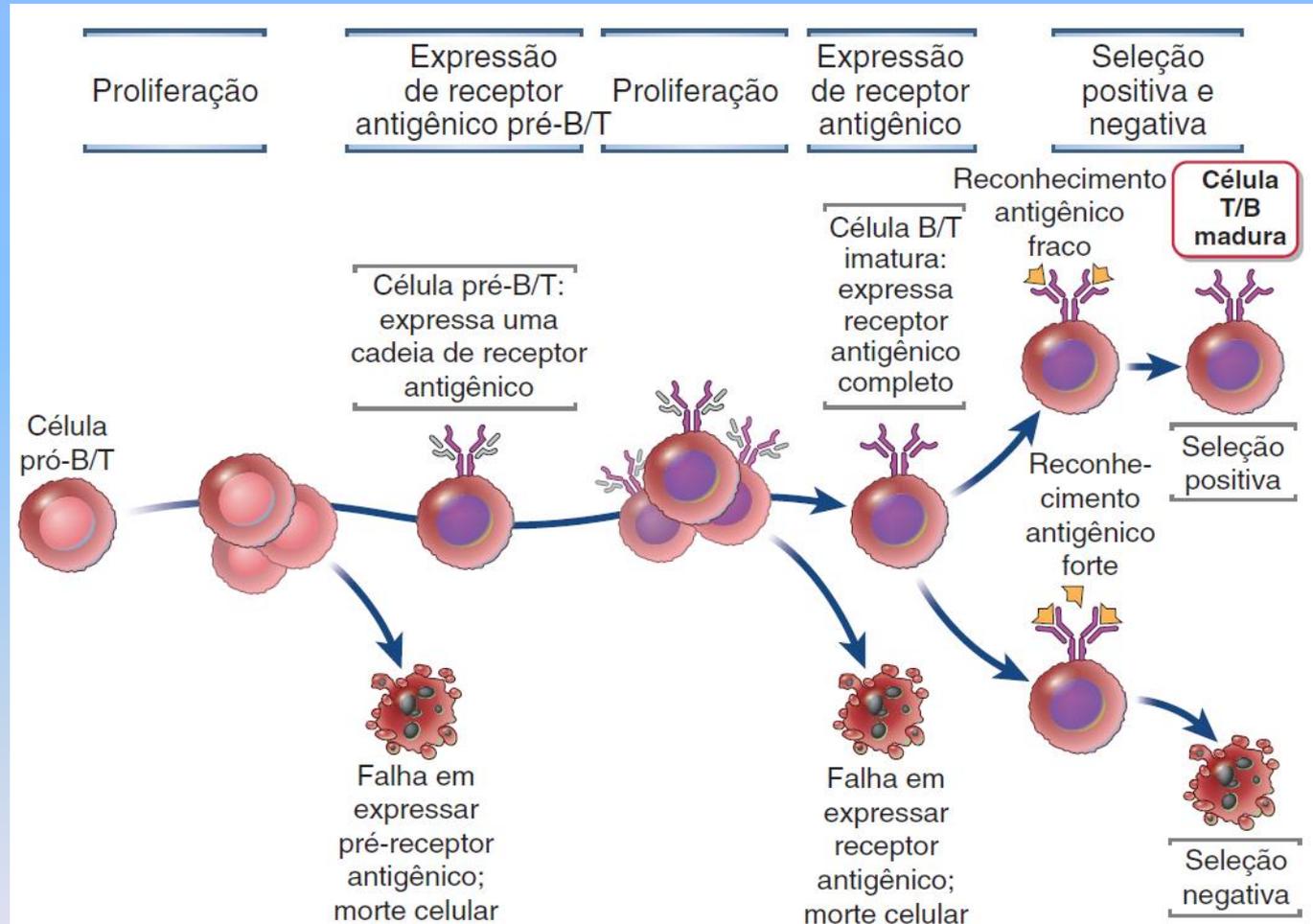
# Eventos do Desenvolvimento dos Linfócitos

**Requerimentos para o desenvolvimento dos linfócitos:**

**1) Recombinação de um receptor antigênico adequado**

**2) Capaz de reconhecer antígenos**

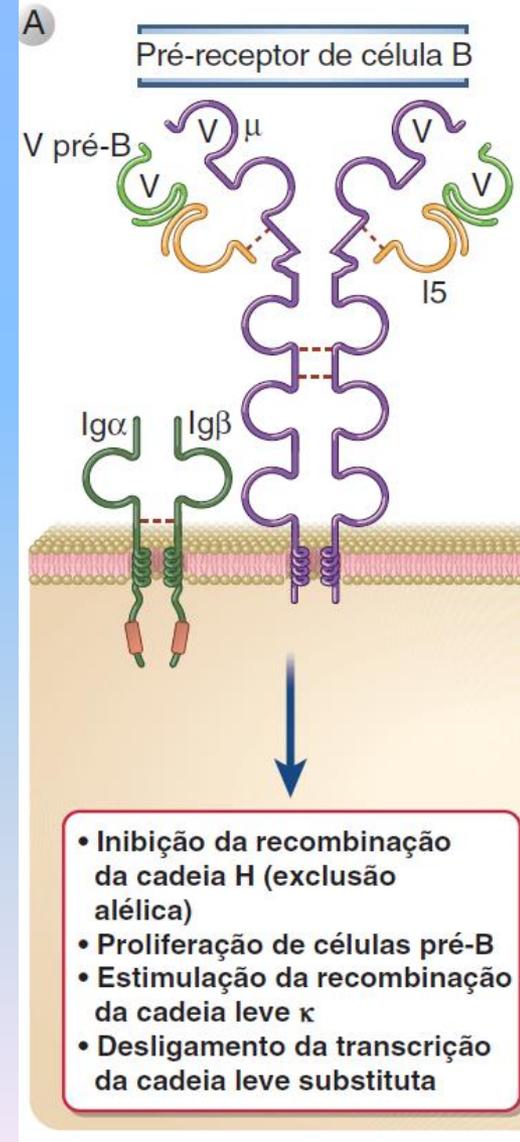
**3) Não reagir fortemente com os antígenos próprios expressos na medula óssea e periferia (tolerância)**



# Estágios do Desenvolvimento dos Linfócitos



Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-B	Pré-B grande	Pré-B pequena	B imatura	B madura
Proliferação	[Barra cinza]		[Barra cinza]			
Expressão de RAG	[Barra cinza]			[Barra cinza]		
Expressão de TdT		[Barra cinza]				
RNA, DNA de Ig	DNA de linhagem germinativa	D <sub>H</sub> -J <sub>H</sub>	Recombinação V <sub>H</sub> -D <sub>J</sub> , mRNA de	Gene de cadeia H recombinado (VDJ), recombinação V-J κ	RNA de μ e κ/λ	Splicing alternativo do RNA VDJ-C para formar mRNA de C <sub>μ</sub> e C <sub>δ</sub>
Expressão de Ig	Nenhuma	Nenhuma	Receptor pré-B	citoplasmática	IgM de membrana (μ + κ ou cadeia leve)	IgM e IgD de membrana
Marcadores de superfície	CD43 <sup>+</sup>	CD43 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup>	B220 <sup>lo</sup> CD43 <sup>+</sup>	B220 <sup>lo</sup> CD43 <sup>+</sup>	IgM <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup>	IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>+</sup>
Sítio anatómico	[Barra cinza: Medula óssea]					[Barra cinza: Periferia]
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma		Seleção negativa (deleção), edição do receptor	Ativação (proliferação e diferenciação)



# Papel das Células Estromais para o Desenvolvimento dos Linfócitos B

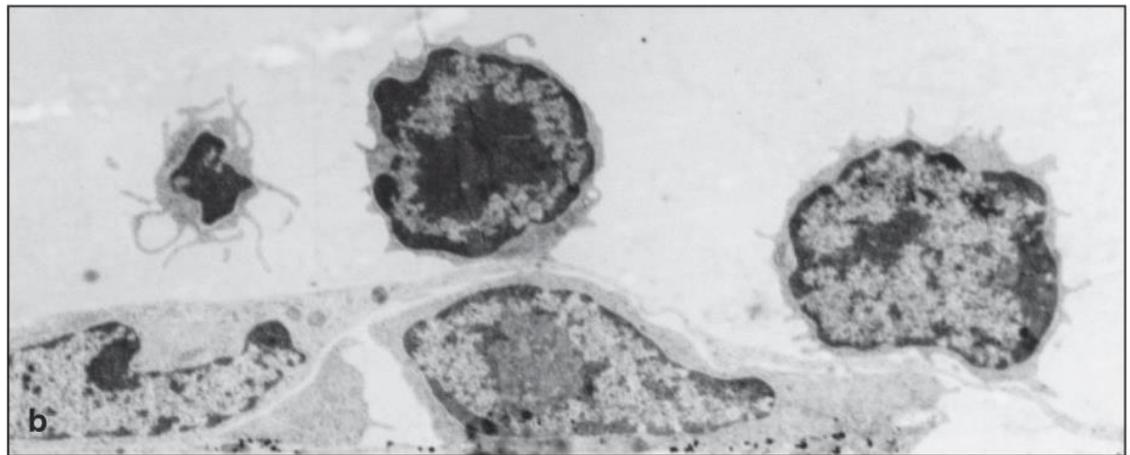
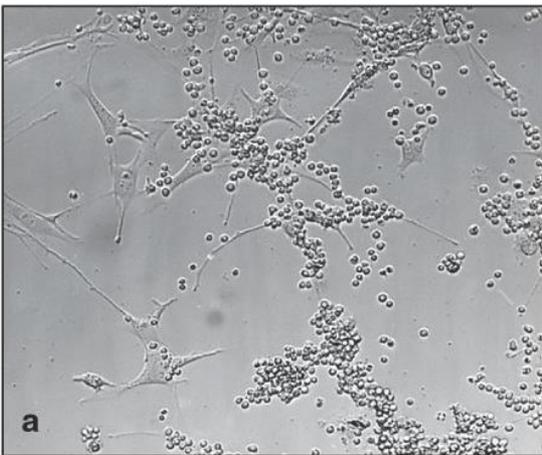
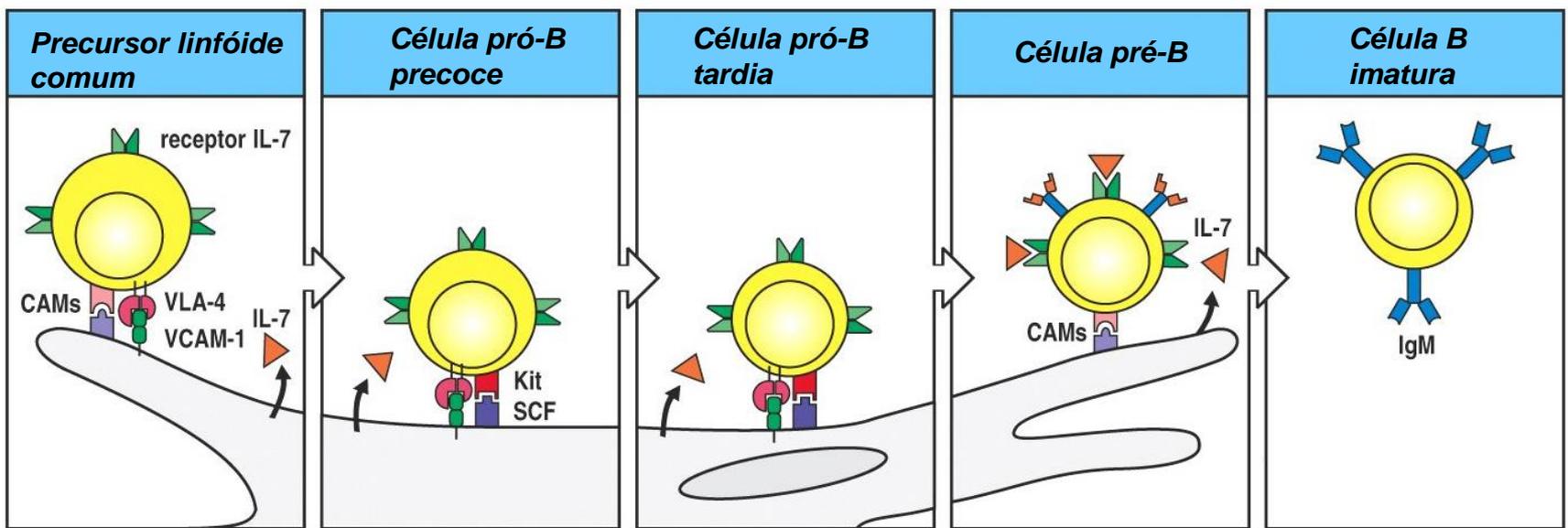


Figure 7-4 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Seleção Positiva e Negativa dos Linfócitos B

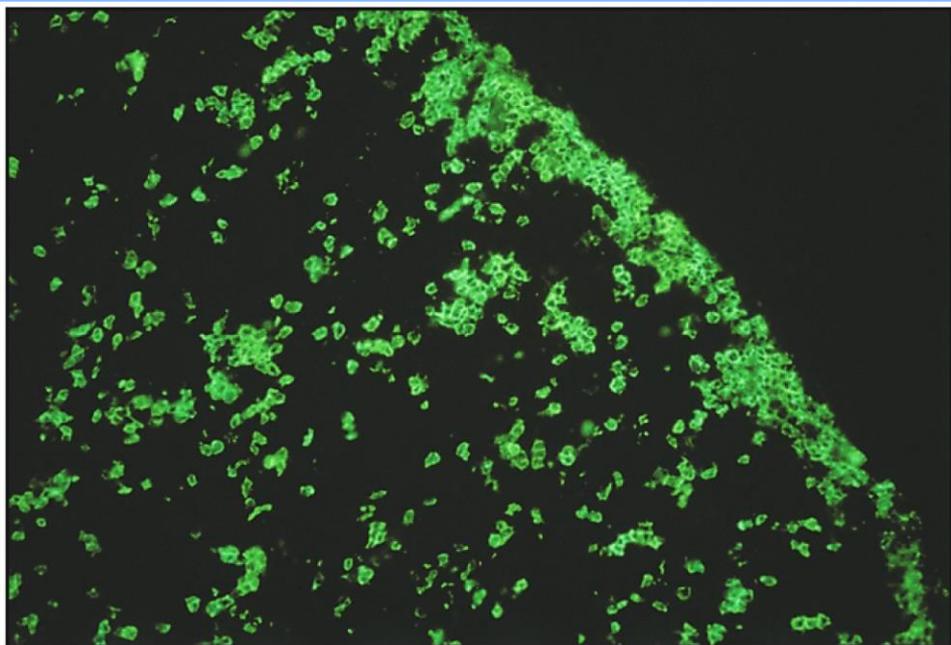


Figure 7-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

**Microscopia de Fluorescência de um corte transversal de fêmur**

**Marcação para Transferase desoxinucleotidil Terminal (TdT)**

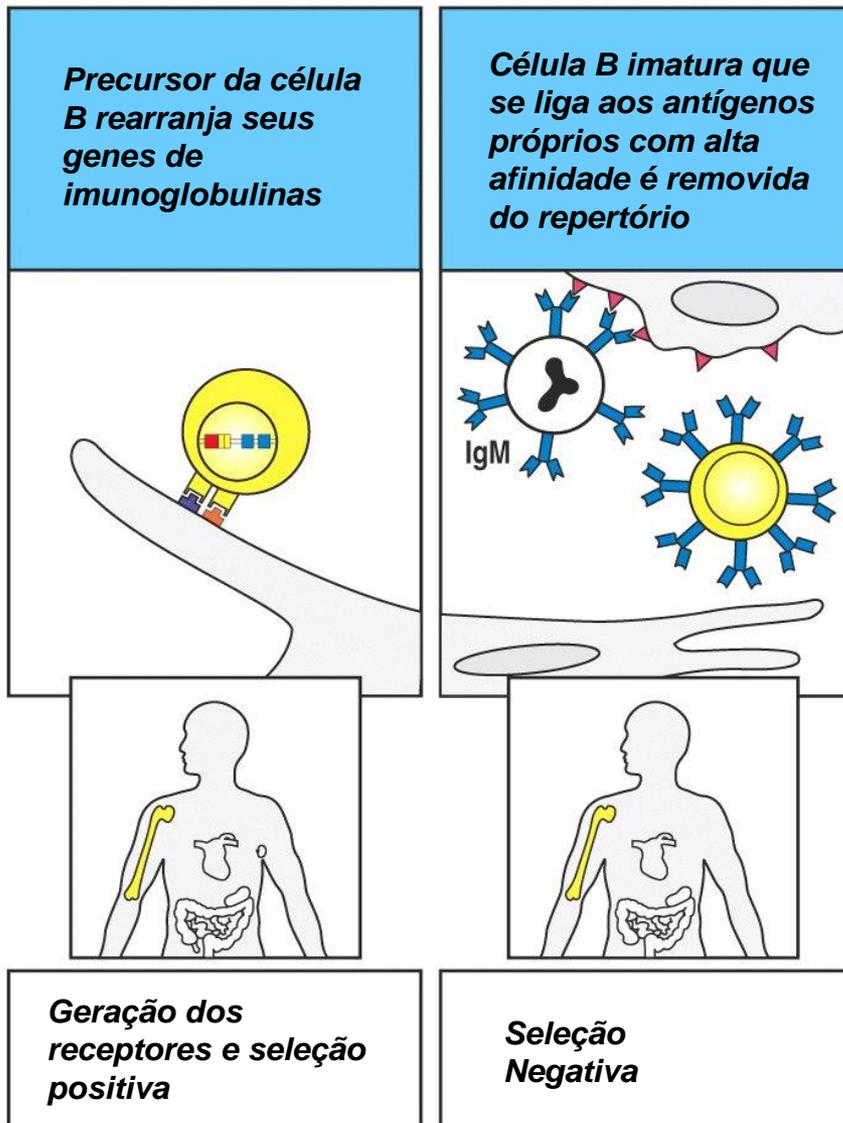
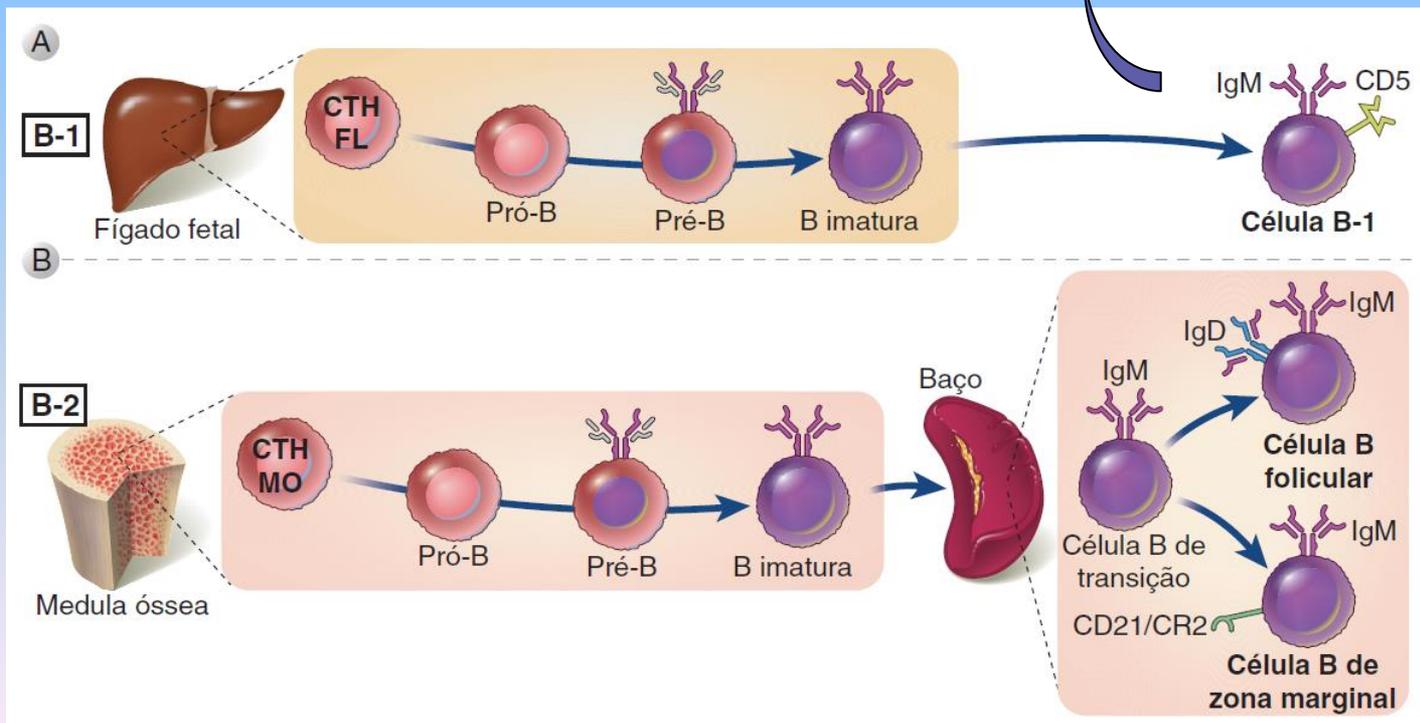
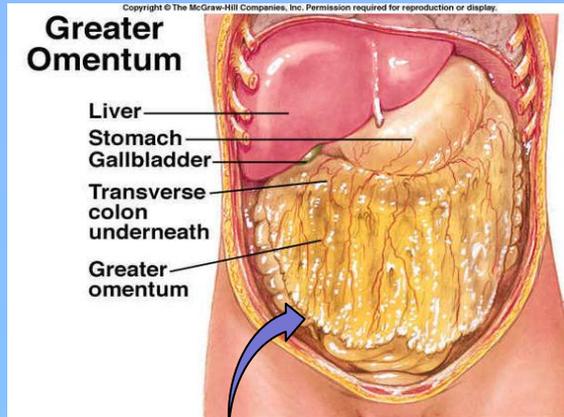
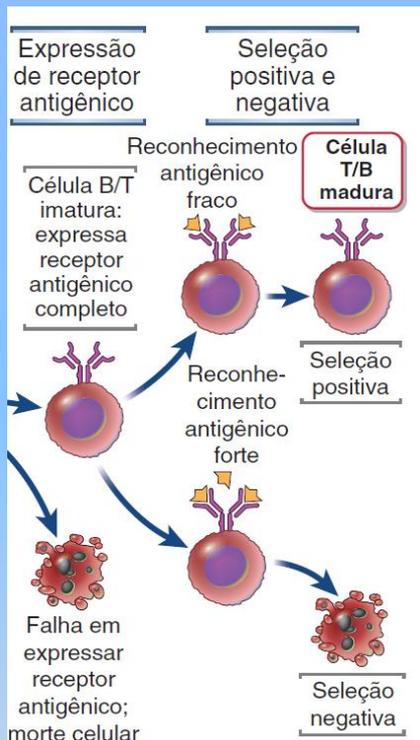


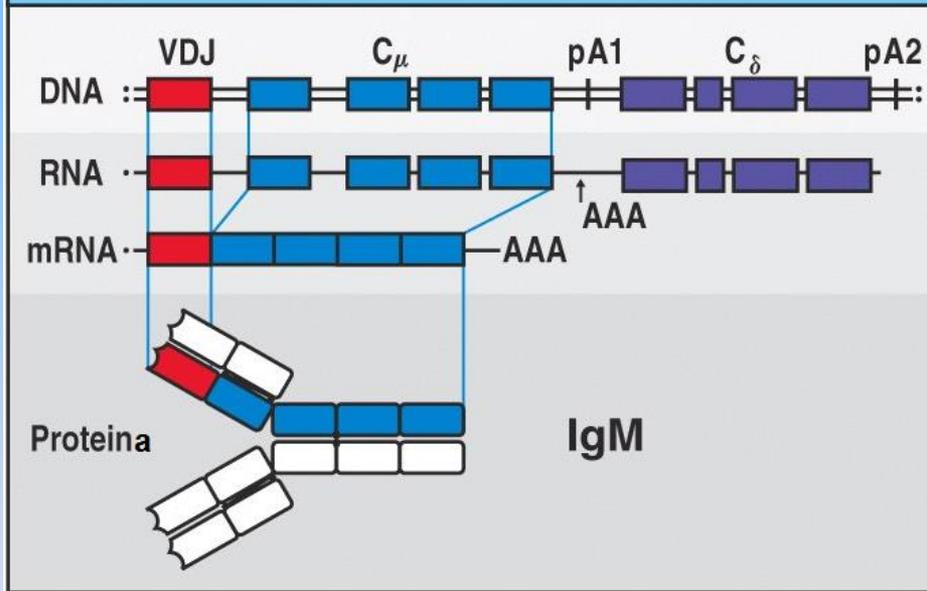
Figure 7-1 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Linfócitos B: seleção positiva e negativa



# Co-expressão de IgM e IgD

## Expressão de IgM



## Expressão de IgD

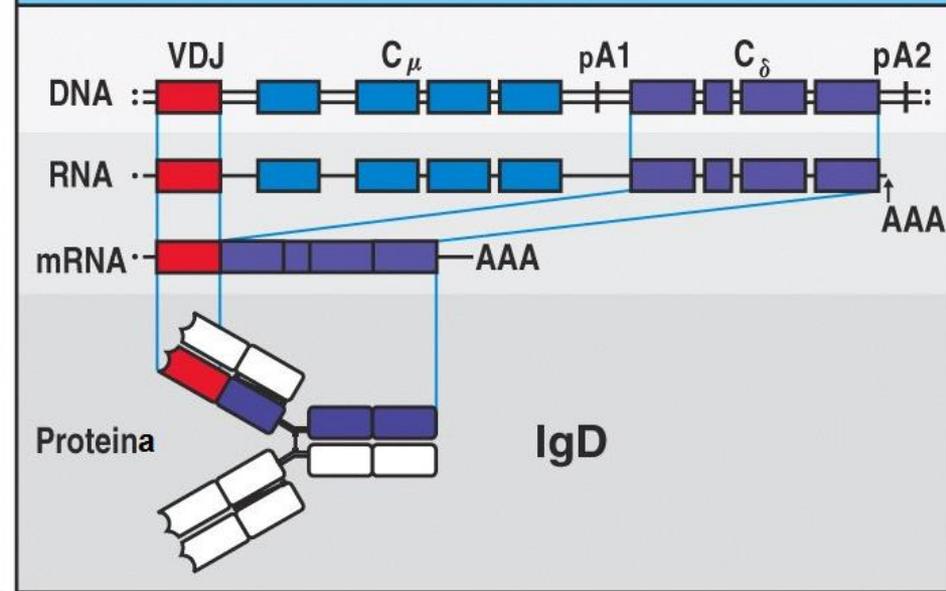
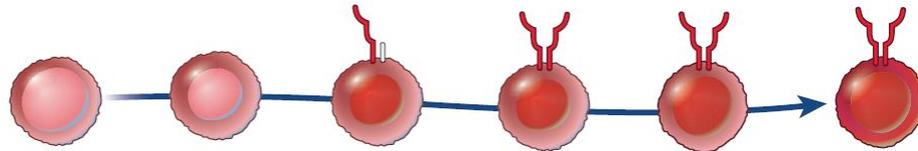


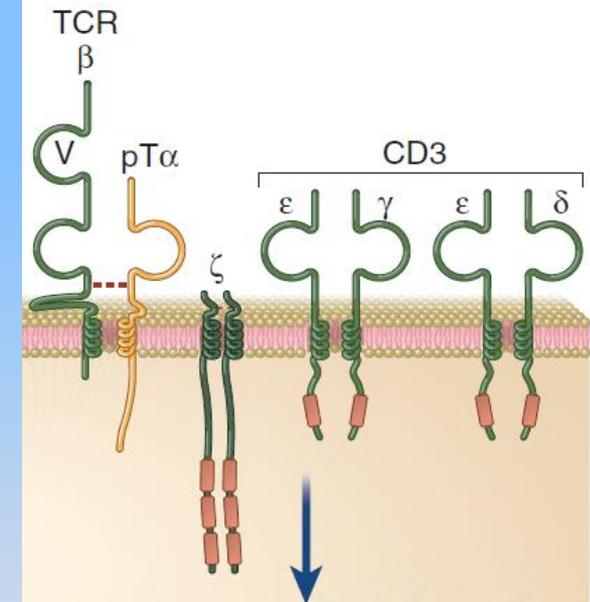
Figure 4-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Estágios de Desenvolvimento dos Linfócitos T



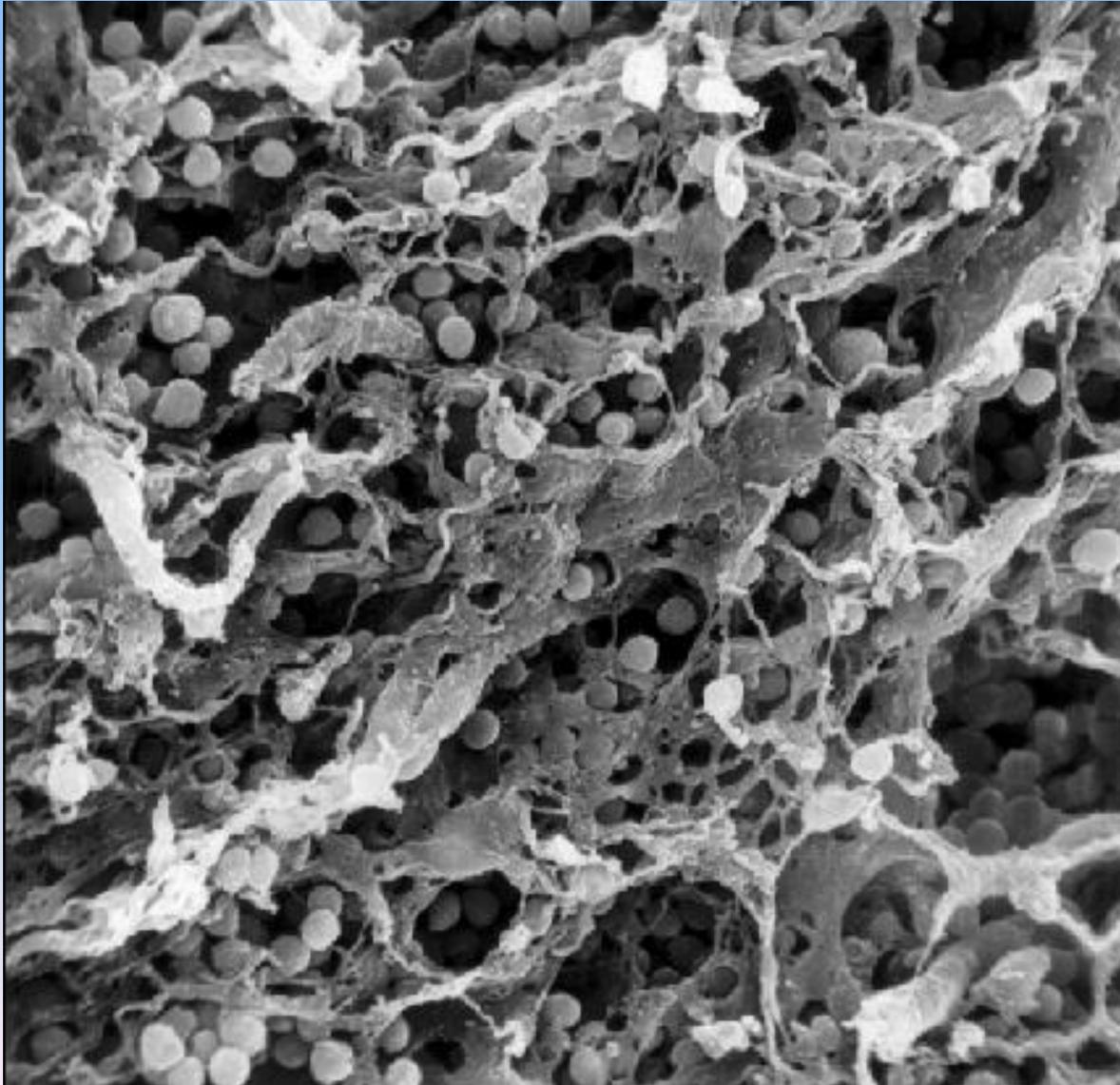
Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-T	Pré-T	Duplo-positivo	Monopositivo (célula T imatura)	Célula T madura
Proliferação	█		█			
Expressão de RAG			█	█		
Expressão de TdT		█				
DNA, RNA de TCR	DNA não recombinado (linhagem germinativa)		Gene de cadeia β recombinado [V(D)J-C]; mRNA de cadeia β	Genes de cadeias β e α recombinados [V(D)J-C]; mRNA de cadeias β e α		
Expressão do TCR	Nenhuma	Nenhuma	Pré-receptor T (cadeia β/pré-Tα)	TCR αβ de membrana		
Marcadores de superfície	<i>c-kit</i> <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	<i>c-kit</i> <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	<i>c-kit</i> <sup>+</sup> CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR/CD3 <sup>lo</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ou CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR/CD3 <sup>hi</sup>	
Sítio anatómico	Medula óssea	Timo				Periferia
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Seleção positiva e negativa	Ativação (proliferação e diferenciação)	

## Pré-receptor de célula T



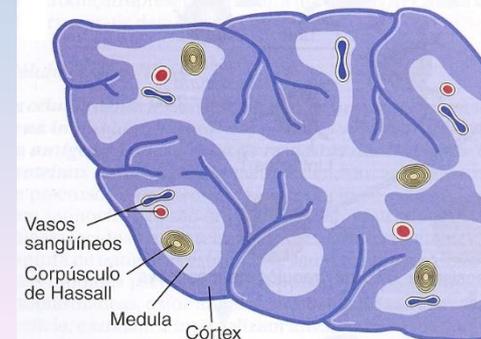
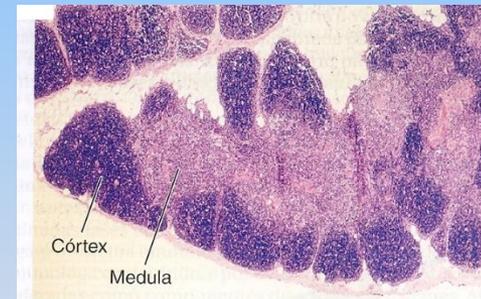
- Inibição da recombinação do gene da cadeia β
- Proliferação de células pré-T
- Estimulação da recombinação da cadeia α
- Expressão de CD4 e CD8
- Desligamento da transcrição de pTα

# Anatomia do Timo



**Timo de camundongos:**

- $1-2 \times 10^8$  células totais
- $5 \times 10^7$  novas células diariamente
- $1-2 \times 10^6$  deixam o timo diariamente (2-4% do total)



# Estágios de Desenvolvimento dos Timócitos

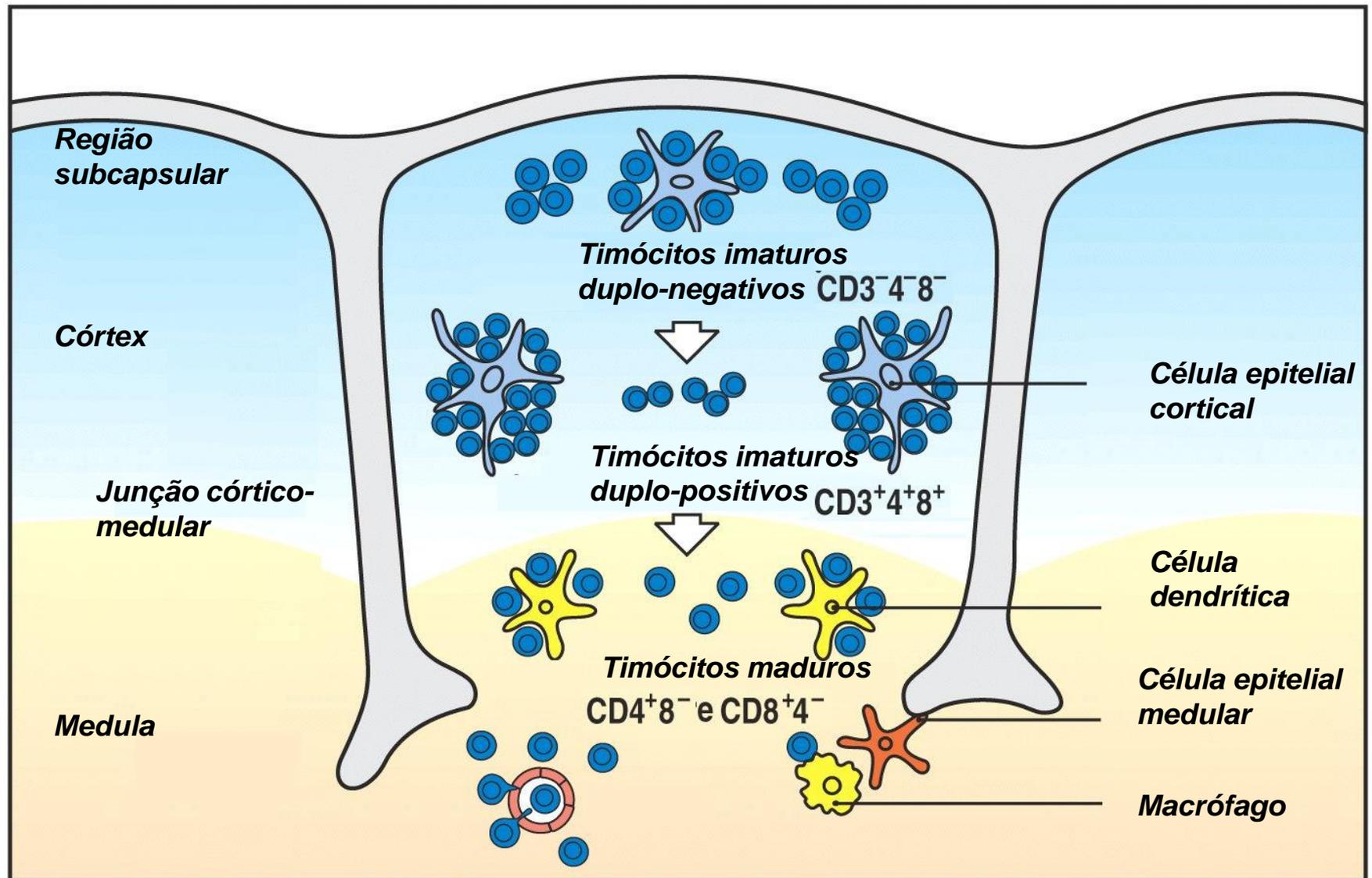
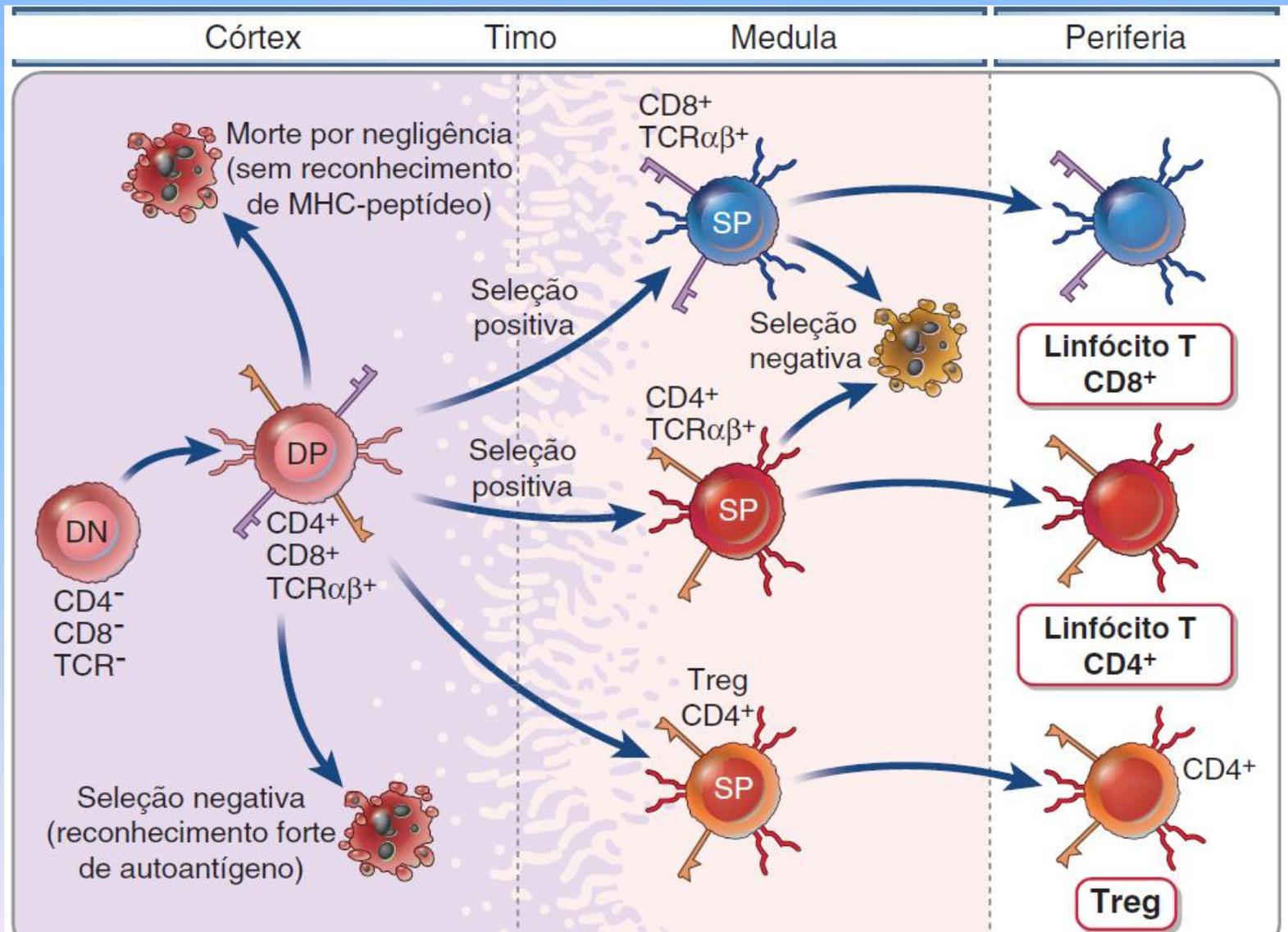


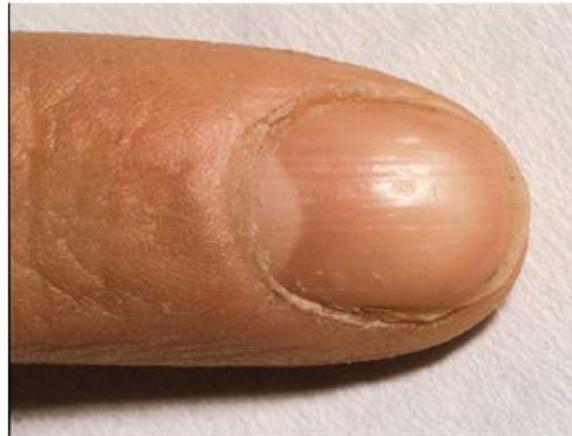
Figure 7-14 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Visão Geral do Desenvolvimento dos Linfócitos T



# ***Imunodeficiências podem causar autoimunidade***

## ***Mutações no gene AIRE***



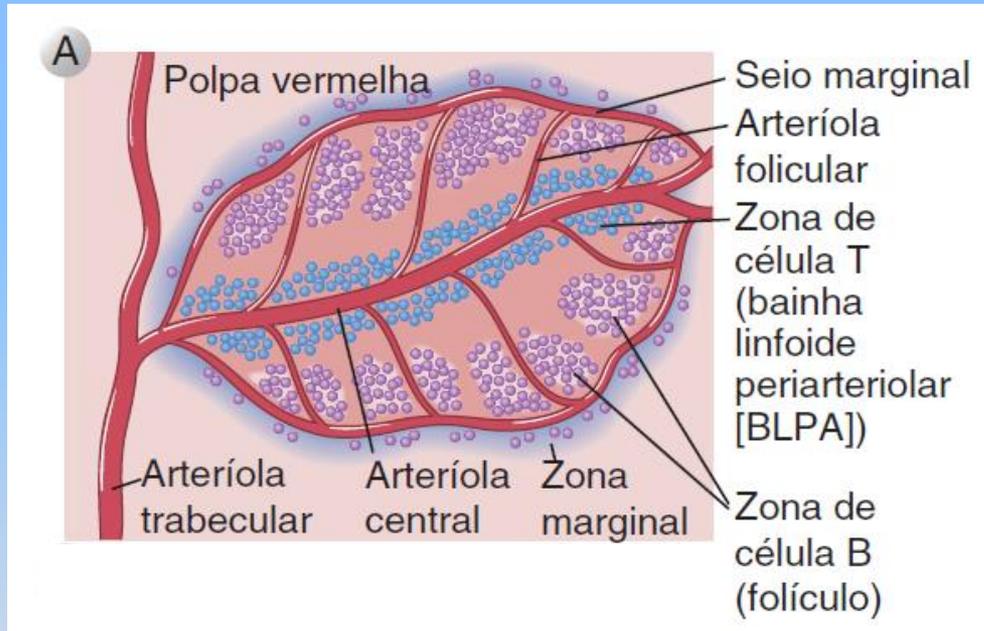
©Therapia Fennica / Kandiapattikustannus OY

[http://therapiafennica.fi/wiki/images/1/17/TFA\\_2007.jpg](http://therapiafennica.fi/wiki/images/1/17/TFA_2007.jpg)

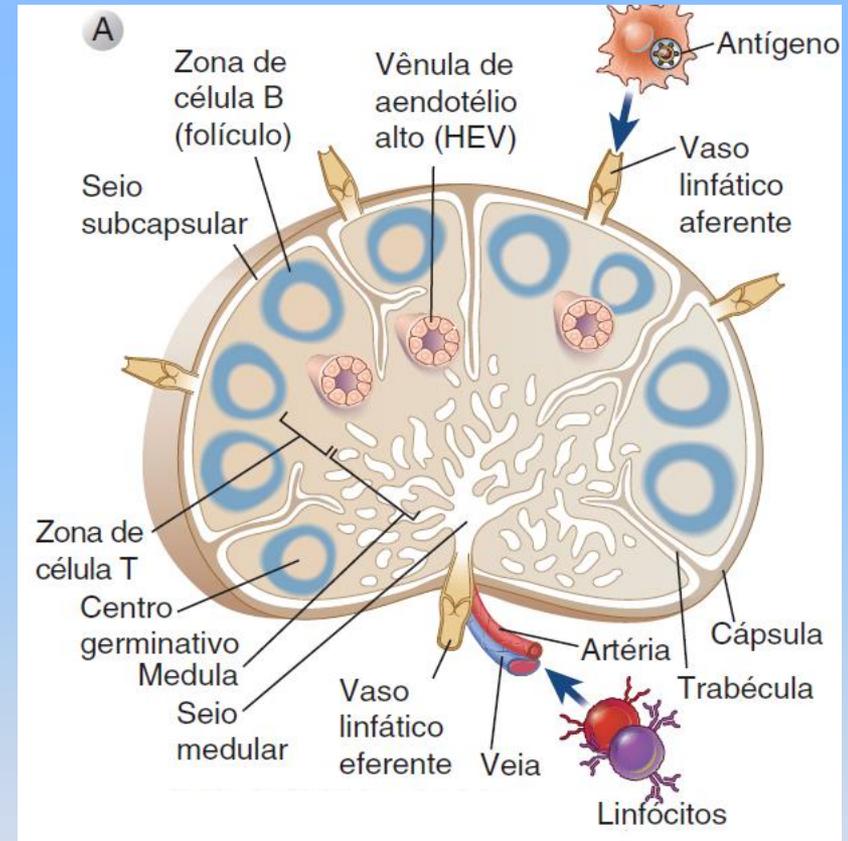
[http://dermatology-s10.cdlib.org/1603/case\\_presentations/aps\\_child/1.jpg](http://dermatology-s10.cdlib.org/1603/case_presentations/aps_child/1.jpg)

***Poliendocrinopatia autoimune associada à candidíase e distrofia ectodérmica (APECED)***

# Órgãos Linfóides secundários (periféricos)

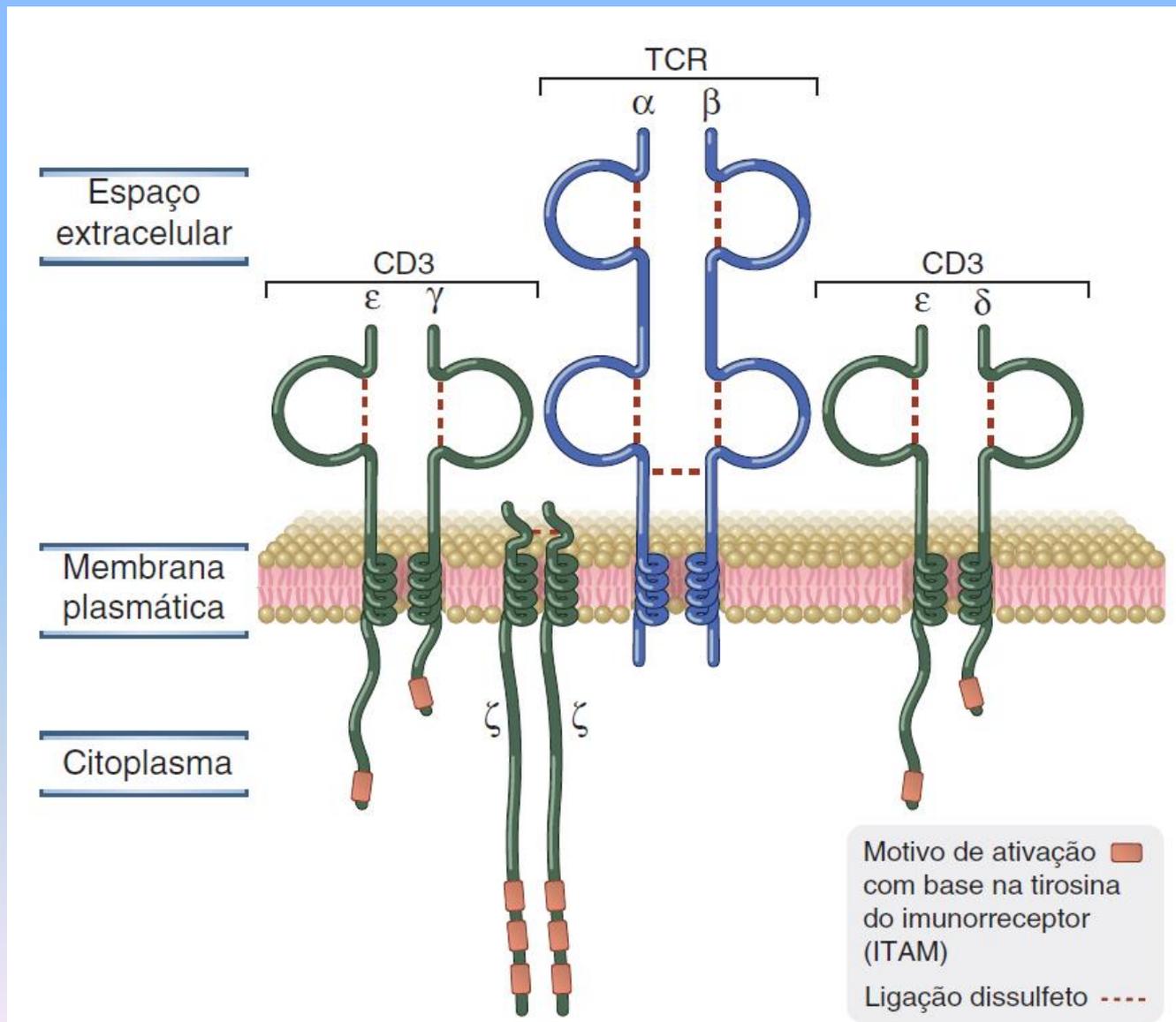


**Polpa branca do baço**

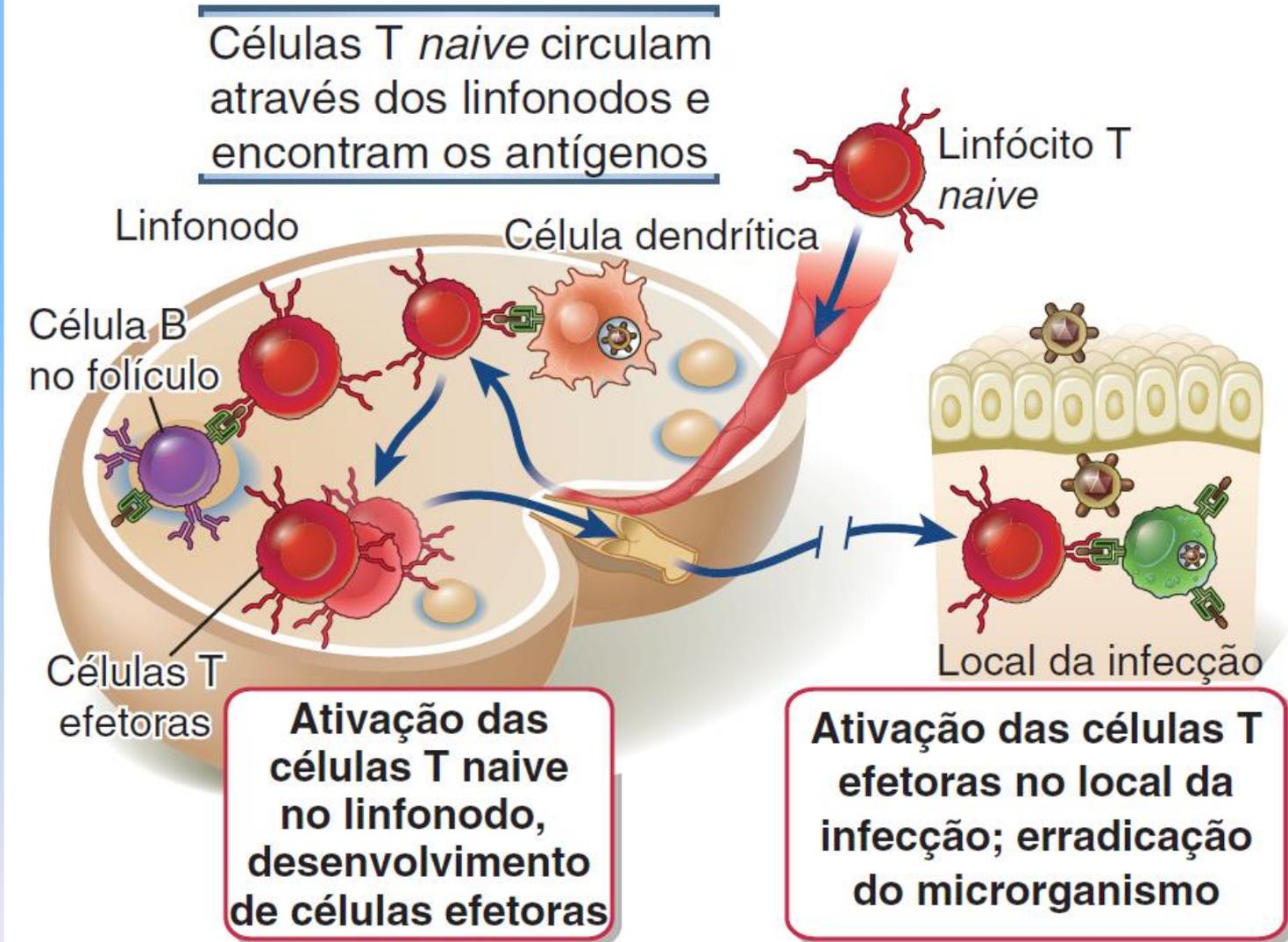


**Linfonodos**

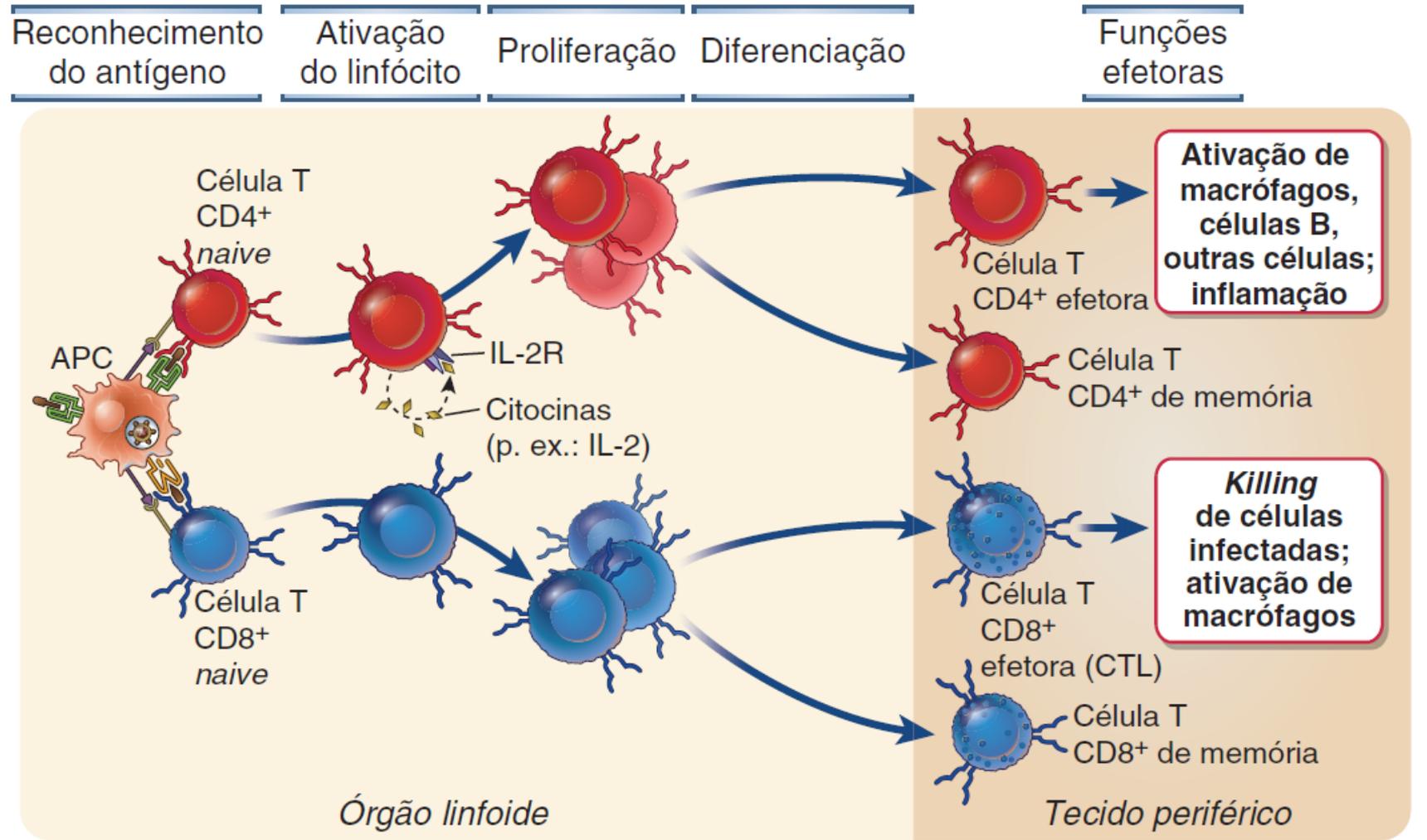
# Linfócitos T : complexo TCR / CD3 / cadeia zeta



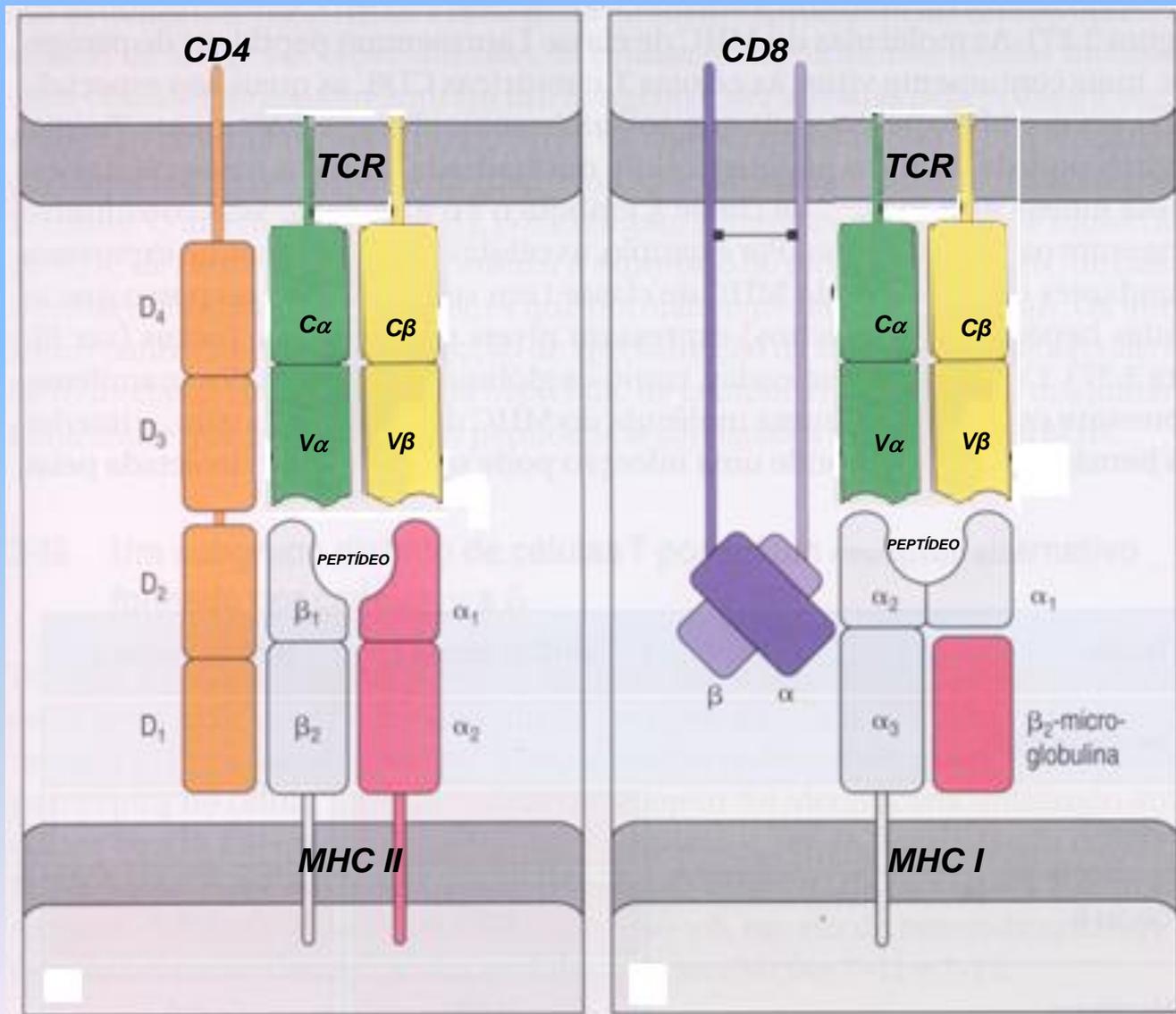
# Ativação dos Linfócitos T nos Linfonodos



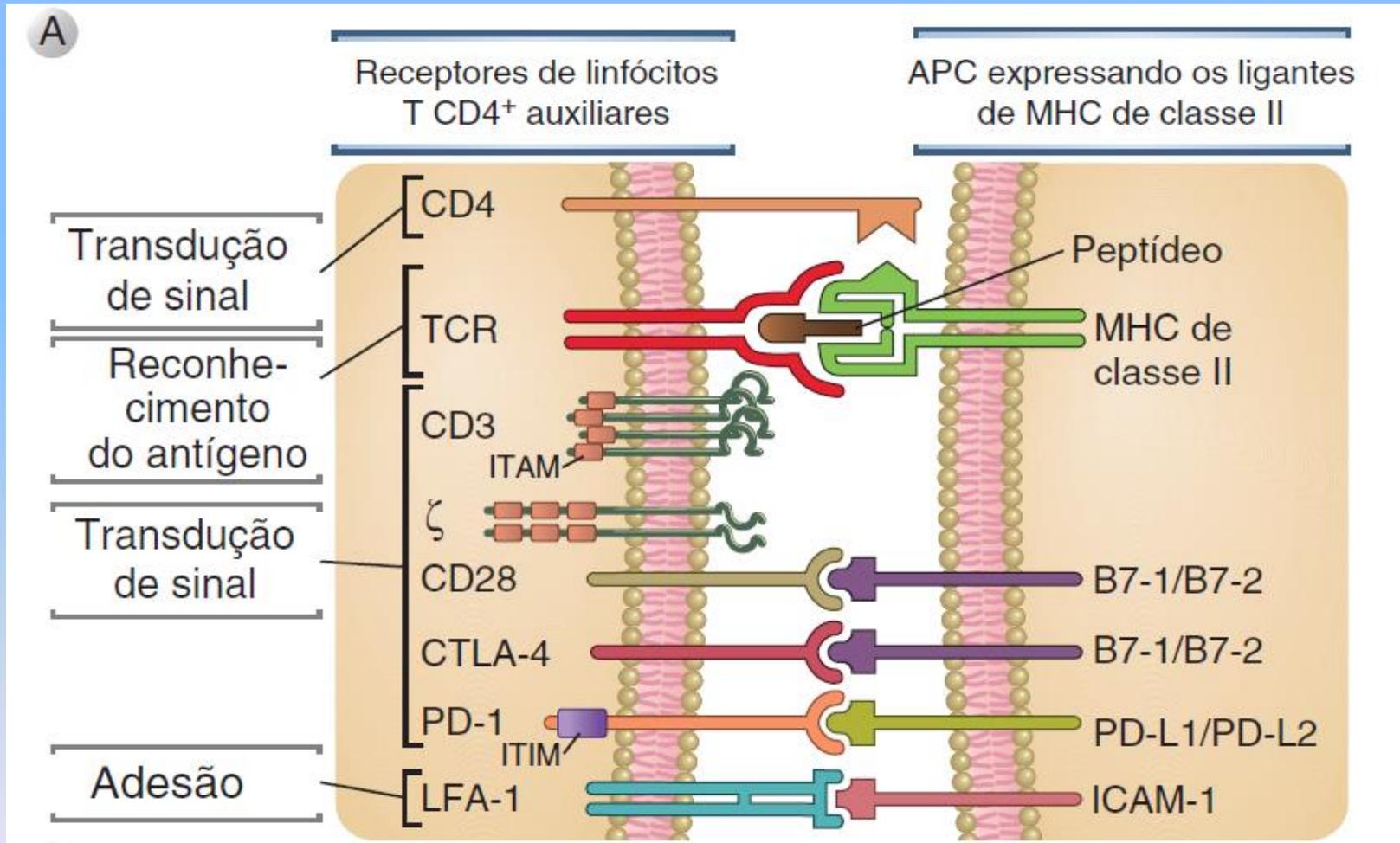
# Sequência de eventos nas respostas de células T



# Ligação MHC-peptídeos / TCR-CD4 ou CD8



# TCR e Moléculas Acessórias

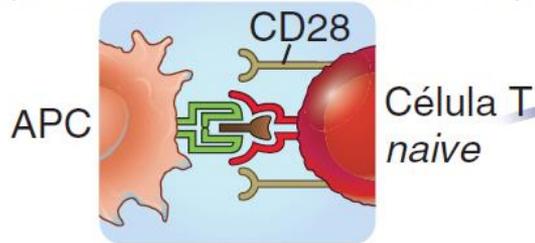


# Moléculas Co-Estimuladoras: 2º sinal

## Reconhecimento do antígeno

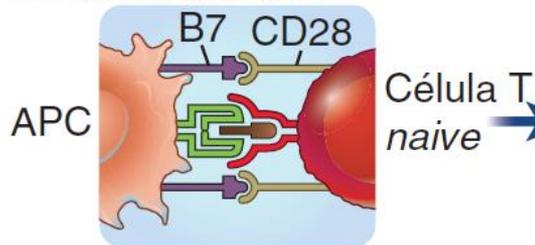
## Resposta da célula T

- A APC não ativada  
(deficiente em coestimulador)



Ausência de resposta  
ou tolerância

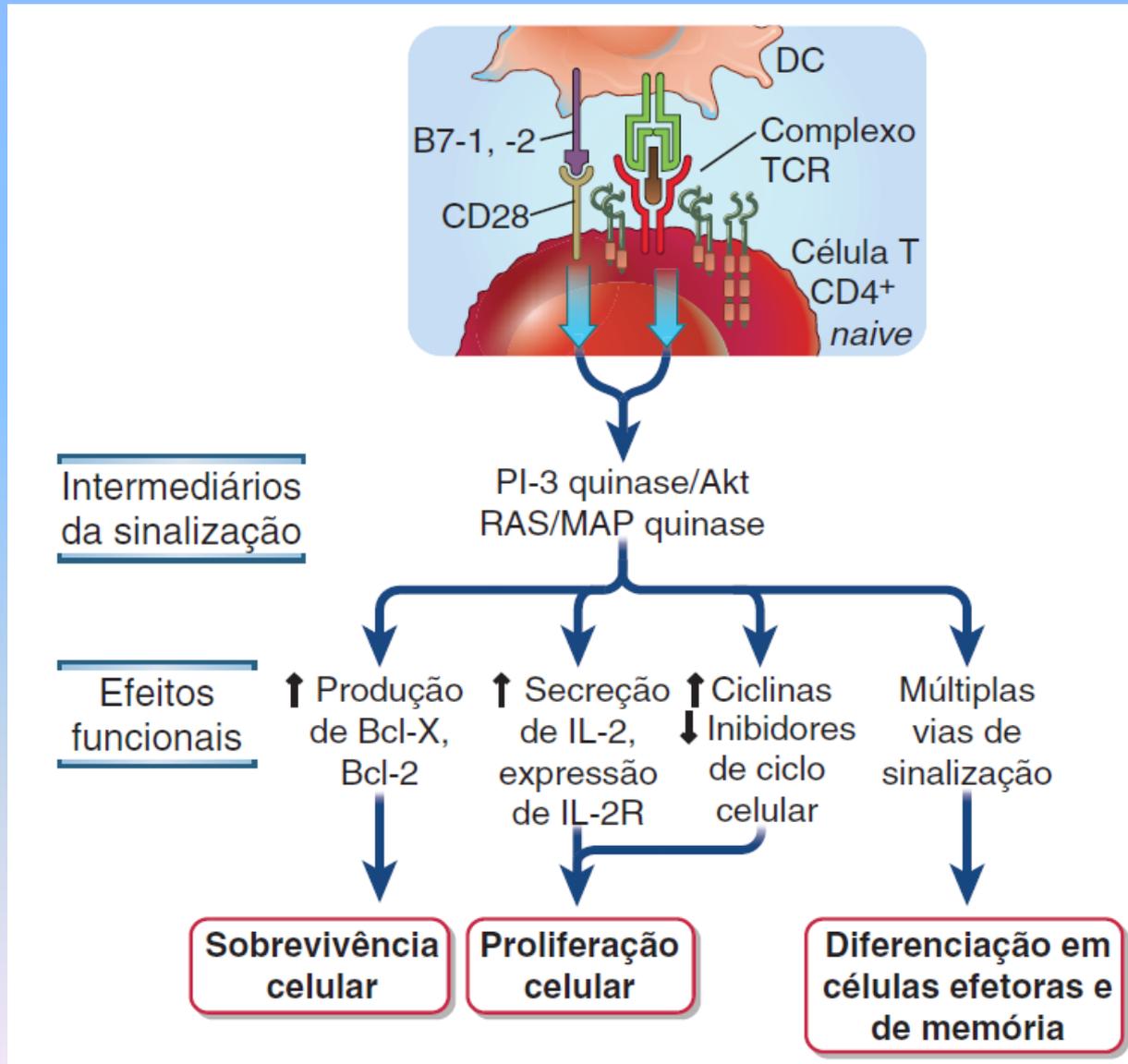
- B APC ativada por microrganismos,  
respostas imunes inatas:  
expressão aumentada  
de coestimuladores



Células T  
efetoras

Sobrevivência da  
célula T, proliferação  
e diferenciação

# Mecanismos de coestimulação pelo CD28

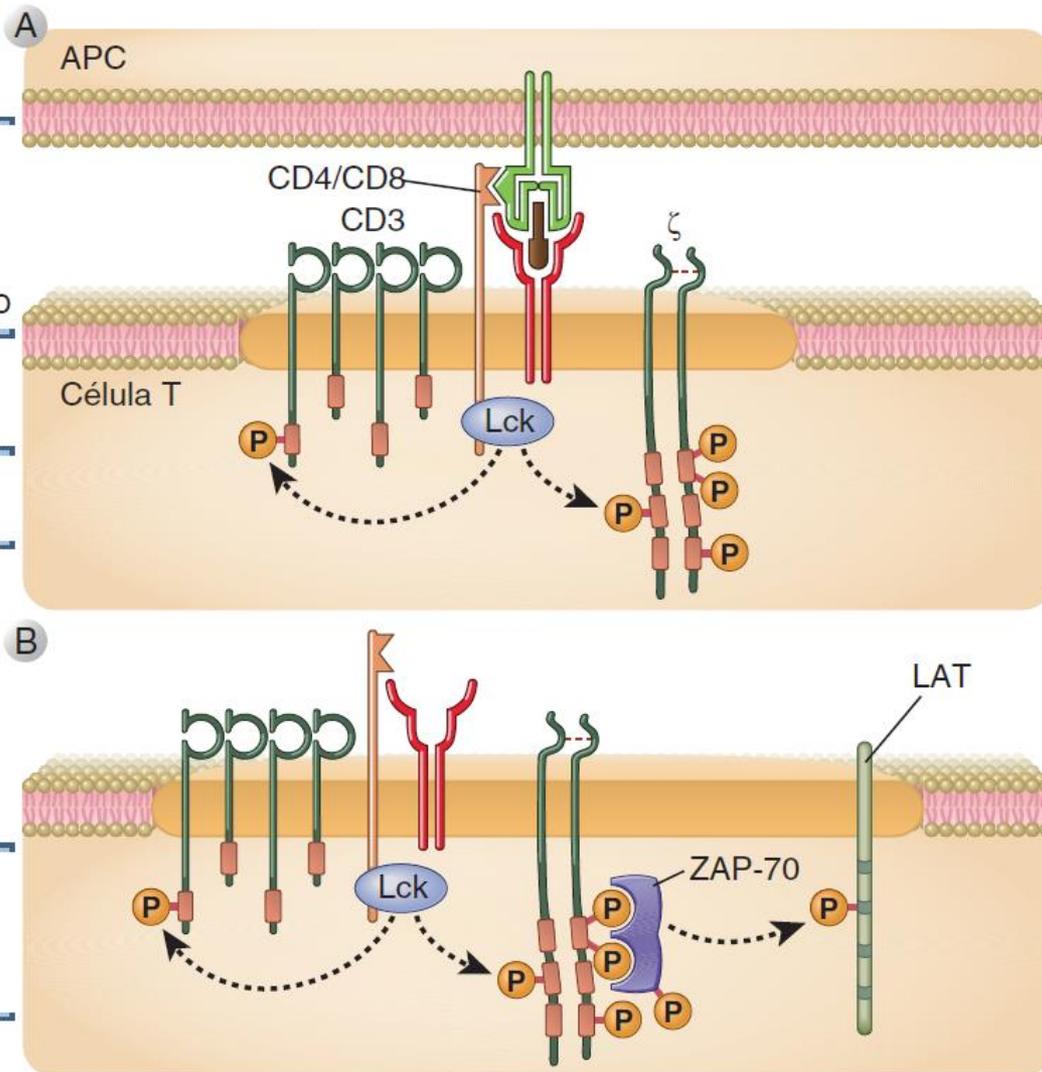


# Eventos Iniciais da Ativação dos Linfócitos

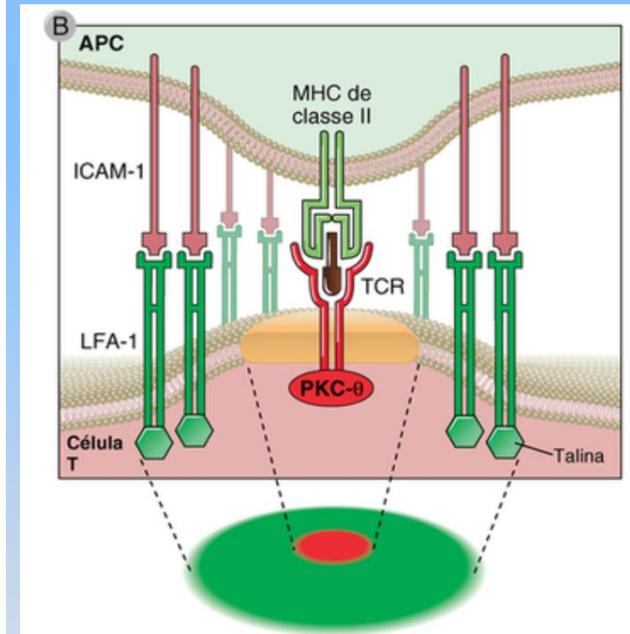
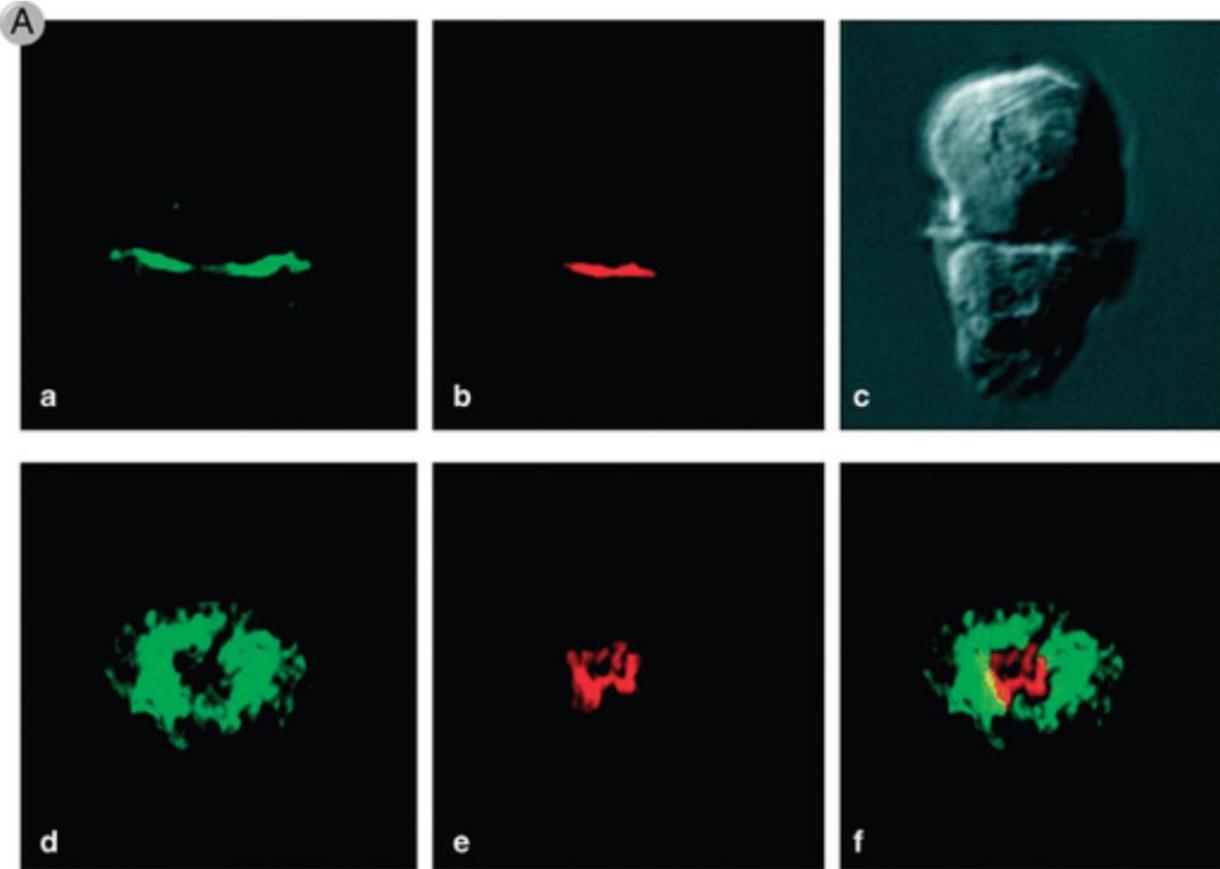
Complexo TCR e correceptores são agrupados no interior das balsas lipídicas pelo reconhecimento antigênico

Lck fosforila tirosinas nos ITAMs

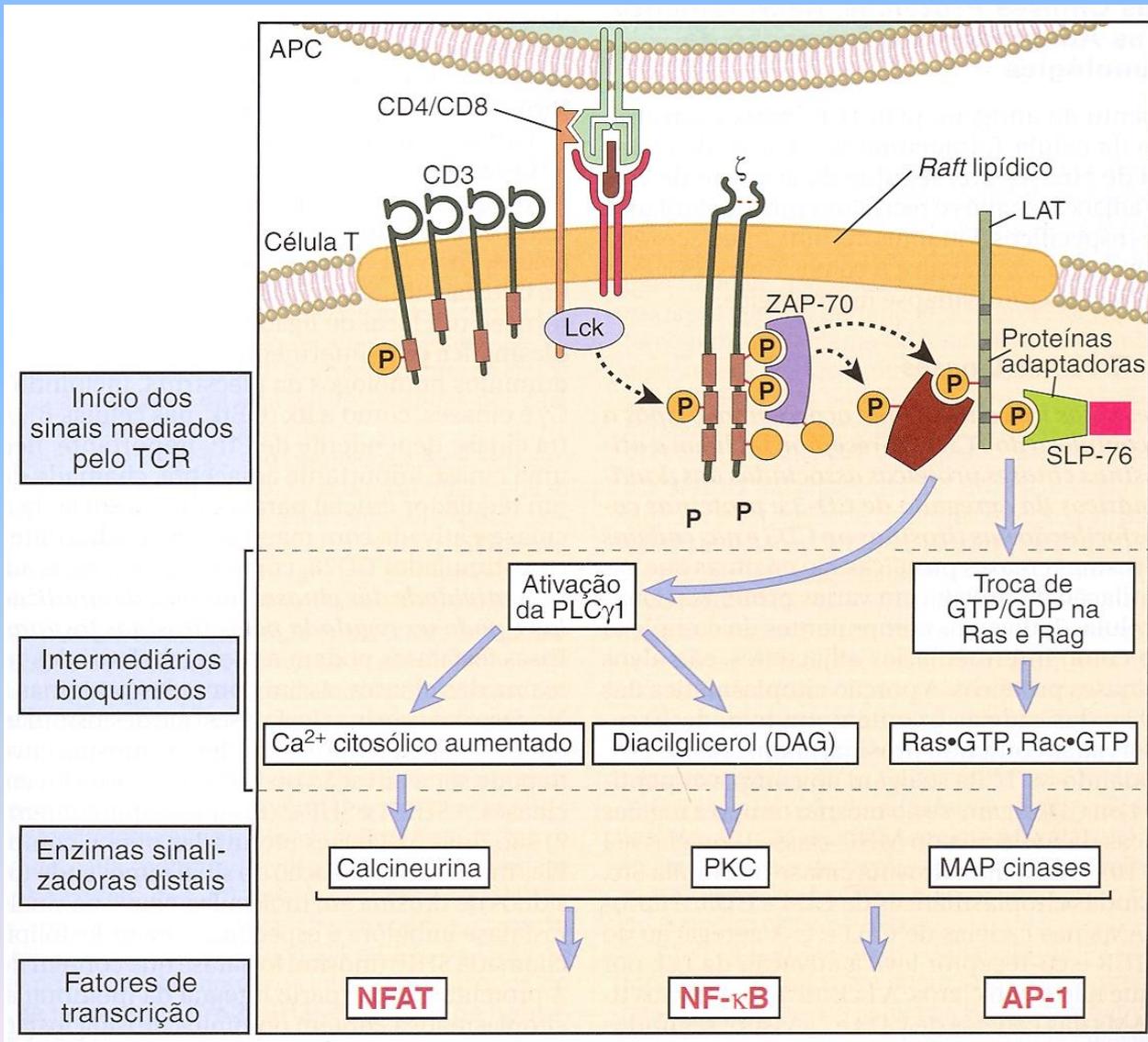
ZAP-70 se liga a fosfotirosinas e fosforila proteínas adaptadoras, incluindo LAT



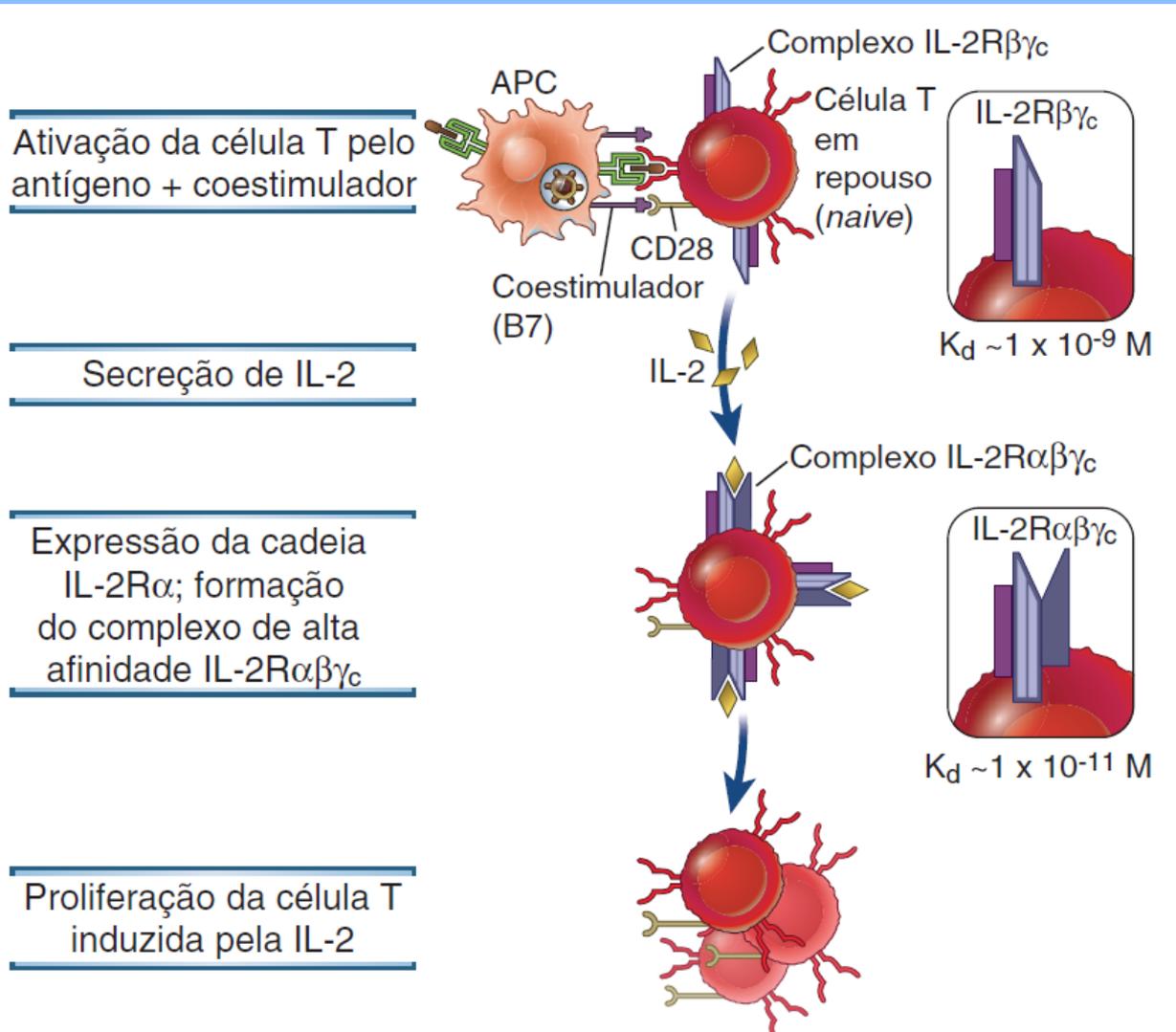
# *Sinapse Imunológica* *(Agregado de Ativação Supramolecular)*



# Ativação de Fatores de Transcrição

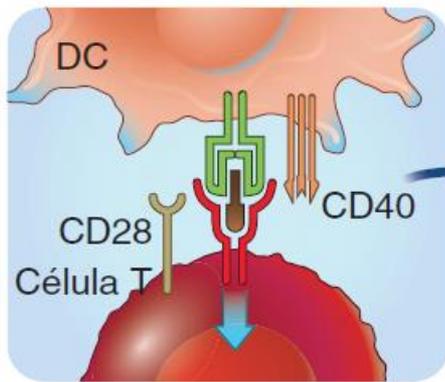


# IL-2: citocina responsável pela proliferação

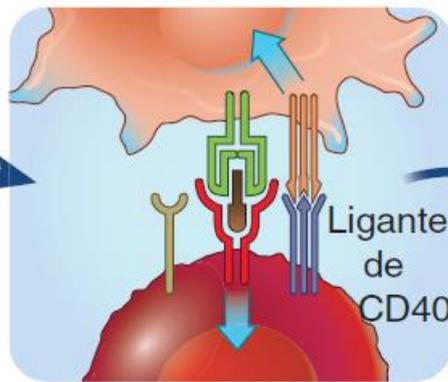


# Expressão de CD40: licenciamento

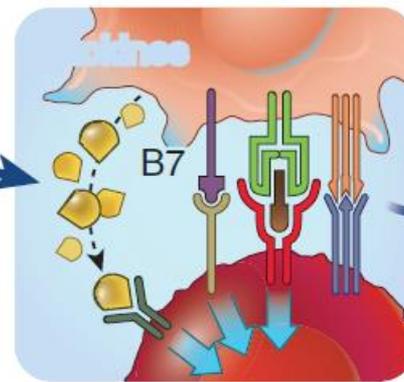
Células T reconhecem o antígeno (com ou sem coestimuladores B7)



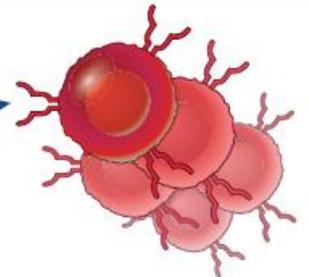
CD40L é expresso em células T e se liga ao CD40 na DC; leva à ativação da DC



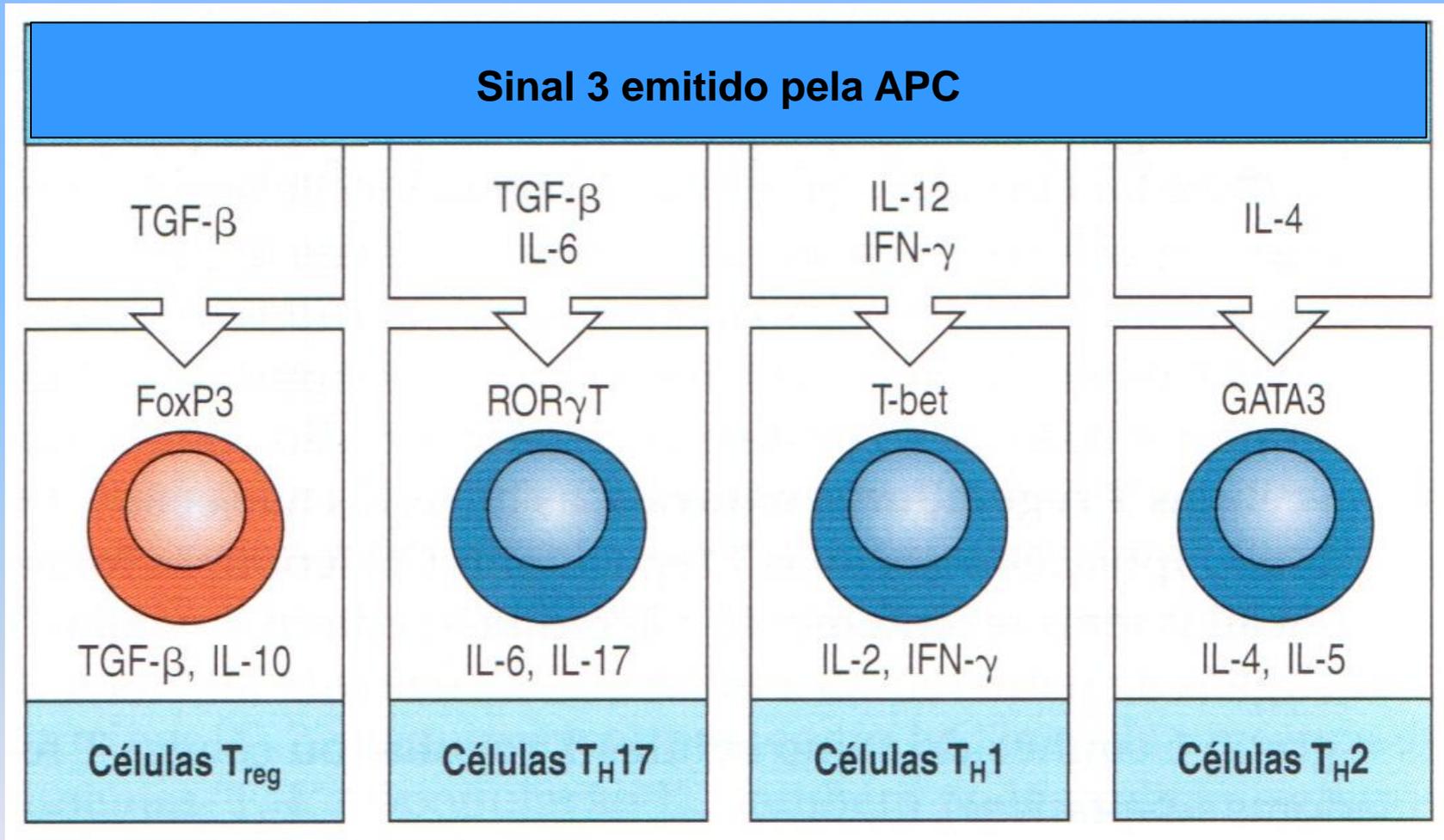
DC expressa B7 e secreta citocinas, as quais aumentam a ativação da célula T



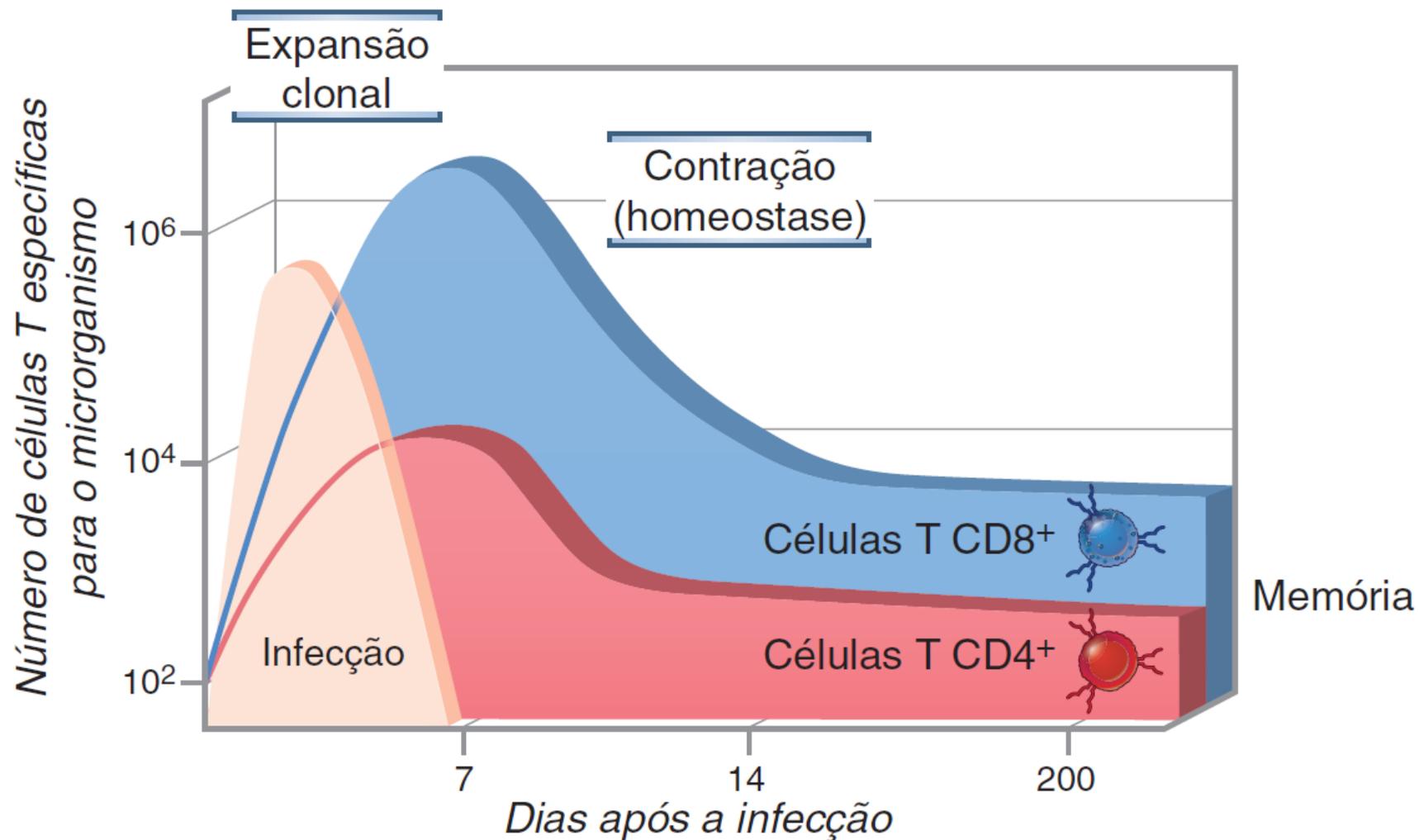
**Aumento da proliferação e diferenciação das células T**



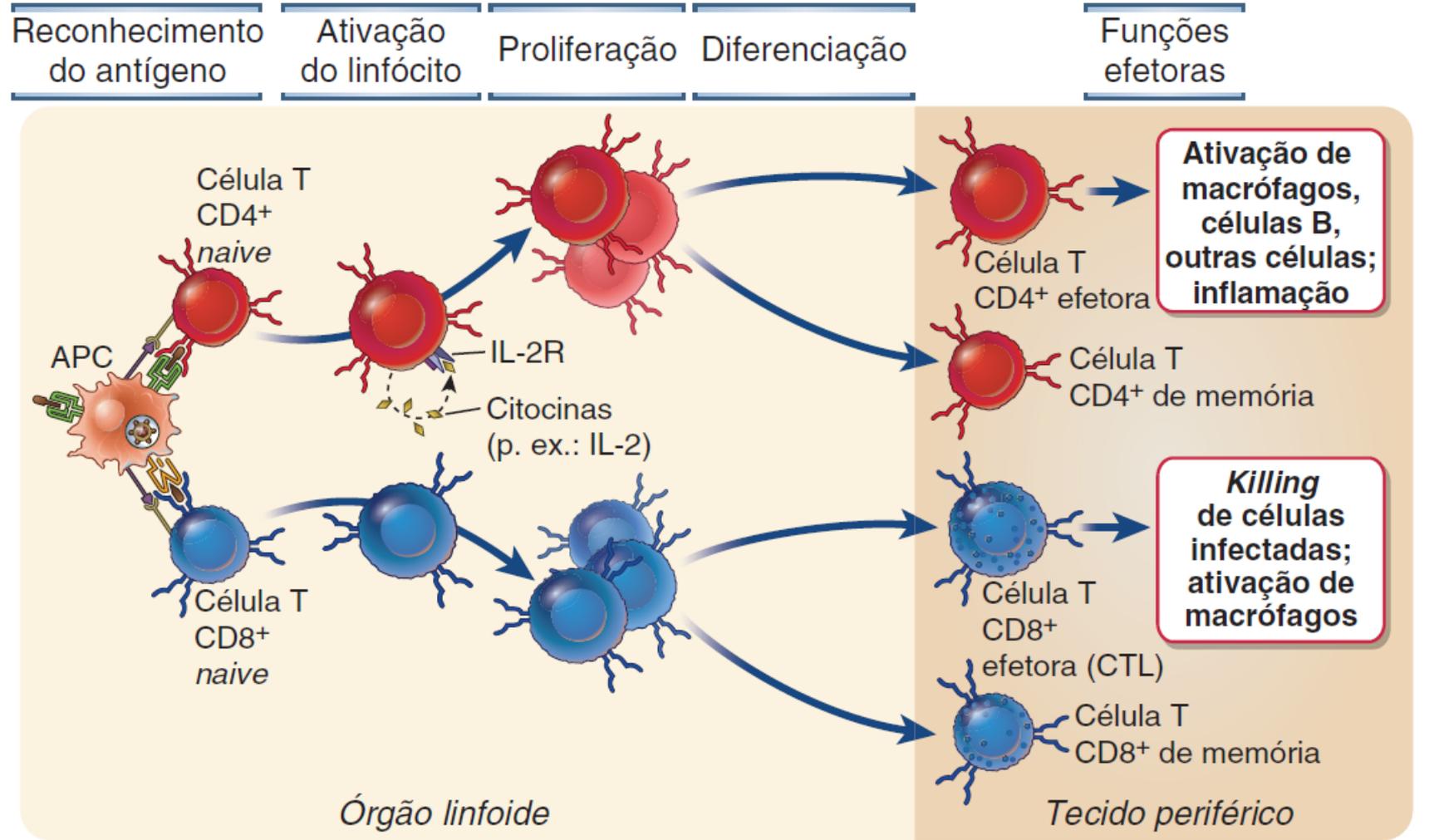
# Citocinas: “3<sup>o</sup> sinal”



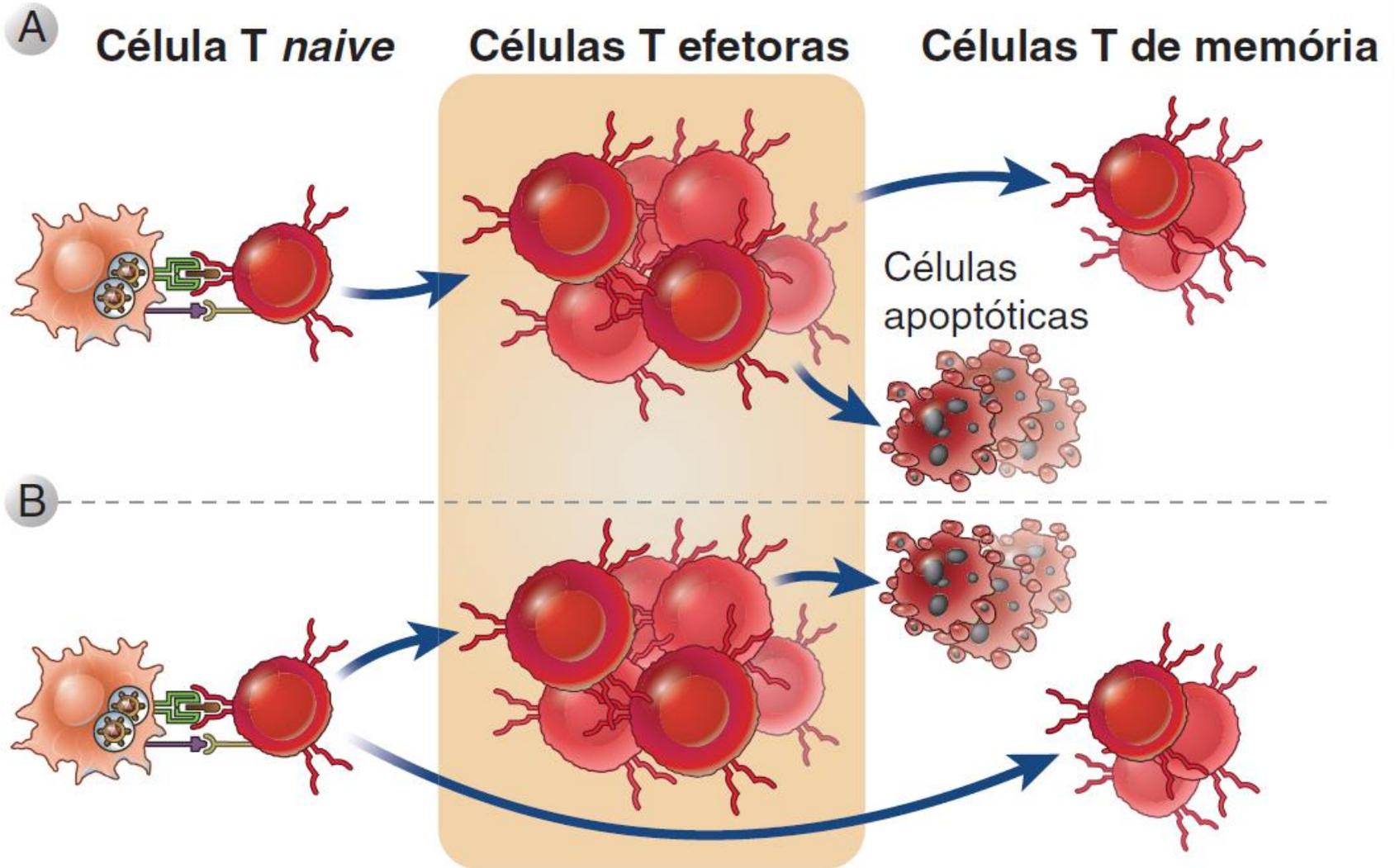
# Dinâmica das Respostas de Células T



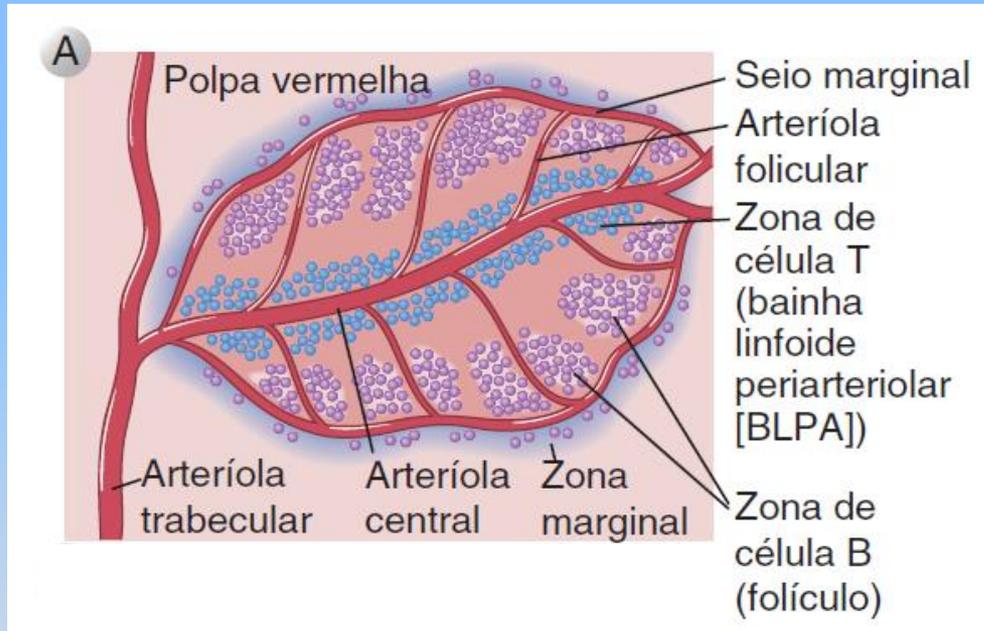
# Sequência de eventos nas respostas de células T



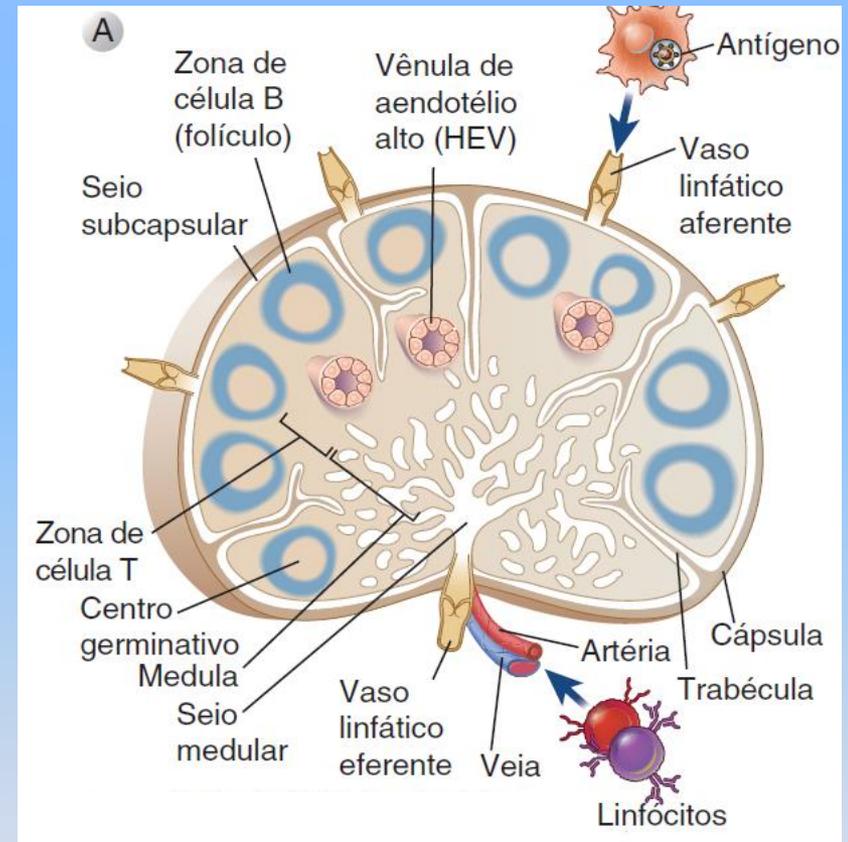
# Memória Imunológica: hipóteses



# Órgãos Linfóides secundários (periféricos)

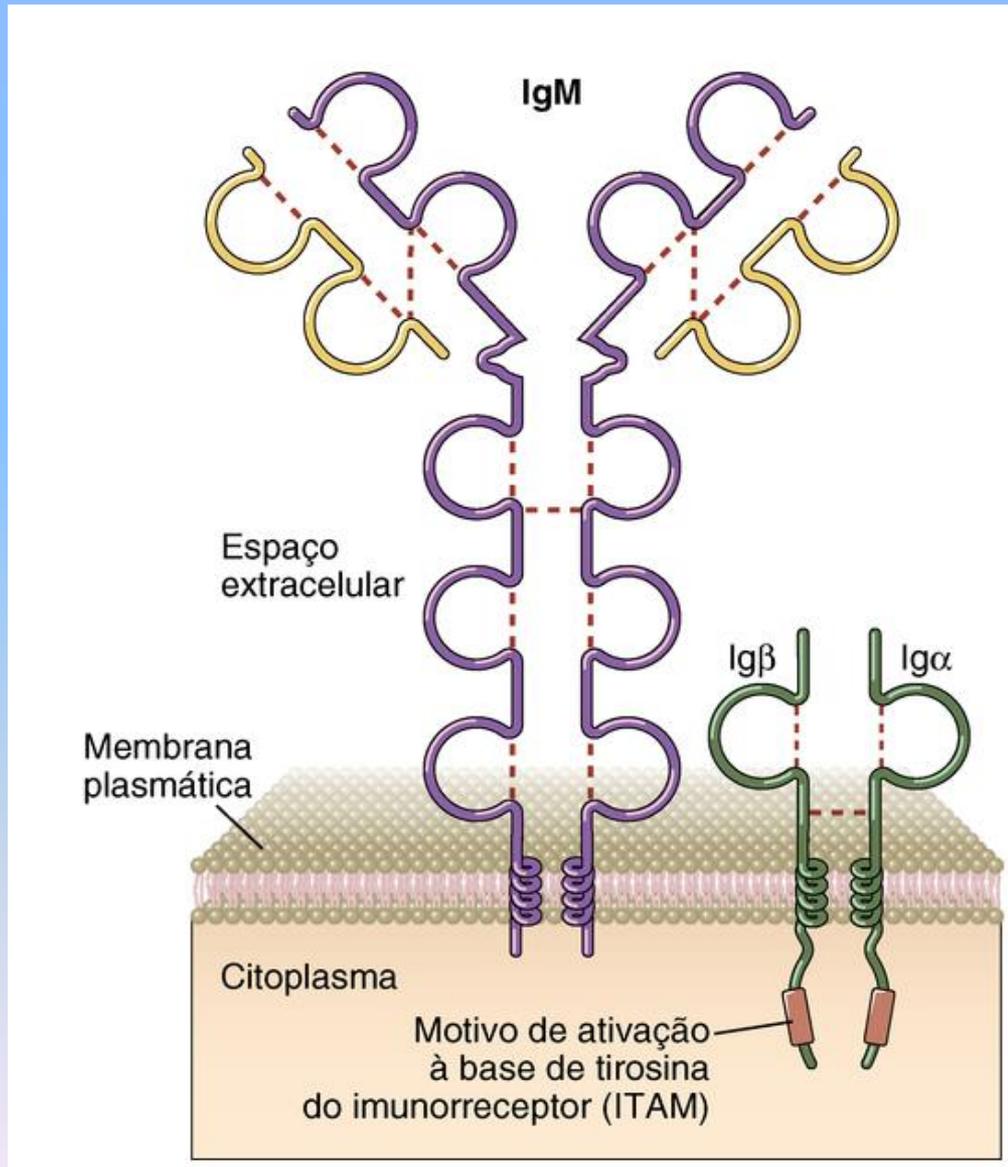


**Polpa branca do baço**

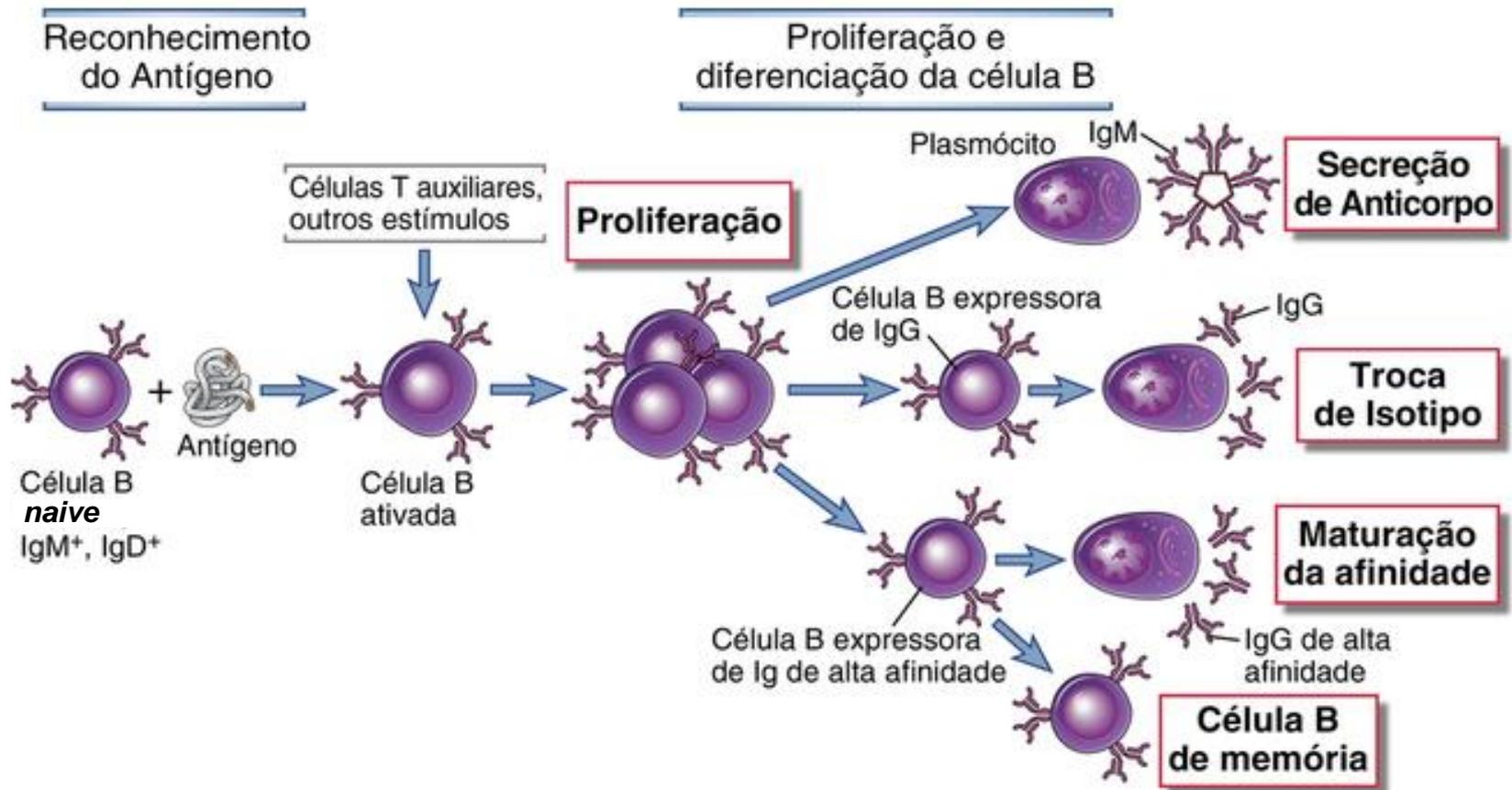


**Linfonodos**

# **Linfócitos B : complexo BCR / $Ig\alpha$ / $Ig\beta$**

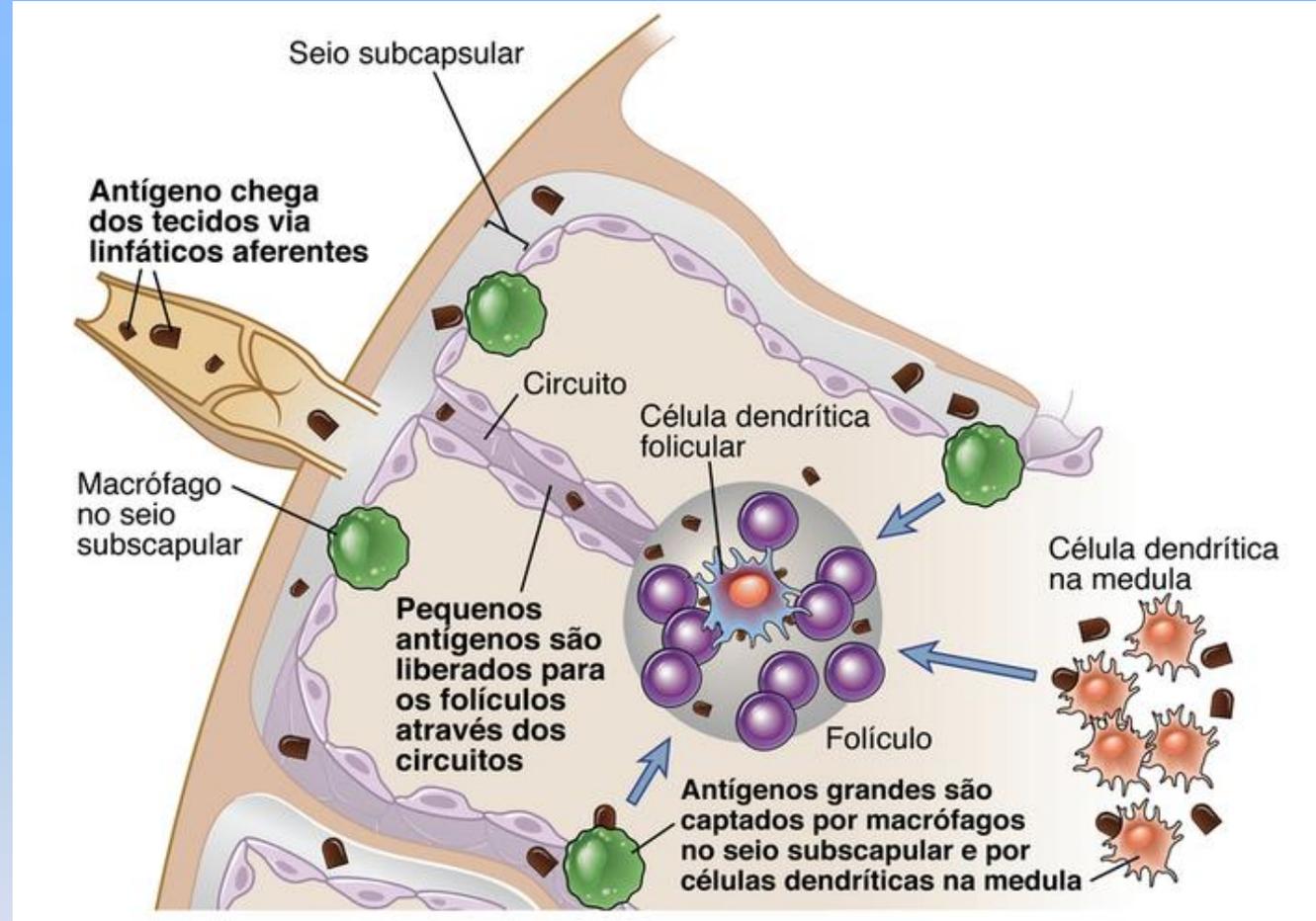
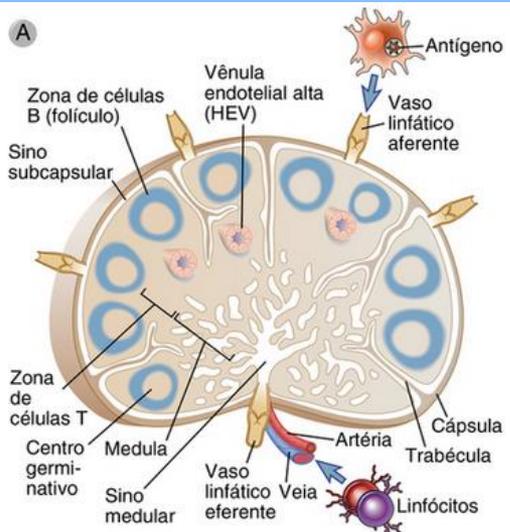


# Fases da Resposta de Linfócitos B



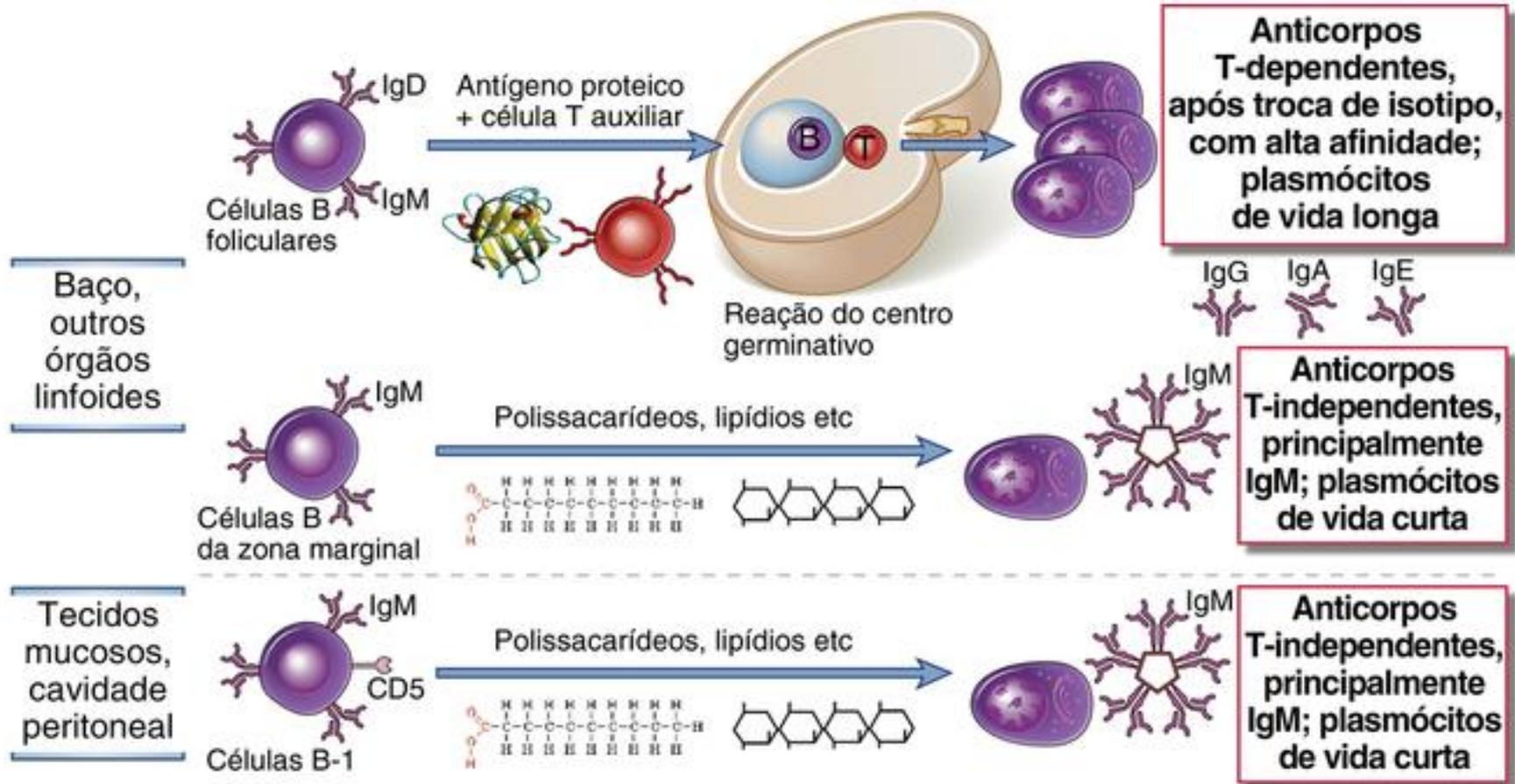
- **1 único linfócito B gera 5000 clones em 1 semana**
- **Esses clones produzem  $10^{12}$  moléculas de anticorpos por dia**

# Vias de acesso do antígeno a células B foliculares

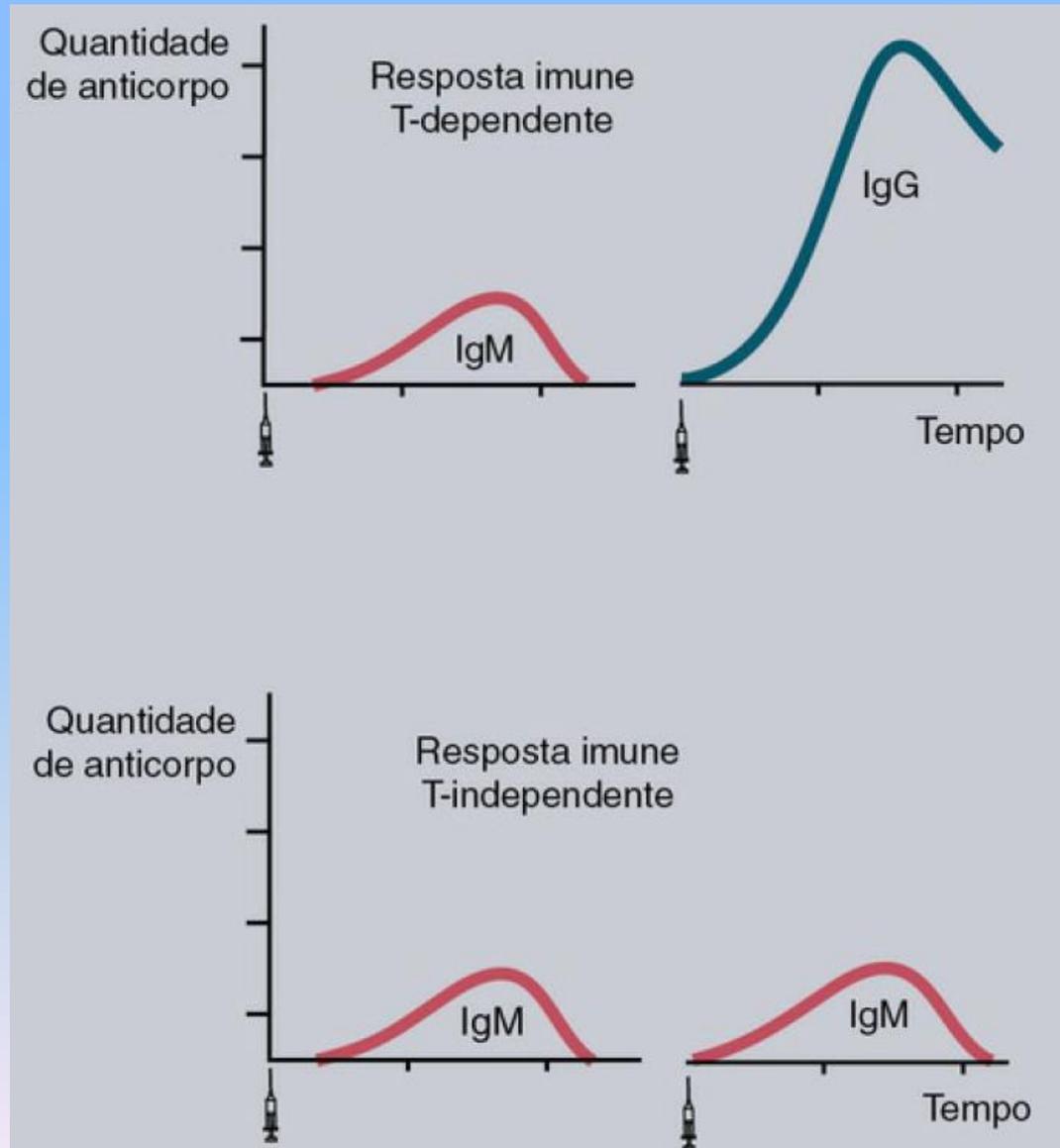


- **Células dendríticas foliculares e estroma folicular produzem CXCL13: liga CXCR5**
- **Antígenos solúveis (menores que 70 kDa): alcançam folículos diretamente**
- **Antígenos grandes ou microorganismos: capturados por outras células**

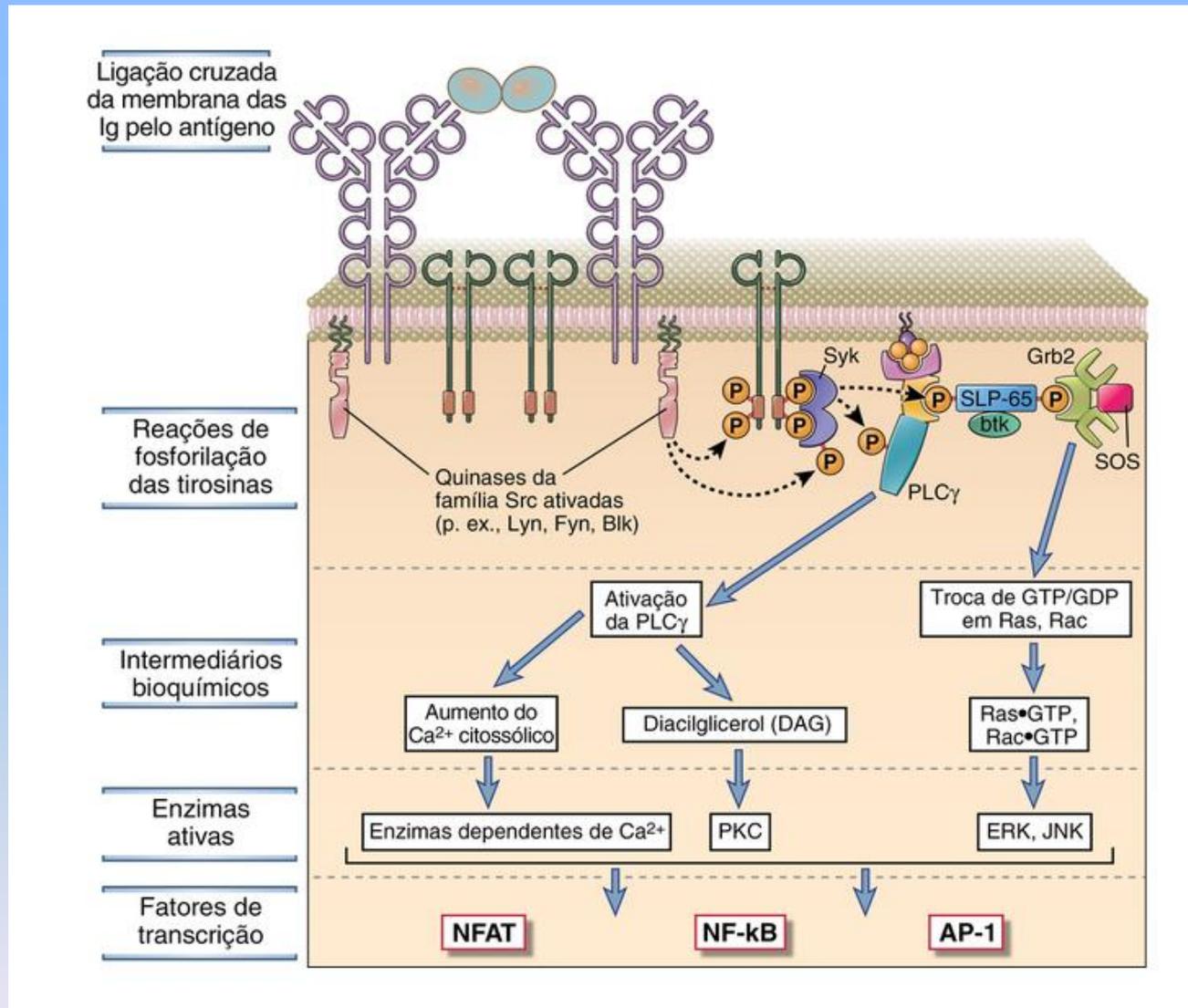
# Subpopulações de Linfócitos B são Ativadas de Maneiras Diferentes



# Ativação T-independente e T-dependente

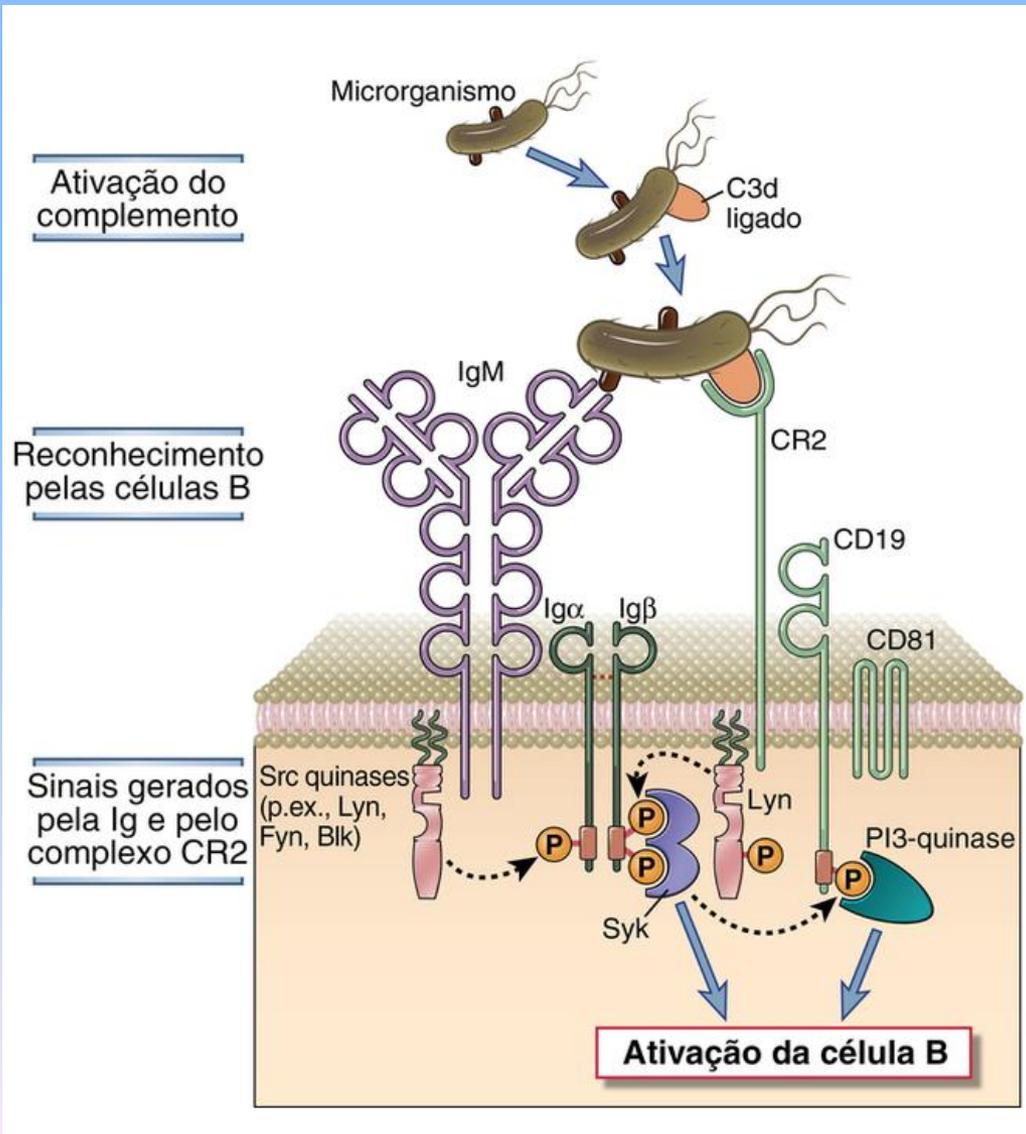


# Ativação T-independente dos Linfócitos B



Ativação de linfócitos B leva a diferentes vias de sinalização intracelular

# Papel do Complemento na Ativação dos Linfócitos B



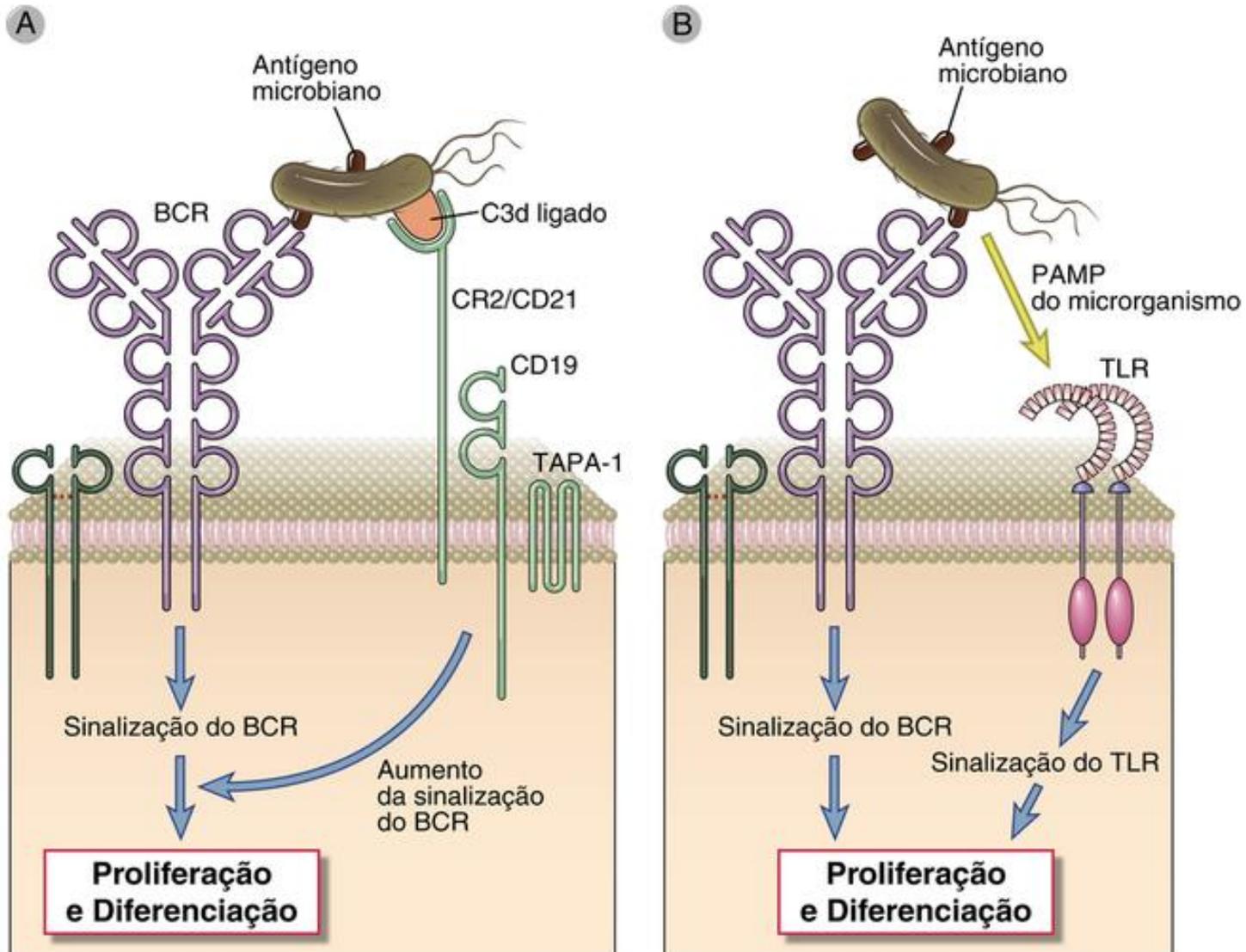
- **CR2 (CD21):** receptor de CD3d

- **Complexo CD19-CD21-CD81:** co-receptor

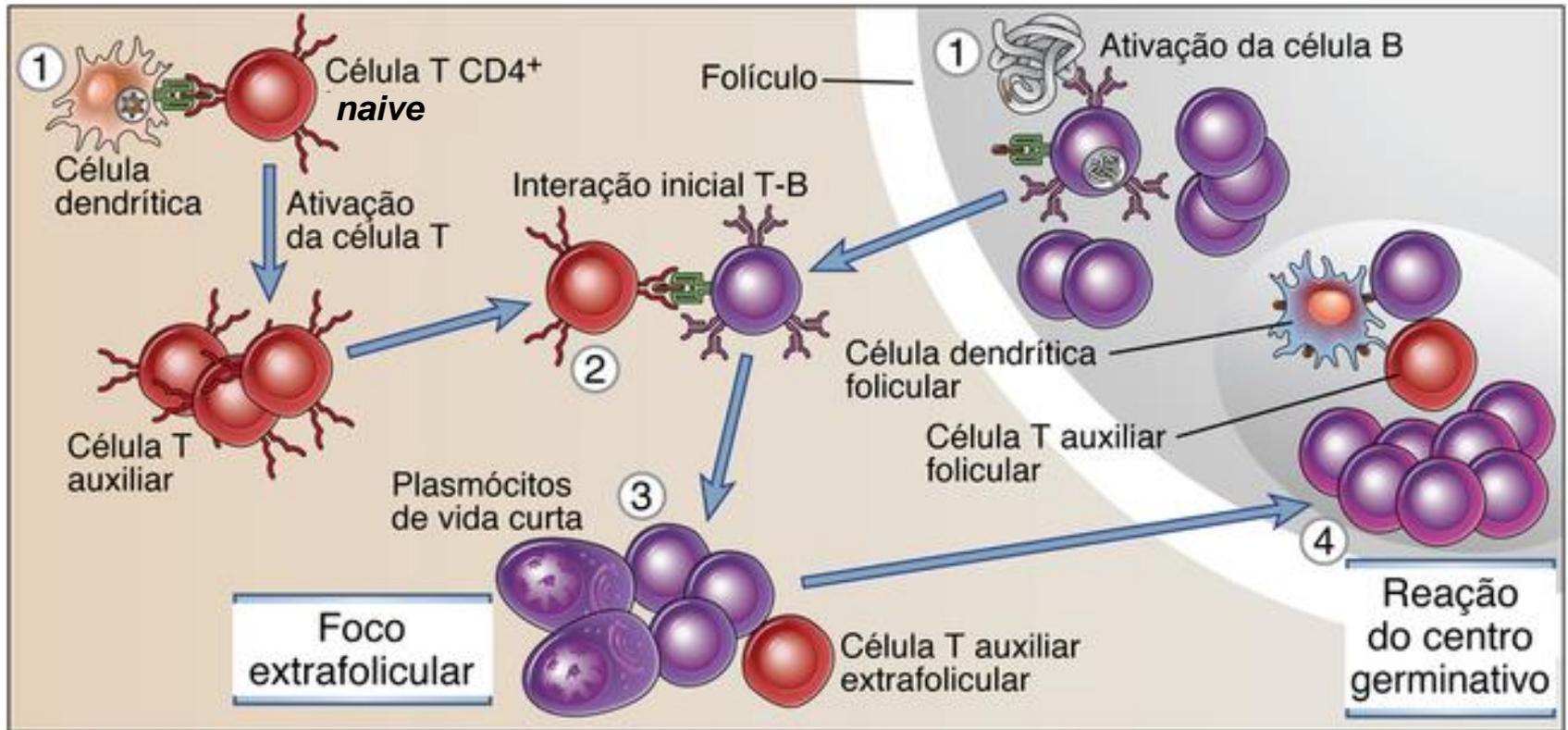
- **Ligação de CD3d ao antígeno aumenta em pelo menos 1000 vezes a imunogenicidade do antígeno**

- **Defeitos em CD21, CD19 ou CD81 resulta em defeitos na produção de anticorpos**

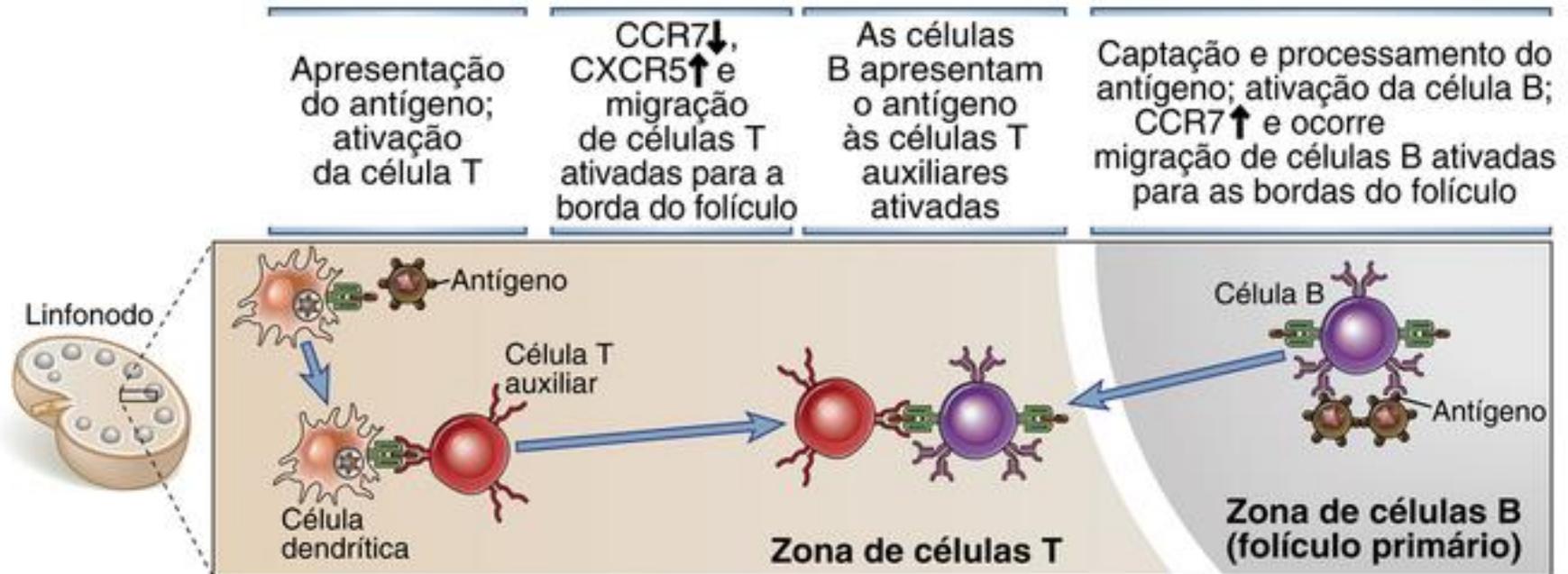
# Papel do TLR na Ativação dos Linfócitos B



# Ativação T-dependente dos Linfócitos B



# Importância das Quimiocinas para as Interações B:T

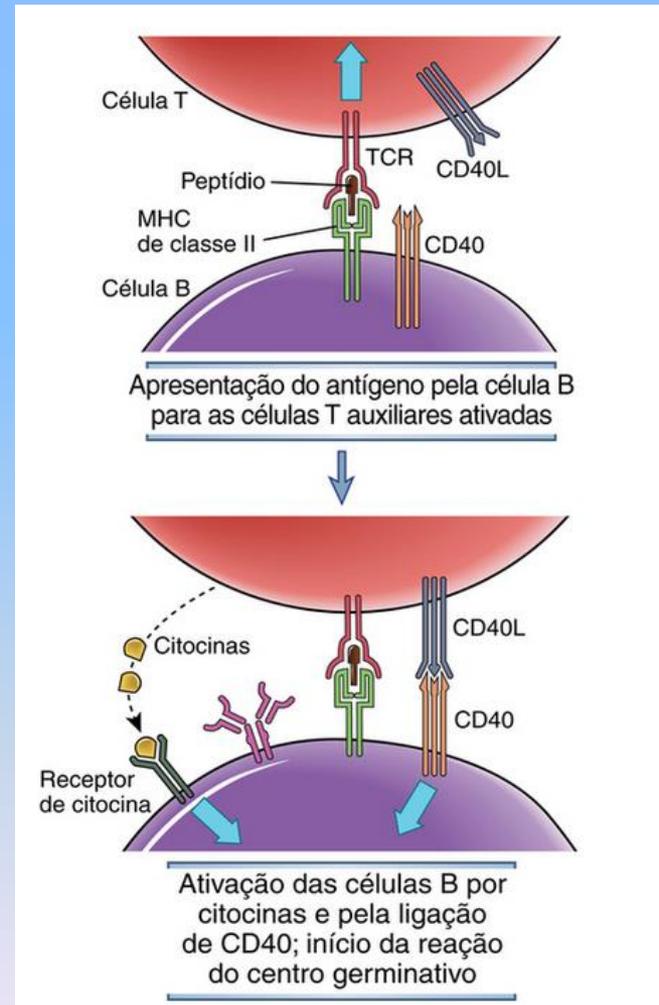
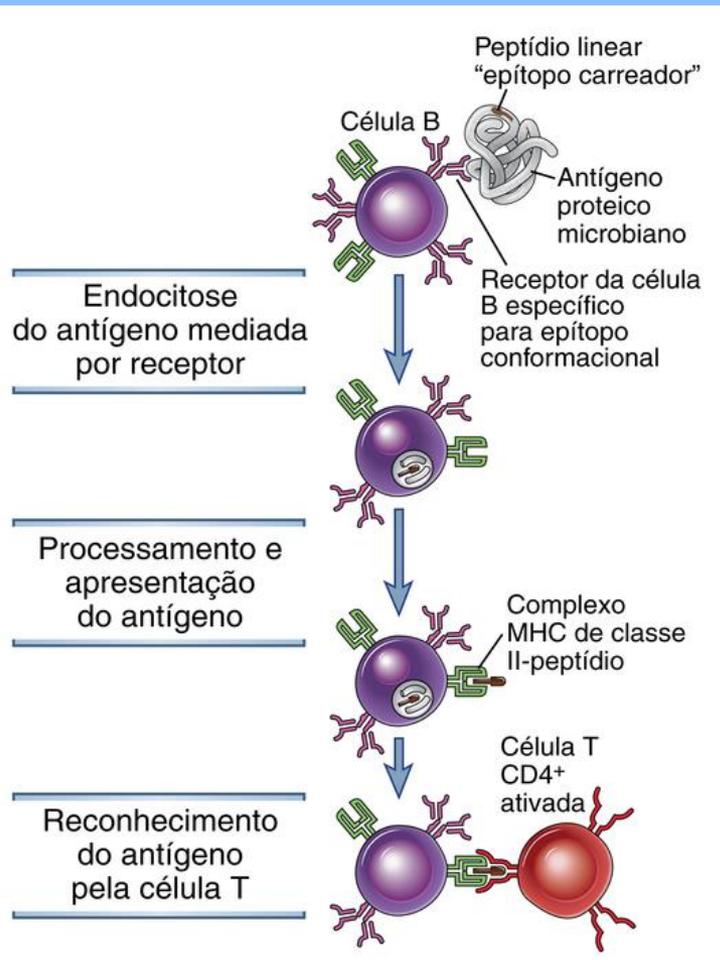


- **CXCL13: liga CXCR5**
- **CCL19 e CCL21: ligam CCR7**



IV\_10\_8\_Germinal\_Centers.swf

# Apresentação de Antígenos pelos Linfócitos B



# Troca de isotipo (“switch” de classe)

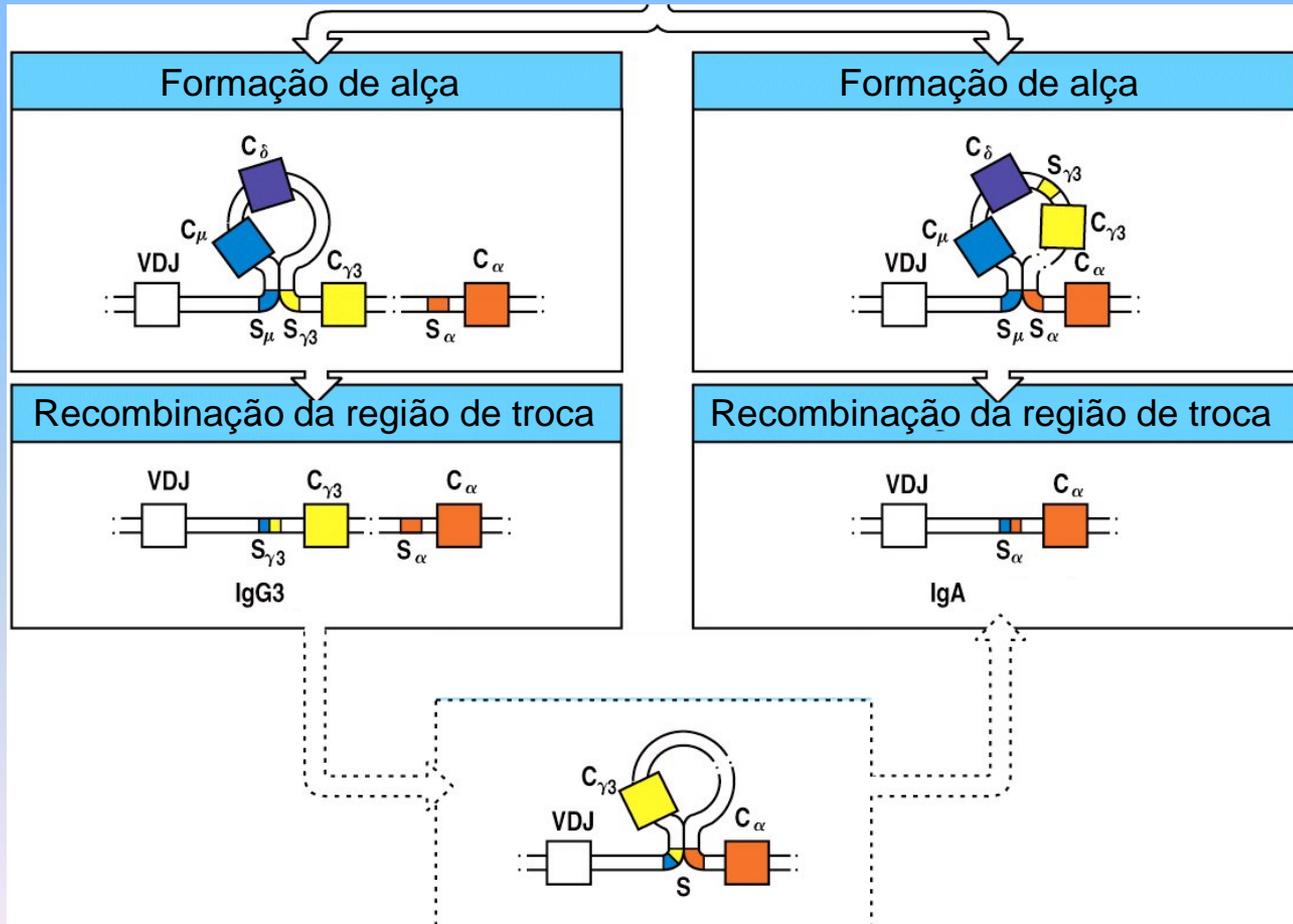
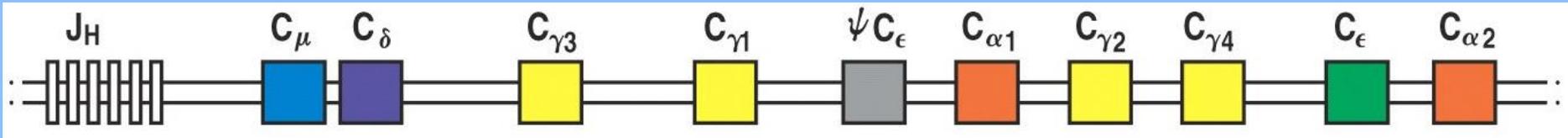
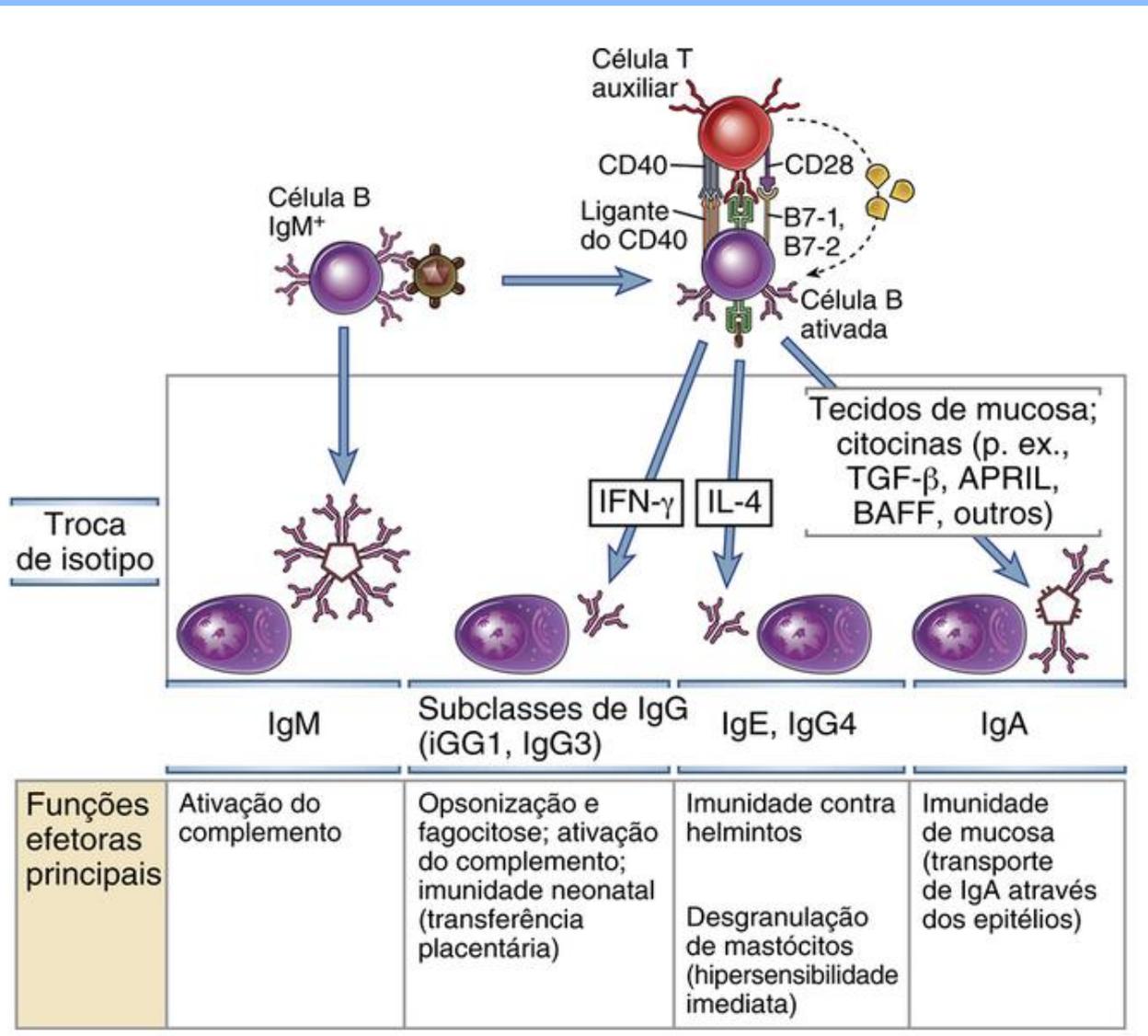
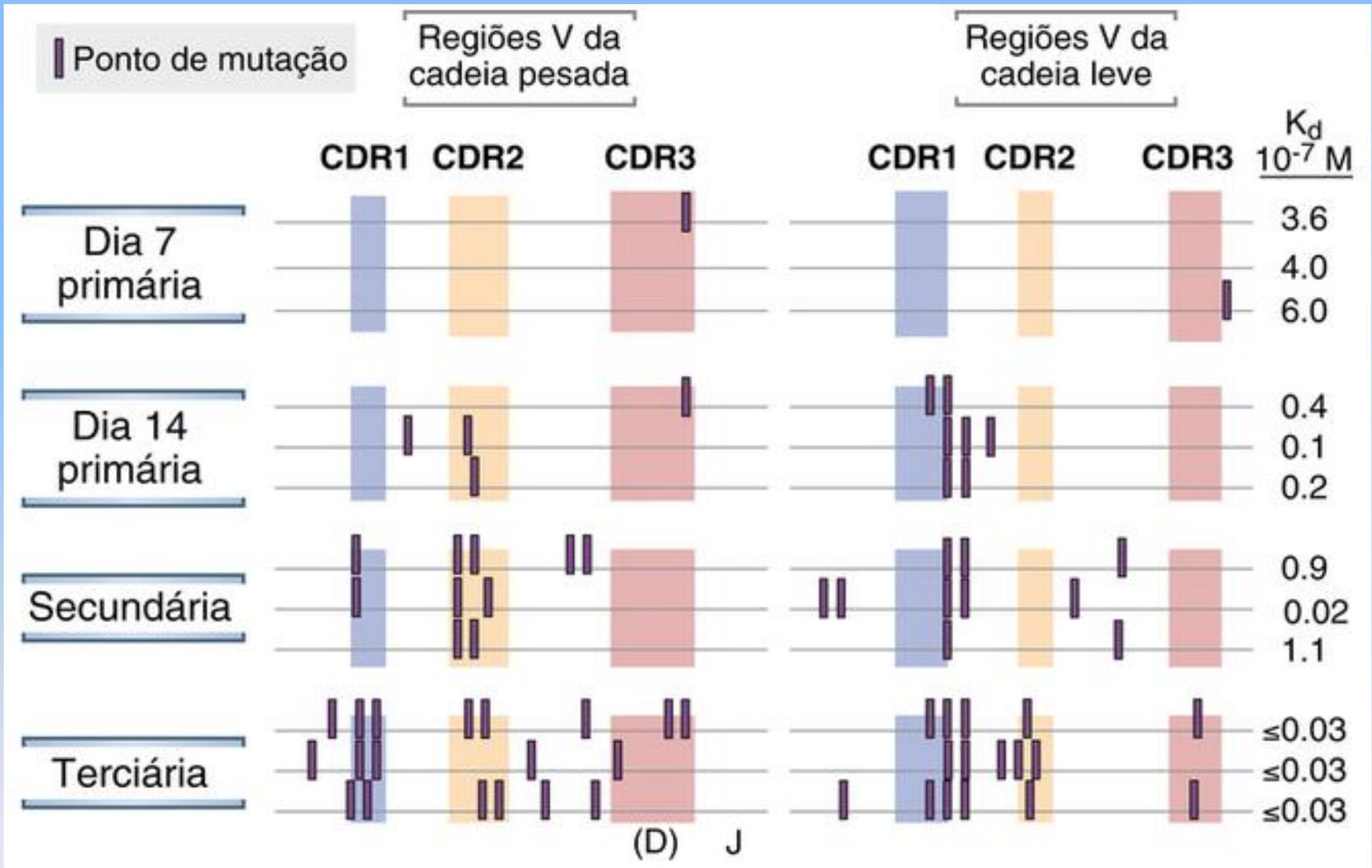


Figure 4-21 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Mudanças de Isotipo da Cadeia Pesada



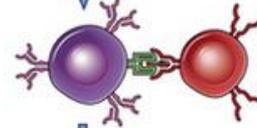
# Hipermutações somáticas



# Seleção de Células B nos Centros Germinativos

Ativação da célula B por antígeno proteico e por células T auxiliares

Célula B imatura Antígeno

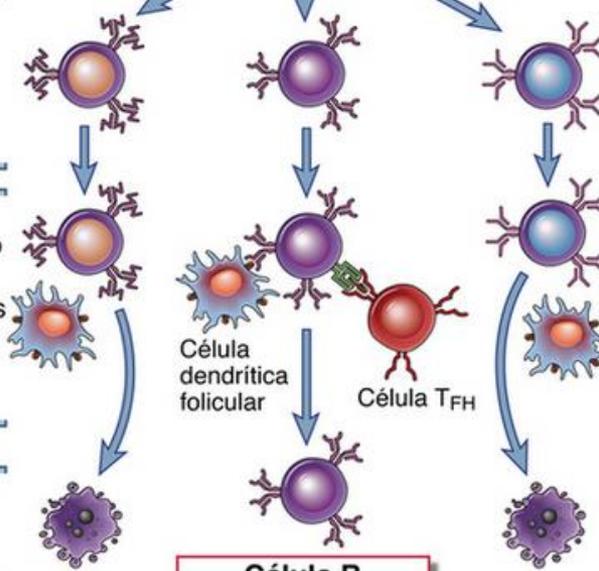


Indução de AID e migração para o centro germinativo

Células B com genes V da Ig somaticamente mutados e Igs com afinidades variadas ao mesmo antígeno

Células B com receptores de antígeno de alta afinidade são melhores no reconhecimento de antígenos apresentados pelas células dendríticas foliculares, ligam-se ao antígeno e o apresentam à célula T<sub>FH</sub>

Apenas as células B com receptores de antígeno de alta afinidade são selecionadas para sobreviver



**Célula B de alta afinidade**

# *Isotipos/Classes de Imunoglobulinas*

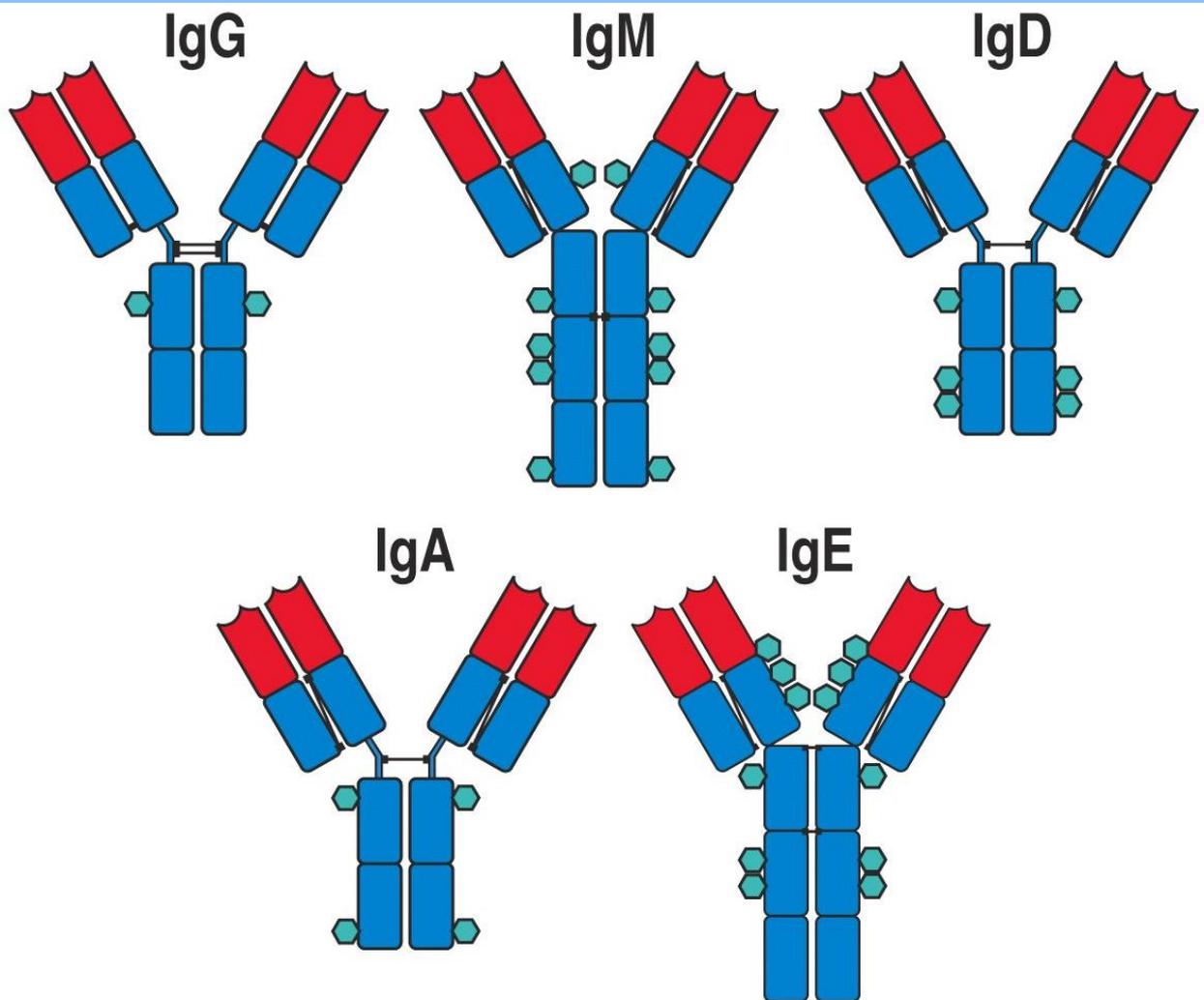


Figure 4-18 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Anticorpos: isotipos

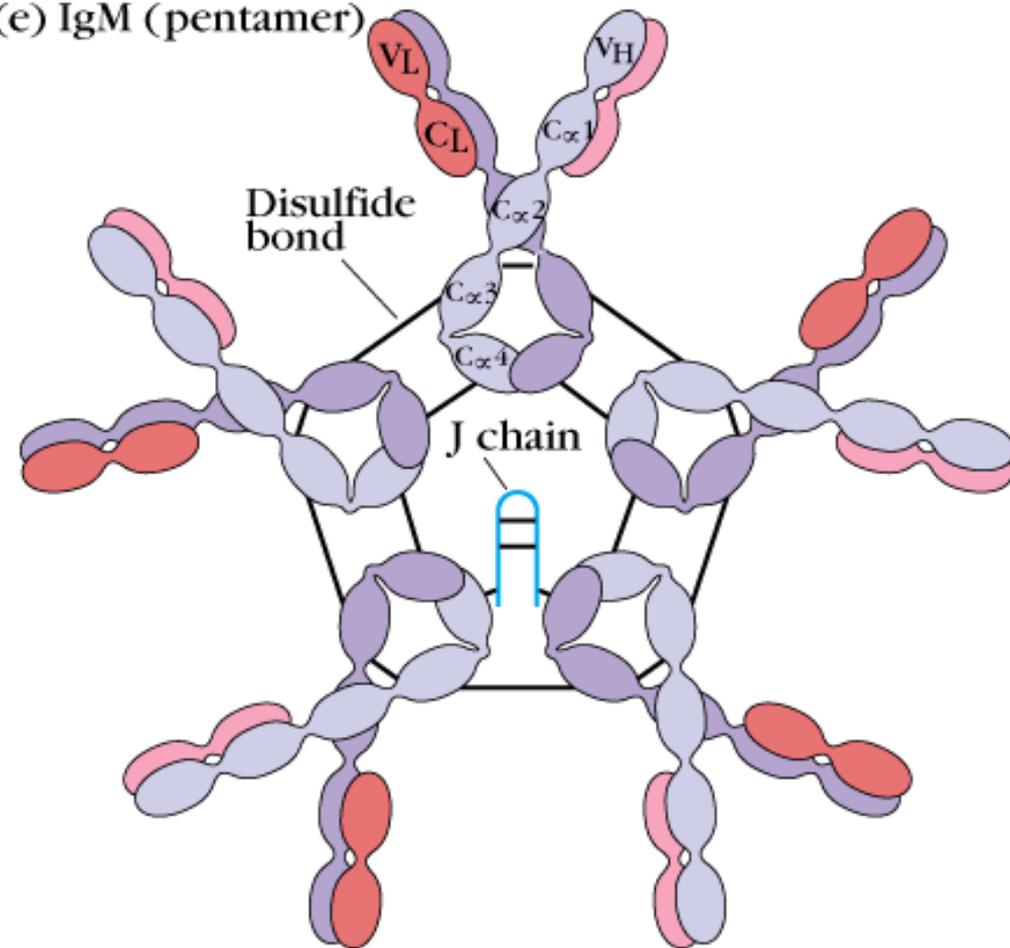
## IgM

- **Pentâmero e Hexâmero (monômero na membrana)**
- **cadeia pesada  $\mu$**
- **concentração serica: 0,5-2 mg/mL**
- **receptor de células B virgens (naïve)**
- **1º isotipo secretado**

## Funções:

- **neutralização**
- **agregação**
- **ativação do complemento**

(e) IgM (pentamer)



# ***Anticorpos: isotipos***

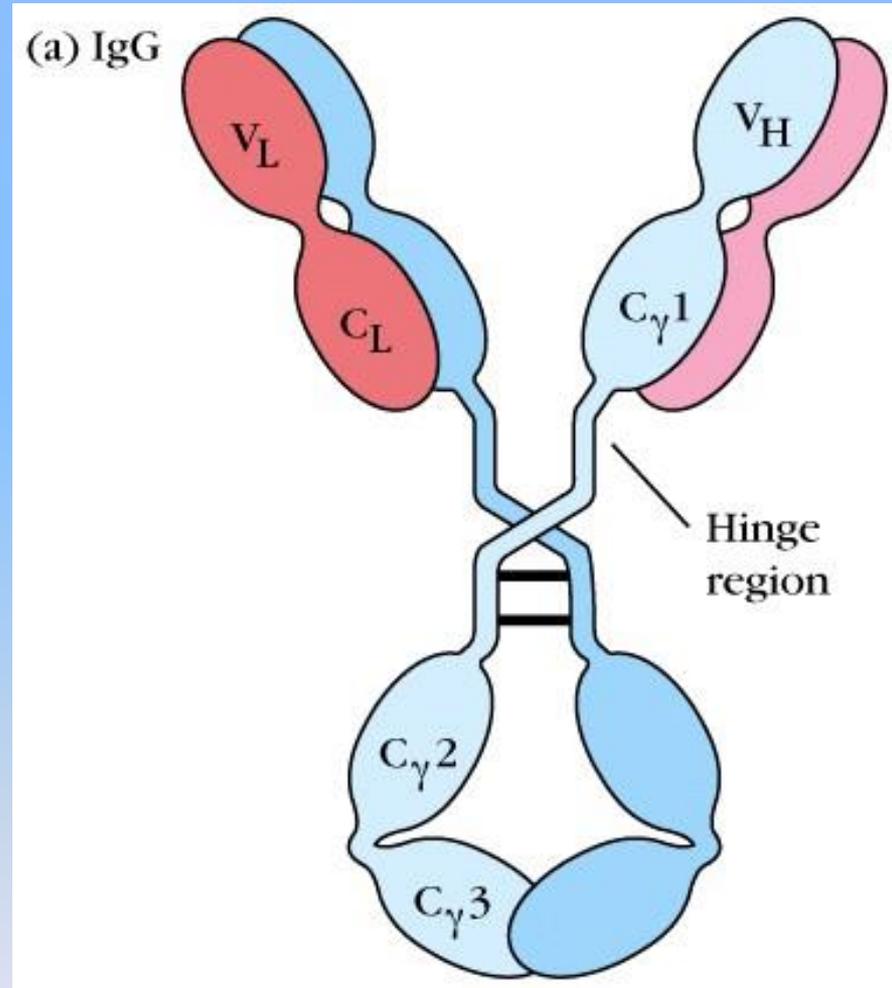
## ***IgD***

- ***monômero não secretado***
- ***cadeia pesada  $\delta$***
- ***concentração sérica: 0-0.4 mg/mL***
- ***receptor de células B virgens (naïve)***

# Anticorpos: isotipos

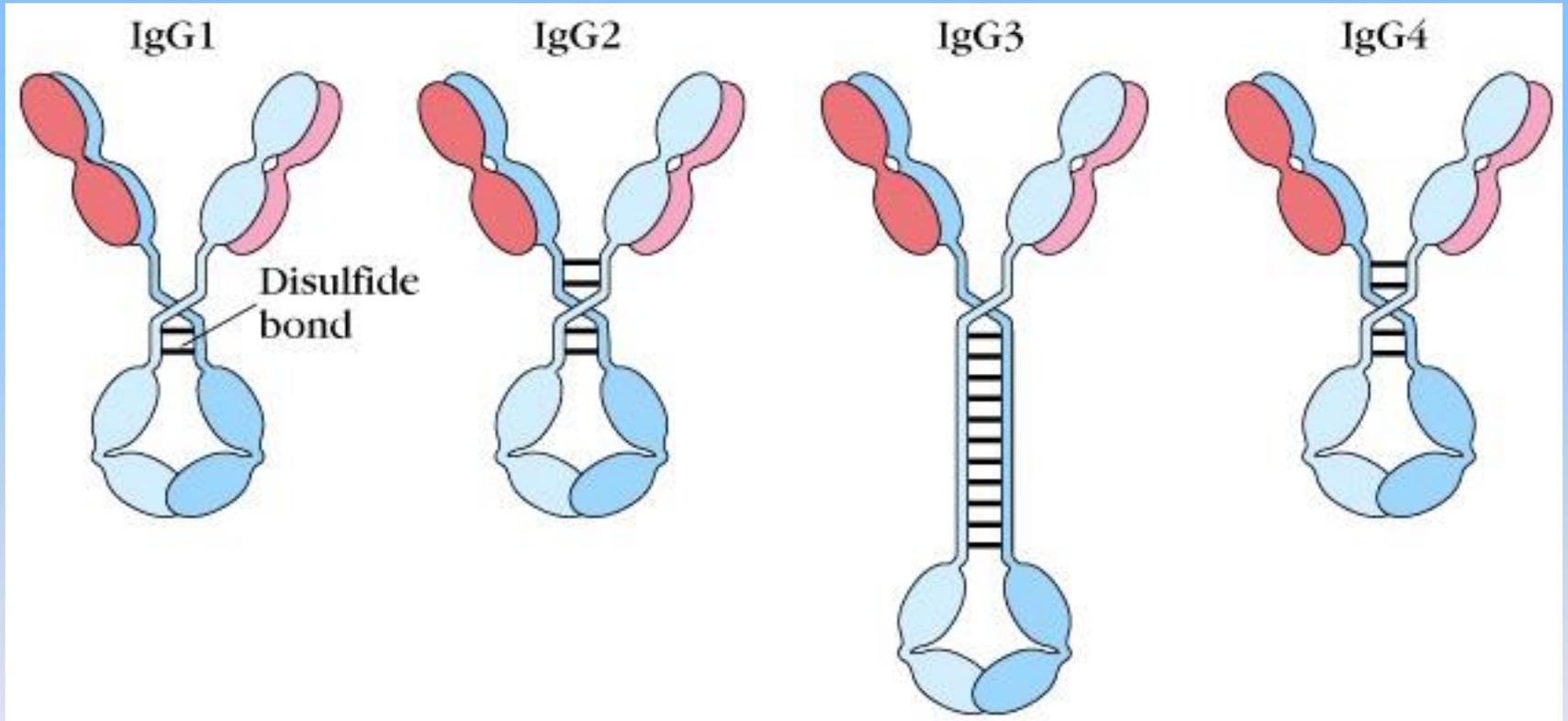
## IgG

- Monômero
- IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
- cadeia pesada  $\gamma$  (1 a 4)
- IFN- $\gamma$  e IL-4
- concentração sérica: 8-16 mg/mL
- secretado em respostas secundárias
- Funções:
  - opsonização
  - ativação do complemento
  - citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)
  - imunidade neonatal
  - inibição por feedback das células B



# ***Anticorpos: isotipos***

## ***Subclasses de IgG***

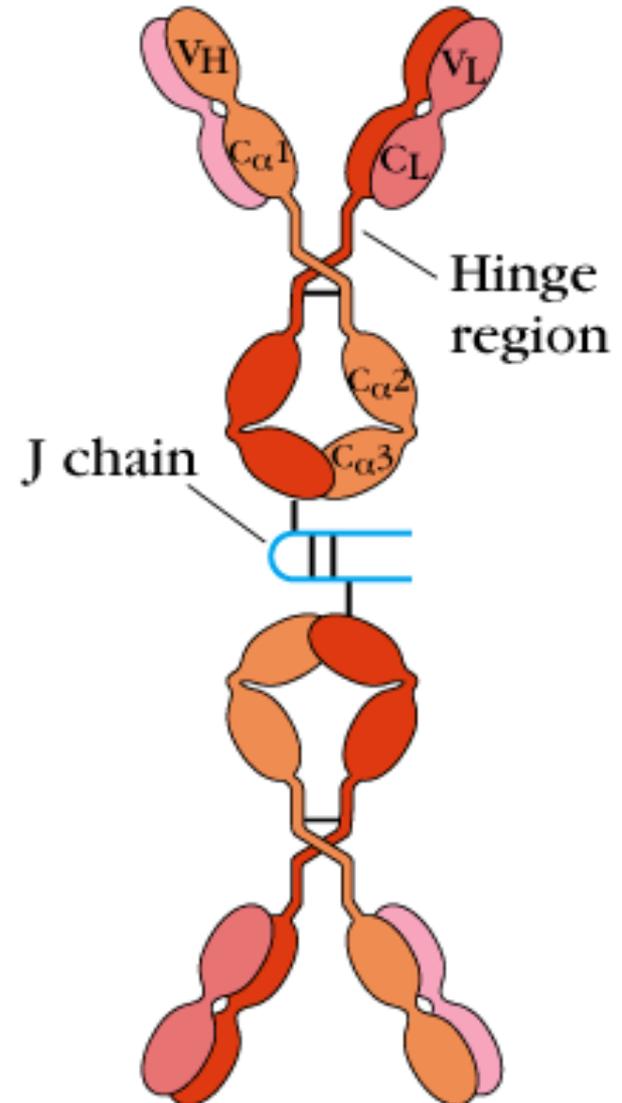


# Anticorpos: isotipos

## IgA

- *monômero, dímero, trímero*
- *IgA1, IgA2*
- *cadeia pesada  $\alpha$  (1 ou 2)*
- *TGF- $\beta$ , BAFF e outras*
- *concentração sérica: 1-4 mg/mL*
- *fluídos biológicos (imunidade mucosa)*

(d) IgA (dimer)



# Secreção de IgA

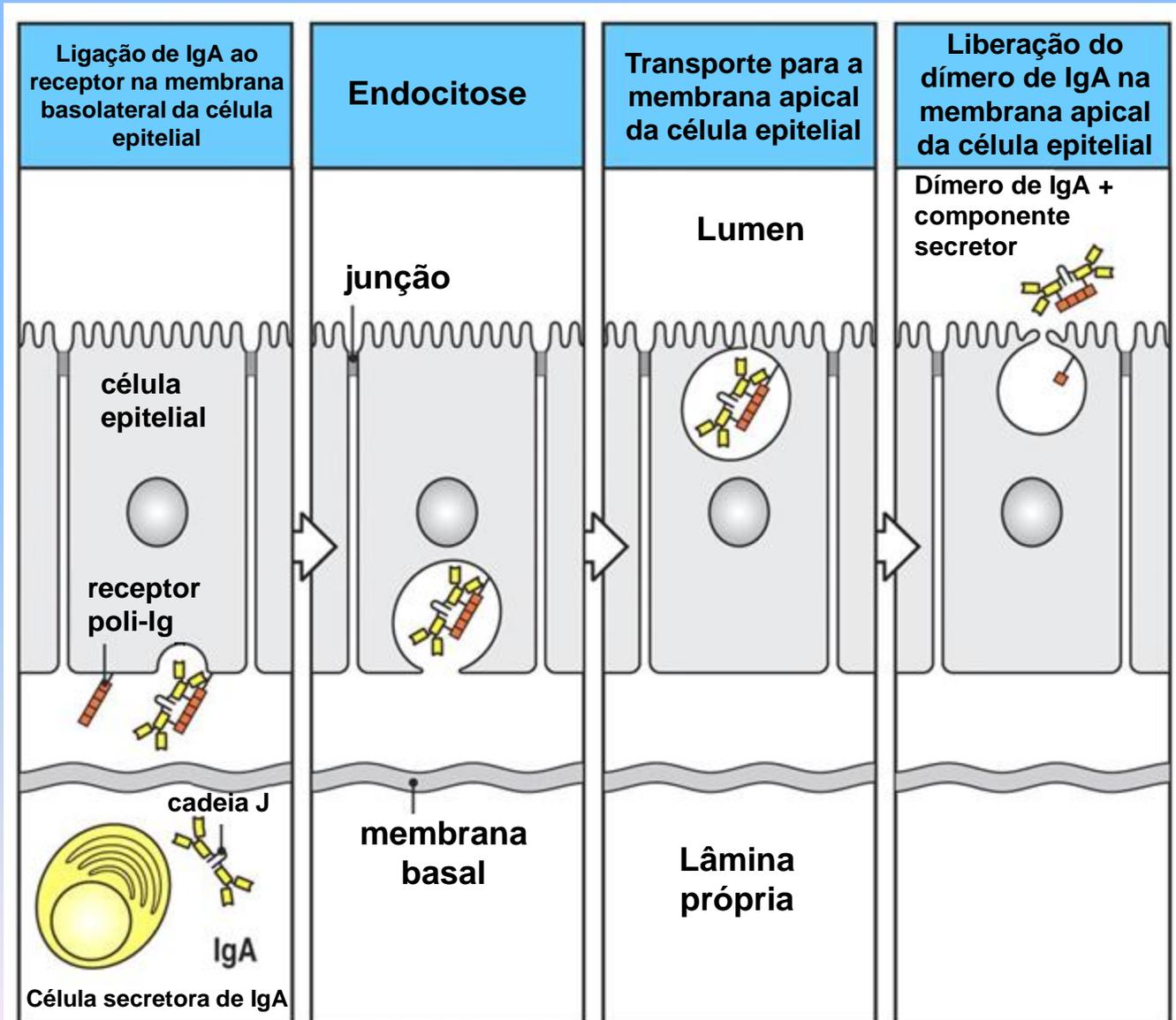
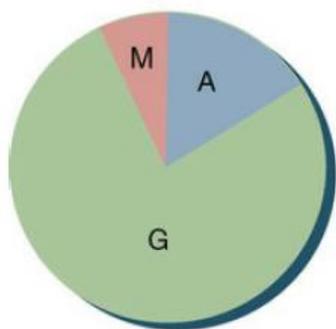
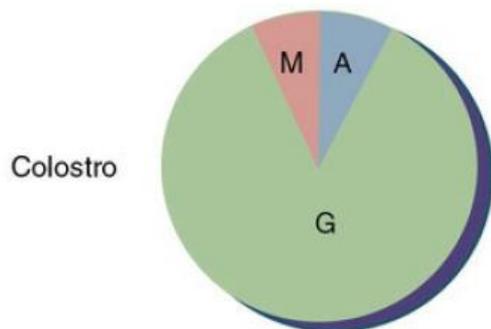
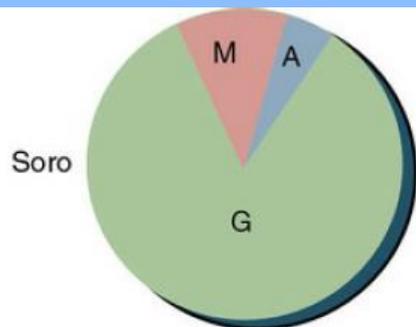
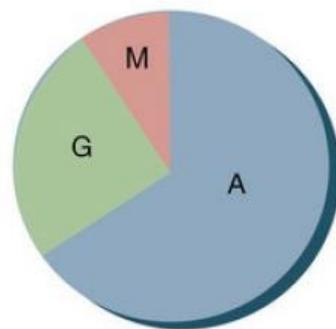


Figure 9-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Concentrações Relativas de Imunoglobulinas



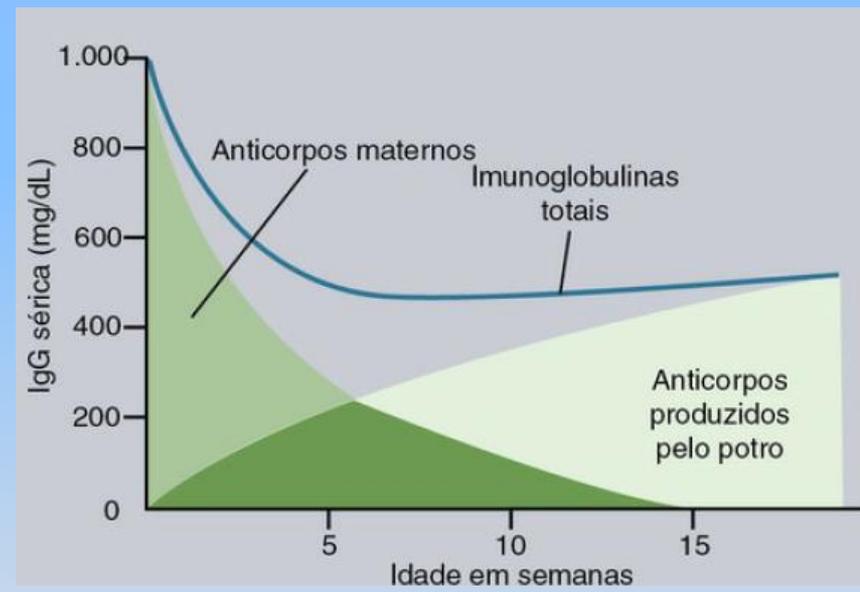
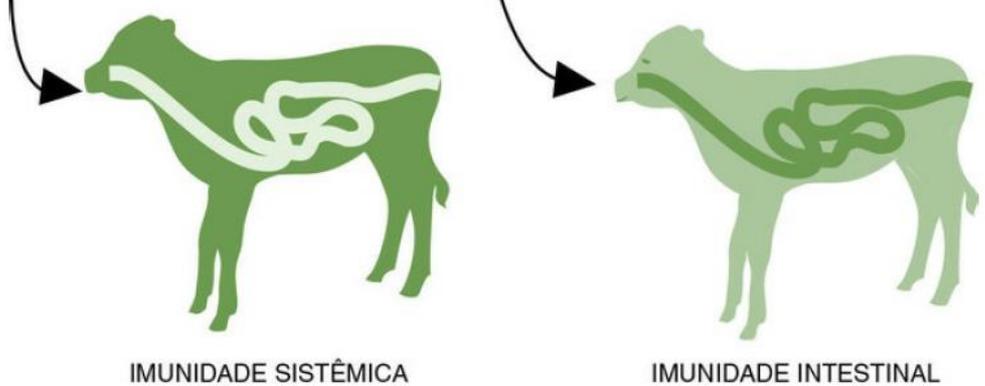
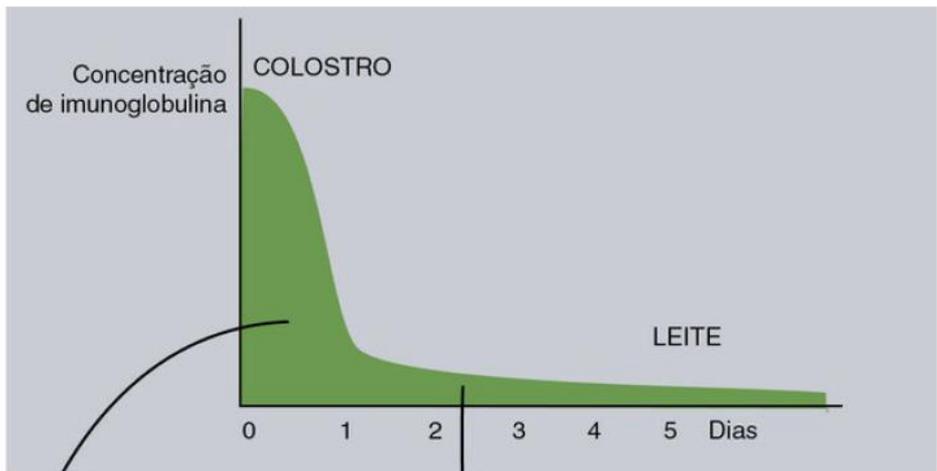
Leite de ruminantes



Leite de não ruminantes

ESPÉCIES FLUIDO		IMUNOGLOBULINAS (mg/dL)				
		IgA	IgM	IgG	IgG3	IgG6
Égua	Colostro	500-1.500	100-350	1.500-5.000	500-2.500	50-150
	Leite	50-100	5-10	20-50	5-20	0
Vaca	Colostro	100-700	300-1.300	2.400-8.000		
	Leite	10-50	10-20	50-750		
Ovelha	Colostro	100-700	400-1.200	4.000-6.000		
	Leite	5-12	0-7	60-100		
Porca	Colostro	950-1.050	250-320	3.000-7.000		
Cadela	Colostro	500-2.200	14-57	120-300		
	Leite	110-620	10-54	1-3		
Gata	Colostro	150-340	47-58	4.400-3.250		
	Leite	240-620	0	100-440		

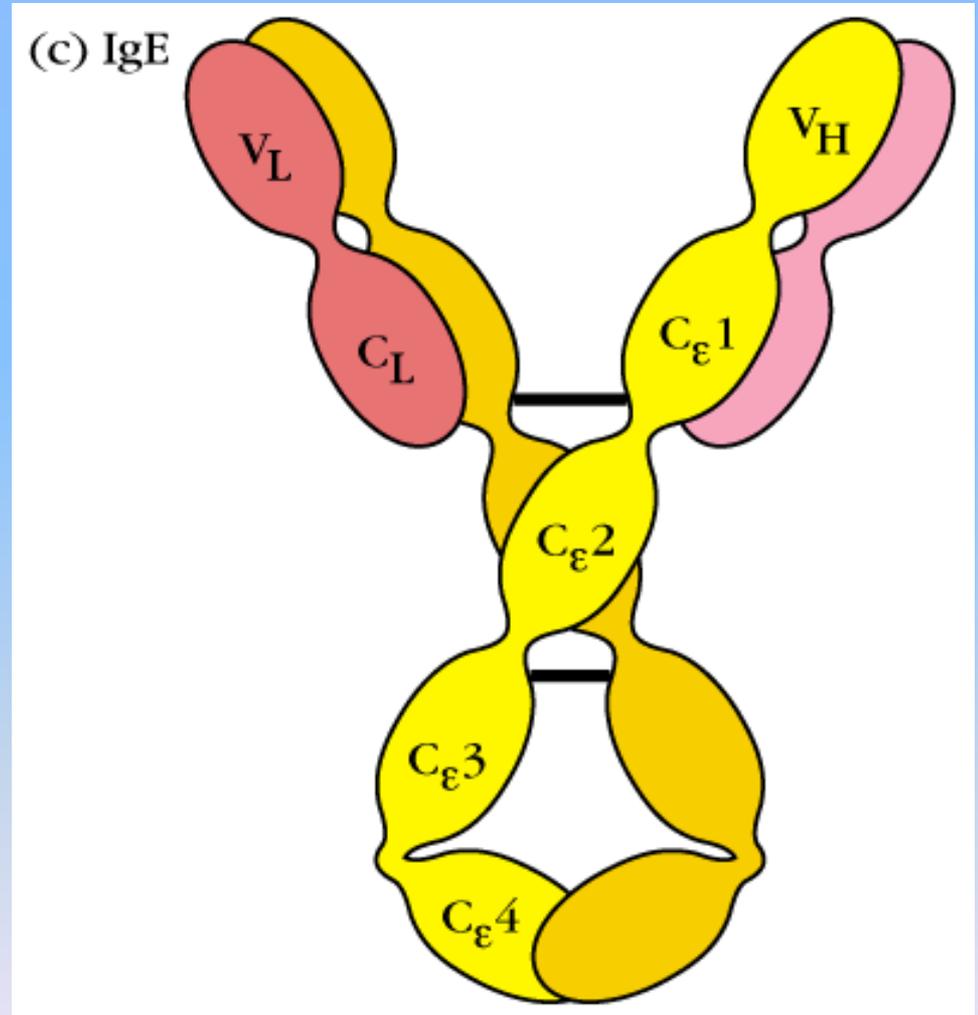
# Transição de Anticorpos Maternos e Produção Própria



# Anticorpos: isotipos

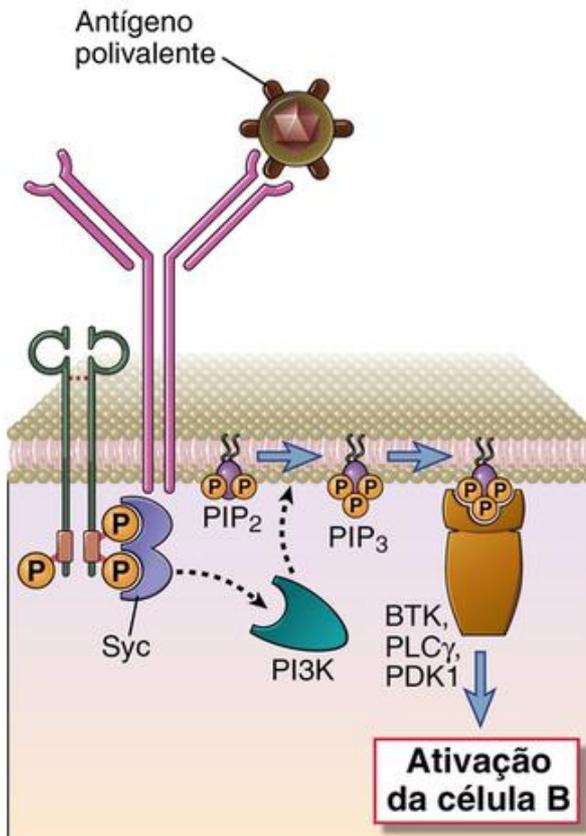
## IgE

- monômero
- cadeia pesada  $\epsilon$
- IL-4
- concentração sérica: 10-400 ng/mL
- imunidade contra parasitas (?),  
hipersensibilidade imediata

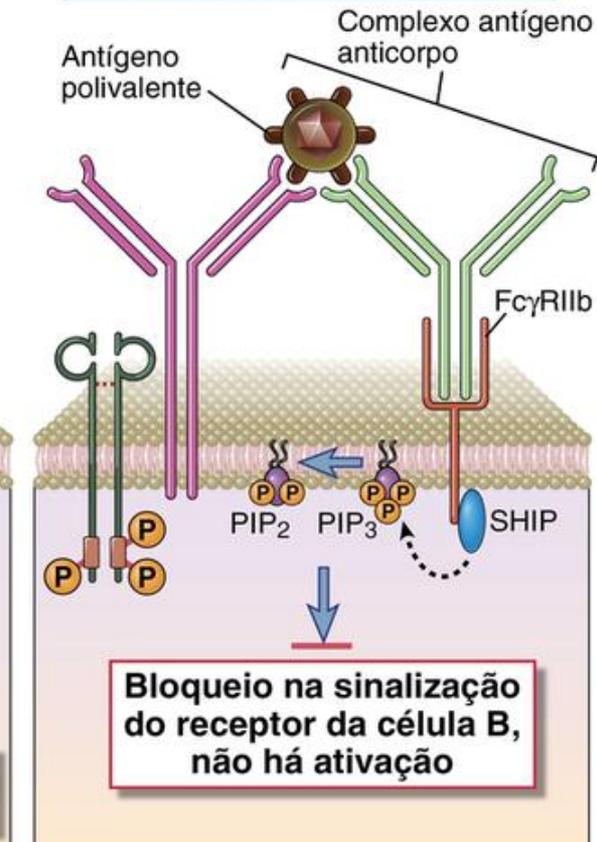


# Regulação da ativação pelo $Fc\gamma RIIb$

**A** A sinalização do BCR leva à formação de  $PIP_3$ , que se liga a outras moléculas sinalizadoras, levando à ativação



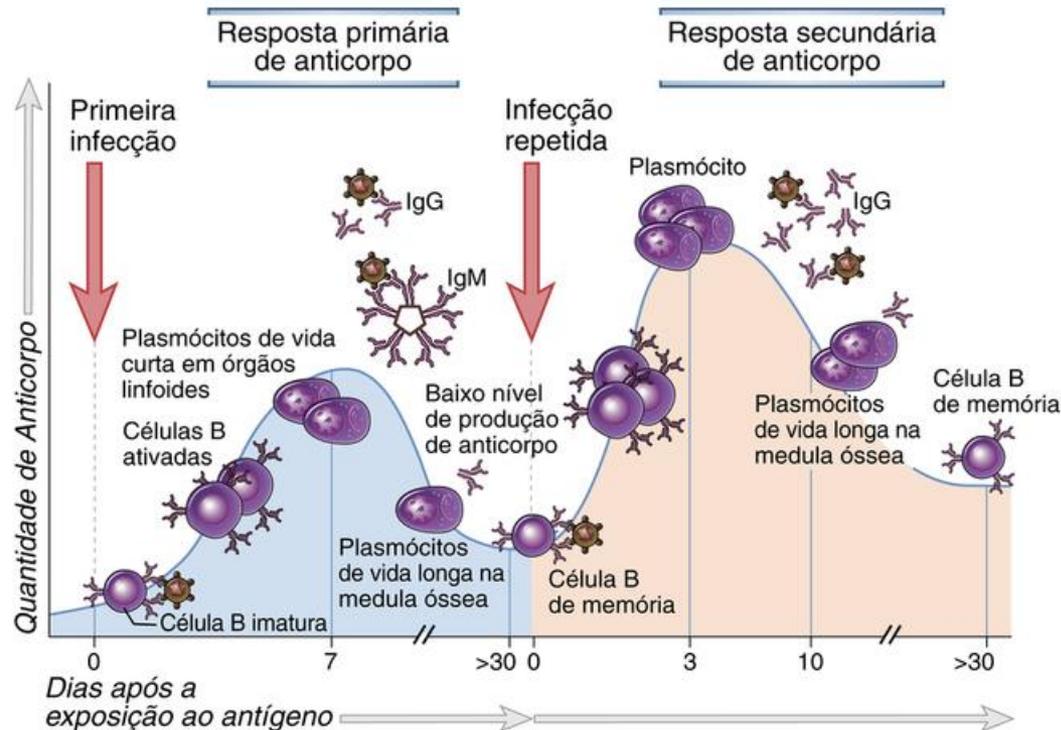
**B** A fosfatase associada ao receptor de Fc, SHIP, converte  $PIP_3$  a  $PIP_2$  no complexo célula B-receptor, bloqueando a sinalização posterior



# ***Propriedades dos Antígenos Timo-Dependentes e Timo-Independentes***

	<b>Respostas Timo-Independentes</b>	<b>Respostas Timo-Dependentes</b>
Natureza química do antígeno	<i>Antígenos poliméricos, especialmente polissacarídeos, também glicolipídeos e ácidos nucleicos</i>	<i>Proteínas</i>
Troca de isotipo do anticorpo	<i>Pouca ou nenhuma</i>	<i>Sim (IgG, IgE e IgA)</i>
Maturação de afinidade do anticorpo	<i>Não</i>	<i>Sim</i>
Resposta de memória de células B	<i>Pouca ou nenhuma (observada apenas com alguns antígenos polissacarídicos)</i>	<i>Sim</i>

# Dinâmica das Respostas Primárias e Secundárias nos Linfócitos B



Característica	Resposta primária	Resposta secundária
Pico de resposta	Menor	Maior
Isotipo	Geralmente IgM > IgG	Aumento relativo em IgG e, em determinadas situações, em IgA ou IgE
Afinidade do anticorpo	Afinidade média mais baixa, mais variável	Afinidade média mais alta (maturação da afinidade)
Induzido por	Todos os imunógenos	Principalmente antígenos proteicos

# Frequência de Linfócitos durante a Resposta

“... a frequência de linfócitos naíve específicos para qualquer antígeno é estimado entre 1 em 10.000 e 1 em 1.000.000 ...”

Exemplo: Frequência de linfócitos B de camundongos que produzem anticorpos anti-hemácias de carneiro

Animais não-imunizados:

- 1 em cada 26.300 linfócitos B produzem IgM
- linfócitos B que produzem IgG: não detectáveis (<1 em um milhão)

Animais imunizados:

- 1 em 219 linfócitos B produzem IgM (5 dias p.i.)
- 1 em 112 linfócitos B produzem IgG (12 dias p.i.)
- 1 em 3.030 linfócitos B produzem IgG (180 dias p.i.)

