

## BMI103

### Estudo dirigido – ativação de linfócitos

#### Texto referência

Pessoal, esse é o 3o bloco da disciplina BMI103. Até o momento vocês aprenderam sobre respostas inatas, onde viram o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou dano celular e o que decorre disso. Viram também inflamação. E depois, no bloco 2, vocês viram como elementos da resposta adaptativa são gerados. Linfócitos B e T expressam receptores para antígenos, a partir de genes que não estão presentes nas linhagens germinativas, mas que são gerados por recombinação somática durante o desenvolvimento destas células.

Vocês viram, no bloco 1, que nós temos receptores para padrões moleculares. E no bloco 2 que temos receptores para antígenos. Primeira pergunta:

#### 1. O que é antígeno?

Antígeno é qualquer composto capaz de disparar respostas imunes adaptativas.

Há situações onde um padrão molecular associado a patógenos pode também funcionar como antígeno. Por exemplo: LPS. LPS é reconhecido pelo receptor TLR4, e capaz de ativar células como macrófagos e neutrófilos. Porém, linfócitos B também podem reconhecer LPS e secretar anticorpos específicos contra o mesmo. Isso porque o BCR (receptor de antígeno de linfócitos B) pode se ligar a LPS e o reconhecer como antígeno.

Então, linfócitos B expressam BCR, e linfócitos T expressam TCR (do inglês, B cell receptor e T cell receptor, respectivamente). Importante – estes são os receptores de antígenos. Essas células expressam vários outros receptores importantes para a sua ativação. Que serão citados oportunamente.

#### 2. Que tipos de compostos podem ser os antígenos?

Isso é muito importante. BCR pode ligar em qualquer tipo de molécula solúvel. Sua característica química pode ser protéica, lipídica, glicídica, ou ainda ácidos nucleicos e até pequenas moléculas orgânicas. Bastante variado!

Os linfócitos T, por outro lado, precisam que os antígenos sejam apresentados para eles. Como isso acontece? Vocês viram no bloco 2. Há duas vias de apresentação de antígenos, classe I e classe II. A de classe I apresenta principalmente antígenos intracelulares, proteínas, degradadas pelo sistema de proteasomo (Figura 1). A via de classe II apresenta, principalmente, antígenos extracelulares, que podem ter sido fagocitados ou pinocitados ou endocitados (Figura 2).

Importante – a maior parte dos linfócitos T, o que têm cadeias de TCR  $\alpha\beta$ , só reconhecem peptídeos apresentados pela via de MHC (ou se pensarmos em humanos HLA – human leukocyte antigen – mesma coisa que MHC). Se apenas peptídeos são reconhecidos, qual a característica química destes antígenos?

Proteínas.

Há uma outra classe de linfócitos T, com TCR  $\gamma\delta$ , que reconhecem lipídeos apresentados pela molécula CD1. Mas essa é uma classe bem diferente de linfócitos, que por hora, não serão discutidos, embora também importantes.

Outra coisa importante, a via de classe I apresenta antígenos somente para linfócitos T CD8, enquanto a de classe II apenas para CD4. Bioquimicamente, isso acontece porque a molécula CD8 (um correceptor do TCR) liga-se, especificamente a uma porção da cadeia de MHC-I, e o mesmo acontece entre CD4 e MHC-II. Agora, por que isso foi selecionado? Qual a importância biológica disto?

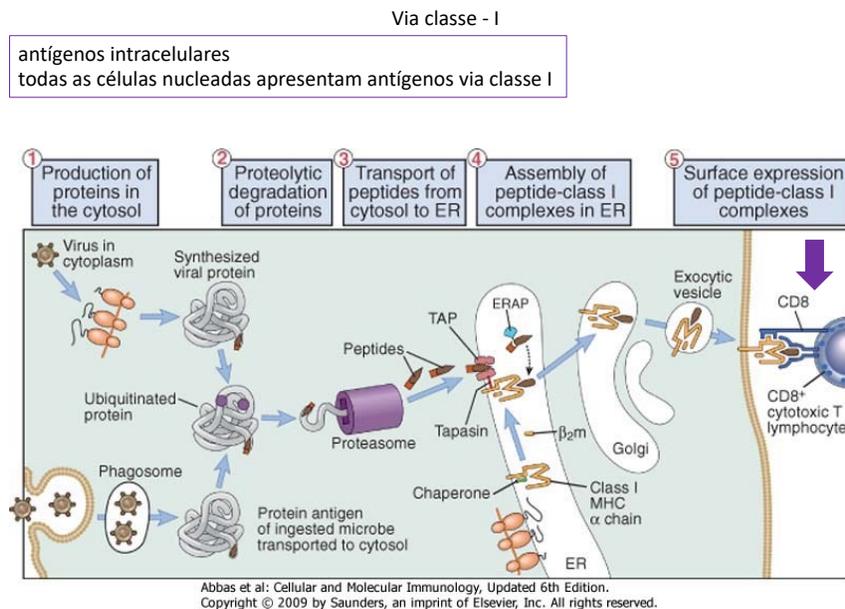


Figura 1. Via de apresentação MHC-I.

### Via Classe II

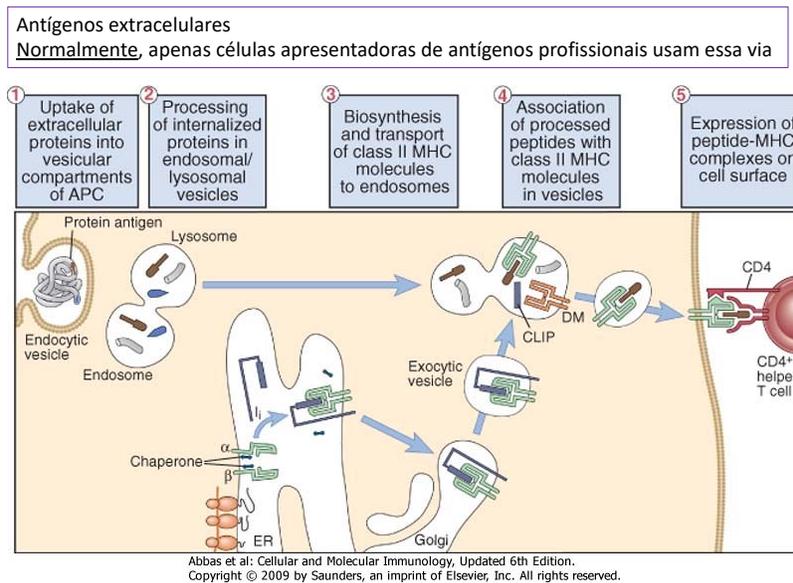


Figura 2. Via de apresentação MHC-II.

A razão biológica da especificidade CD8-MHC-II e CD4-MHC-II, vem da atividade de cada uma destas populações de linfócitos T e da característica do antígeno reconhecido. Por exemplo, se uma pessoa for infectada por um vírus. Vírus são patógenos intracelulares obrigatórios. Eles não conseguem fazer novas partículas virais, a não ser dentro da célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, o vírus vai replicar seu genoma, expressar proteínas e produzir milhares de vírions, que se liberados, infetarão outras células, propagando a infecção. Como eliminá-los, então?

Você consegue pensar em mecanismos de resposta inata para eliminação de vírus?

Na resposta adaptativa, a resposta é citotóxica e também humoral. Eliminar as células que estão infectadas com o vírus, e gerar anticorpos contra o mesmo (vamos deixar a resposta humoral para mais tarde). O linfócito T citotóxico é o CD8. Agora faz sentido, sim? Para que CD8 possa reconhecer antígenos de um patógeno intracelular, ele precisa que peptídeos do patógeno sejam apresentados. E a via de apresentação de proteínas intracelulares é a via de classe I, por isso a especificidade entre CD8 e MHC-I.

Importante lembrar que, além dos vírus, há outros tipos de patógenos intracelulares. Você consegue pensar em algum?

### 3. Que células apresentam antígenos pela via de MHC-I?

Todas as células nucleadas apresentam antígenos pela via de classe I. A razão é que potencialmente qualquer célula pode ser alvo de um patógeno intracelular, principalmente os vírus.

### 4. Que células apresentam antígenos pela via de MHC-II?

As células que expressam e apresentam antígenos pela via de MHC-II são apenas as apresentadoras de antígeno profissionais. Essas são as células dendríticas, os macrófagos, e os linfócitos B. E lembrem, MHC-II apresenta peptídeo para célula T CD4.

Então as CD4 não são citotóxicas? Não, em geral as CD4 não são citotóxicas. Elas são chamadas de células auxiliares (do inglês helper, abreviadas em CD4 Th). Essas células, quando ativadas, secretam citocinas. Essas citocinas têm efeito sobre outras células, muitas vezes elementos da resposta inata, que exercem o mecanismo efetor. Importante, dependendo do estímulo, durante a ativação, as células CD4 podem sofrer diferentes processos de diferenciação. Isso é muito, muito importante. Através da secreção de citocinas e outros sinais bioquímicos, as células CD4 “orquestram” as respostas adaptativas. Então elas precisam ser capazes de induzir a resposta mais eficiente para o patógeno que está infectando o organismo naquele momento. Isso acontece tanto por estímulo das células apresentadoras de antígenos, como sinais do microambiente onde está acontecendo a infecção (Figura 3).

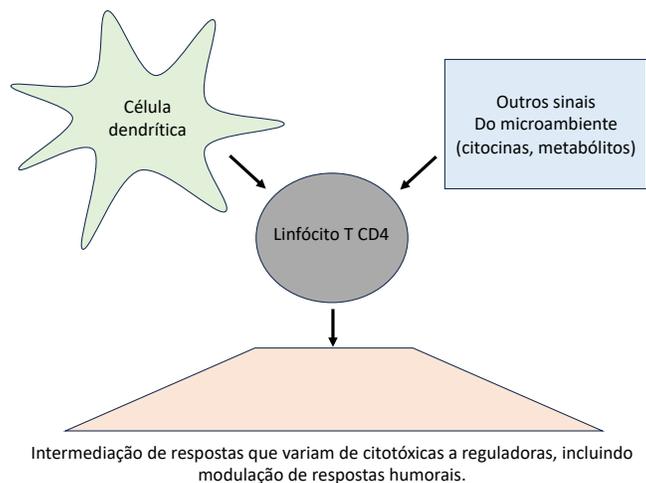


Figura 3. Linfócitos T CD4 são centrais na modulação de respostas adaptativas

Células apresentadoras de antígeno profissionais.

Novamente, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B apresentam antígenos por MHC-II (também por MHC-I, como todas as outras células nucleadas). As células dendríticas e os macrófagos têm capacidade de fagocitar, pinocitar, endocitar desde moléculas até organismos do meio, processá-los e apresentá-los pela via de classe II (Figura 2). Porém, linfócitos B não são fagócitos. Mas através do BCR, ligado ao seu antígeno específico, é capaz de internalizar moléculas, macromoléculas e até fragmentos de patógenos, processá-los e apresentá-los pela via de MHC-II para linfócitos T CD4. Isso é importante uma vez que os linfócitos T CD4 ativados fornecem sinais essenciais para a resposta de linfócitos B. Veja na tabela abaixo, as principais características de células apresentadoras de antígenos profissionais (Tabela 1).

Tabela 1. Características de células apresentadoras de antígeno profissionais.

	Células dendríticas	macrófagos	Linfócitos B
Captura de antígenos	macropinocitose, fagocitose, endocitose +++	+++ fagocitose	++++ BCR
Expressão de MHC-II	Baixa nos tecidos periféricos, alta nos órgãos linfóides secundários	Induzível por diversos estímulos - a +++	Constitutiva, mas pode aumentar após ativação +++ a ++++
Expressão de coestímulo	Constitutiva em células ativadas ++++	Induzível - a +++	Induzível - a +++
Tipos de antígenos (processados em peptídeos)	Peptídeos, antígenos virais, alérgenos	Antígenos particulados, intracelulares e extracelulares	Antígenos solúveis, toxinas, vírus
Localização	Tecidos linfóides, conectivo, epitélios (pele e mucosas). – capacidade de migração após maturação.	Tecidos linfóides, conectivos, mucosas, órgãos específicos no de células residentes	Tecidos linfóides e sangue periférico

Finalmente, vamos falar um pouco de linfócitos B. Linfócitos B expressam como receptor de antígeno, o BCR. E o BCR, como dito anteriormente, pode reconhecer uma gama variada de moléculas. O BCR liga-se diretamente ao antígeno, e se a sinalização for adequada, essas células já podem começar a produzir anticorpos (resposta timo-independente). Porém, se essas células conseguirem apresentar o antígeno em questão para linfócitos T, elas podem melhorar o tipo e qualidade de anticorpo, para melhor adequar o anticorpo secretado ao tipo de patógeno (resposta timo-dependente).

Agora que todos os elementos estão apresentados. Vamos falar um pouco sobre ativação. A ativação de linfócitos precisa, obrigatoriamente, de pelo menos 2 sinais (isso é verdade tanto para T como para B). Os dois sinais são: antígeno e coestímulo. Lembrança sobre antígenos:

Linfócitos T – receptor TCR reconhece peptídeos apresentados por MHC (classe I ou II)  
CD4 – MHC-II/ CD8 – MHC-I

Linfócitos B – receptor BCR reconhece antígenos solúveis, de variadas características químicas.

5. O que é coestímulo? De onde vem e para que serve?

Vocês lembram que nos órgãos linfóides primários há mecanismos para eliminar clones de linfócitos autoreativos, ou no timo para geração de linfócitos T reguladores, caso eles reconheçam antígenos próprios. Isso é chamado de tolerância central. Mas, qual a chance de que todo e qualquer linfócito autoreativo seja, de fato eliminado? Mais ainda, e antígenos alimentares? Ou antígenos da microbiota (microorganismos não patogênicos que vivem no nosso organismo)?

Para lidar com isso, existe um mecanismo de tolerância chamado tolerância periférica. Ou seja, que acontece nos tecidos periféricos. Nós veremos mais detalhes sobre tolerância mais para frente, no curso, mas é importante agora pensar em como o sistema adaptativo consegue decidir sobre responder ou não a um antígeno que seja reconhecido por um BCR ou TCR. Se o antígeno vier acompanhado de coestímulo, há resposta. Se não houver coestímulo, mesmo que o antígeno seja reconhecido, não haverá resposta. Haverá anergia.

## 6. O que é anergia?

Anergia é ausência de resposta contra um antígeno.

Mas voltando à pergunta 5, sabemos para que precisamos de coestímulo, vimos na tabela 1 que as células apresentadoras de antígenos profissionais podem expressar essas moléculas, mas o que são elas? São moléculas de superfície que se ligam e ativam conjuntos de receptores, expressos nos linfócitos e que ativam vias de sinalização que modulam o sinal do TCR ou BCR. Há famílias de coestimuladores e receptores, como indicado na Figura 4.

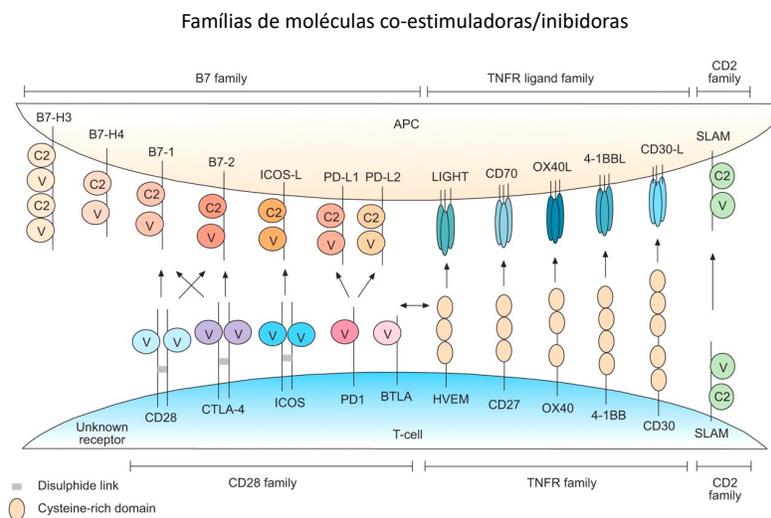


Figura 4. Famílias de coestimuladores, expressos em células apresentadoras de antígenos (amarela), e seus receptores nos linfócitos T (azul).

Importante aqui, e novamente, referindo a tabela 1 – nem sempre as moléculas coestimuladoras são expressas. Quando elas são expressas? Elas são expressas quando as células apresentadoras de antígenos são ativadas por padrões moleculares associados a patógenos ou danos, algumas citocinas, e sinais inflamatórios. Ou seja, na presença de dano tecidual ou infecção, as células apresentadoras apresentam um sinal de perigo, junto com o antígeno para ativar os linfócitos T. E os linfócitos B? Eles também precisam de coestímulo, eles mesmos expressam os receptores para padrões moleculares e citocinas, além também de receptor para proteínas do sistema

complemento que podem opsonizar patógenos ou fragmentos dos mesmos e que ativam o linfócito B, juntamente com o sinal do antígeno reconhecido pelo BCR.

A ativação de linfócitos envolve também sinalização por moléculas que definam o perfil da resposta. Como mencionado acima, resposta a patógenos intracelulares deve incluir respostas citotóxicas. Mas e se os patógenos forem extracelulares? Fagócitos e sistema complemento são bons mecanismos de resposta. E os linfócitos T CD4, através de citocinas específicas, conseguem sinalizar diretamente para essas células, ou para outras, para recrutar e ativar fagócitos, por exemplo.

Então, para ativação de linfócitos estamos pensando em, pelo menos 3 sinais: antígeno, coestímulo, citocinas (às outras moléculas também, como metabólitos).

Uma parte essencial da ativação de linfócitos é um processo chamado expansão clonal.

#### 7. O que é expansão clonal?

A expansão clonal é a proliferação do linfócito que reconheceu e foi ativado por um antígeno. Na Figura 5, eu represento para vocês linfócitos B, por exemplo. Cada cor representa um BCR com especificidade diferente. Então, nessa mistura de células, tem células que podem reconhecer diferentes antígenos. Suponham que eu adiciono um antígeno que é capaz de ativar o BCR da célula azul (juntamente com o restante dos sinais necessários para ativação). Apenas a célula azul vai proliferar. As outras continuarão quiescentes, porque seus receptores BCR não reconhecem o antígeno azul. Então temos uma expansão clonal – apenas o clone que reconhece o antígeno prolifera.

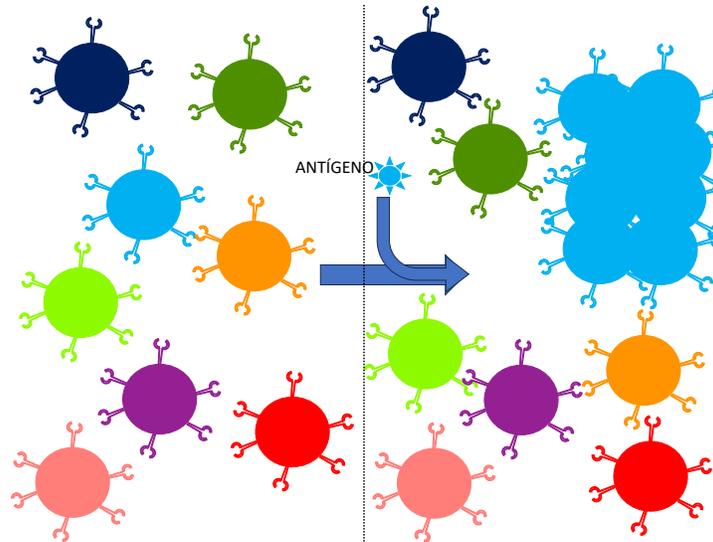


Figura 5. Expansão clonal. Uma população de linfócitos pode ser exposta a um antígeno. Porém, somente o clone que reconhece o antígeno vai proliferar. Os outros clones continuarão quiescentes.

Fica claro, portanto, que o sinal que leva à ativação de linfócitos precisa ser mitogênico, para garantir proliferação celular, e tem que levar a um processo de diferenciação para que a célula possa assumir a função necessária para a resposta requerida.

A ativação de linfócitos T e B usa vias de sinalização relativamente similares, porém na membrana, o processo é diferente. Lembre-se que o linfócito T precisa de apresentação de antígenos e o B não.

No caso dos linfócitos T, a ativação requer a formação de uma sinapse imunológica na superfície de contato entre a célula apresentadora e o linfócito T (Figura 6). O que precisa estar na sinapse? Do lado da célula apresentadora – MHC contendo um peptídeo cognato, moléculas coestimuladoras, moléculas de adesão. Do lado do linfócito T – o complexo TCR, CD4 ou CD8, receptor para coestímulo, moléculas de adesão. As moléculas de adesão são importantes para estabilizar a sinapse, uma vez que a interação TCR com MHC/peptídeo é de relativamente baixa afinidade.

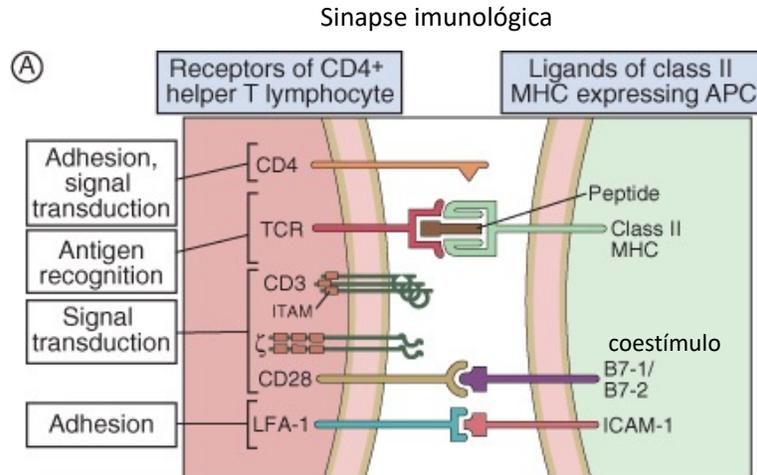


Figura 6. Sinapse imunológica. Em verde está a célula apresentadora de antígeno, em rosa, o linfócito T. B7-1 e B7-2 são moléculas coestimuladoras, e CD28 é o receptor para essas moléculas. Note uma estrutura chamada ITAM – do inglês *Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif*. São sequências intracelulares presentes nas moléculas CD3 e cadeia zeta que sempre estão associadas ao TCR (a porção intracitoplasmática do TCR é muito curta e incapaz de passar sinais para a célula, por isso é sempre necessária a presença das moléculas assessórias, CD3 e cadeia zeta, que contém domínios de ativação, por fosforilação de resíduos de tirosina).

O complexo TCR ativa várias vias de sinalização, e o receptor de coestímulo, CD28 ativa a via de PI3K. E essa sinalização vai ser suficiente para ativar o linfócito.

No caso dos linfócitos B, o BCR liga diretamente ao antígeno. Com isso, sinais de coestímulo devem estar presentes associados ao antígeno ou vindos do ambiente. Na Figura 7 vemos uma situação de coestímulo associado ao antígeno, no formato de opsonização pelo sistema complemento.

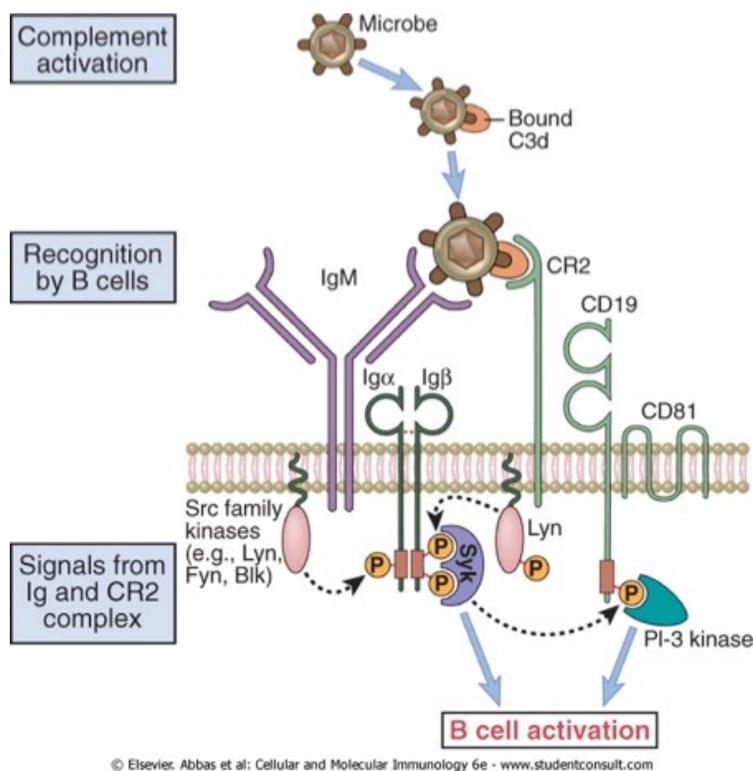


Figura 7. Ativação de linfócitos B timo-independente. A IgM é a imunoglobulina ou BCR que liga no antígeno que está opsonizado por proteínas do sistema complemento, que ligam o receptor CR2. Esse receptor passa o sinal de ativação para CD19 que por sua vez ativa a via de PI3K. O BCR, como o TCR tem porção intracitoplasmática muito curta, e por isso também precisa de moléculas acessórias Igα e Igβ, que contêm domínios de ativação ITAM. As vias ativadas pelo BCR são semelhantes com as ativadas pelo TCR, com algumas diferenças.

Nessa primeira ativação, os linfócitos B proliferam e secretam, principalmente uma imunoglobulina denominada IgM. Após essa primeira ativação, esse linfócito pode apresentar o antígeno em questão para linfócitos T CD4, que por sua vez irão secretar citocinas e sinalizar com a molécula CD40L para levar a processos chamados troca de isotipo e maturação de afinidade no linfócito B.