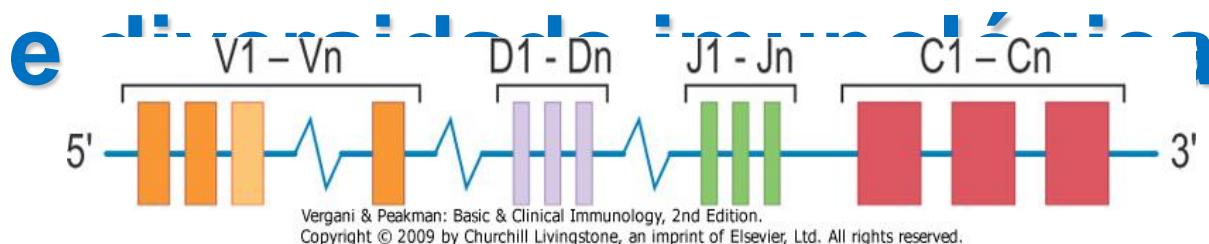




Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Geração do repertório de linfócitos

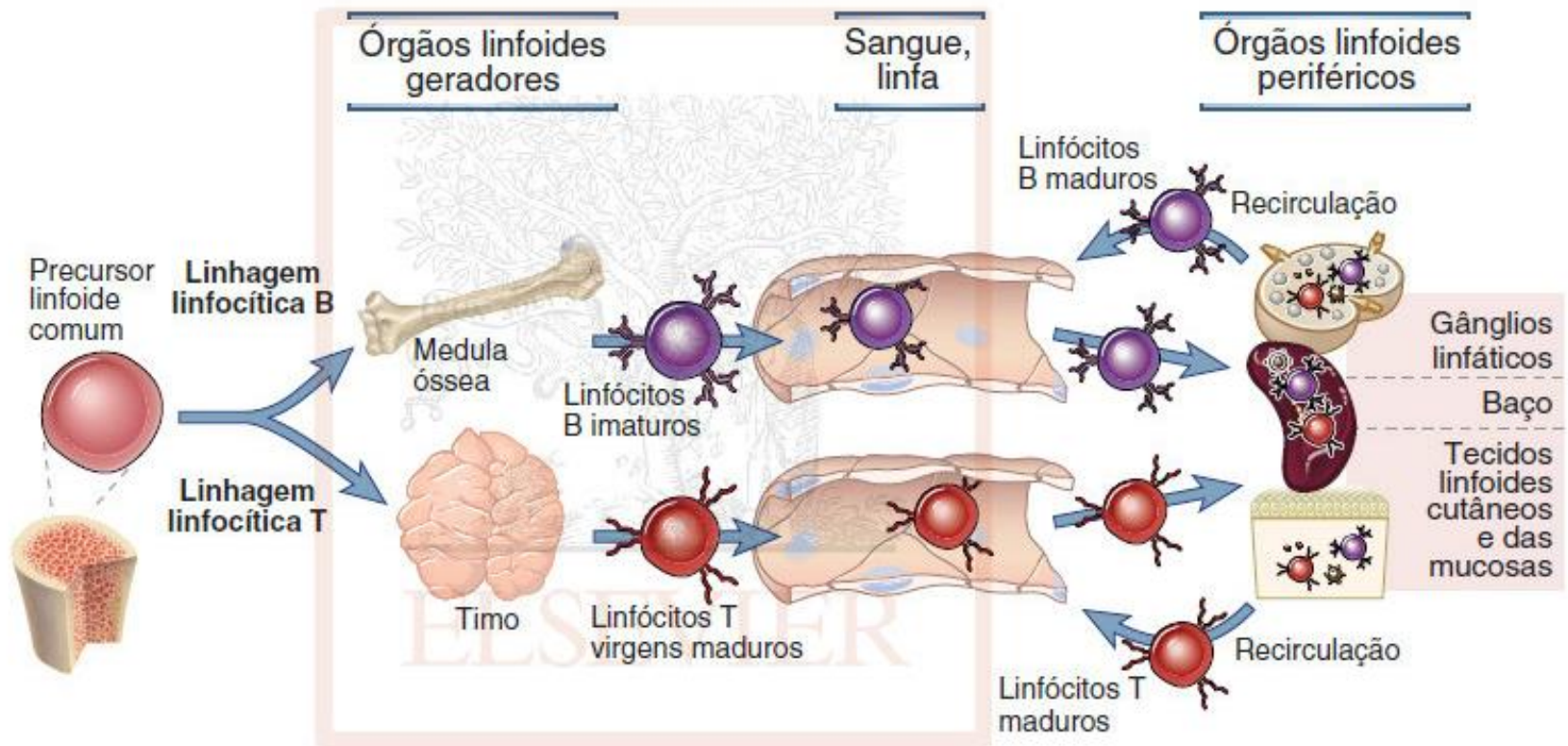


Dra. Daniela Carlos Sartori
danicar@usp.br
Ramal: 4532/4538

10/02/2020
Ribeirão Preto

Desenvolvimento de linfócitos

Maturação de linfócitos: O processo pelo qual progenitores dos linfócitos (B e T) se diferenciam em linfócitos maduros (órgãos linfóides centrais, geradores ou primários)



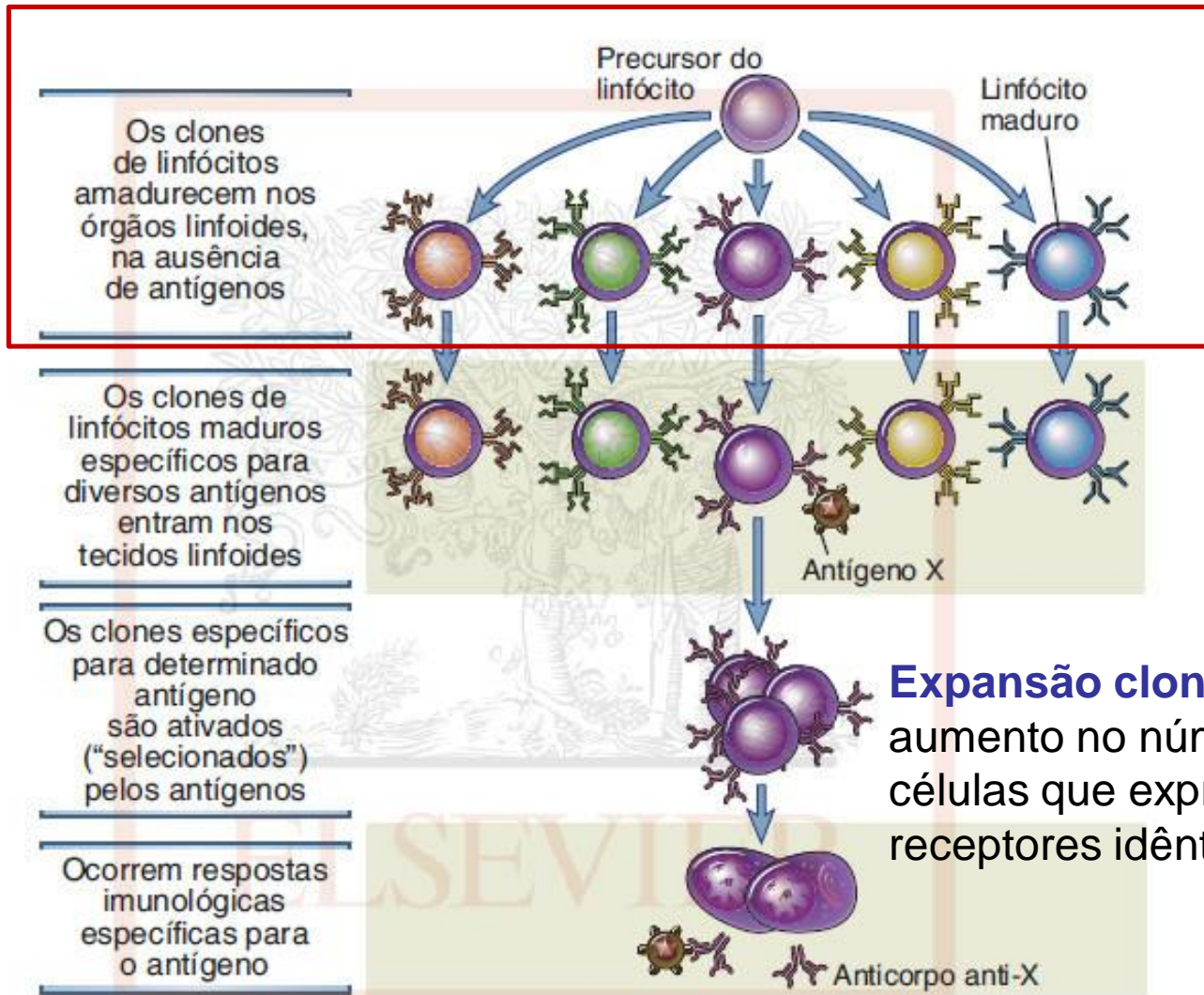
Linfócitos B: produção e maturação na medula óssea

Linfócitos T: produção na medula óssea e maturação no timo

Características de Imunidade Adaptativa

CARACTERÍSTICA	SIGNIFICADO FUNCIONAL
ESPECIFICIDADE	Garante que antígenos distintos desencadeiem resposta específicas
DIVERSIDADE	Capacita o sistema imunológico a responder a uma grande variedade de antígenos
MEMÓRIA	Conduz a respostas intensificadas a exposições repetidas ao mesmo antígeno
EXPANSÃO CLONAL	Aumenta o número de linfócitos antígeno-específicos para que se mantenham atualizados com os microrganismos
ESPECIALIZAÇÃO	Gera respostas que são ideais para defesa contra diferentes tipos de microrganismos
CONTRAÇÃO E HOMEOSTASIA	Permite ao sistema imunológico responder a novos antígenos encontrados
TOLERÂNCIA A ANTÍGENOS PRÓPRIOS	Evita lesão do hospedeiro durante resposta a antígenos estranhos

Hipótese da seleção clonal



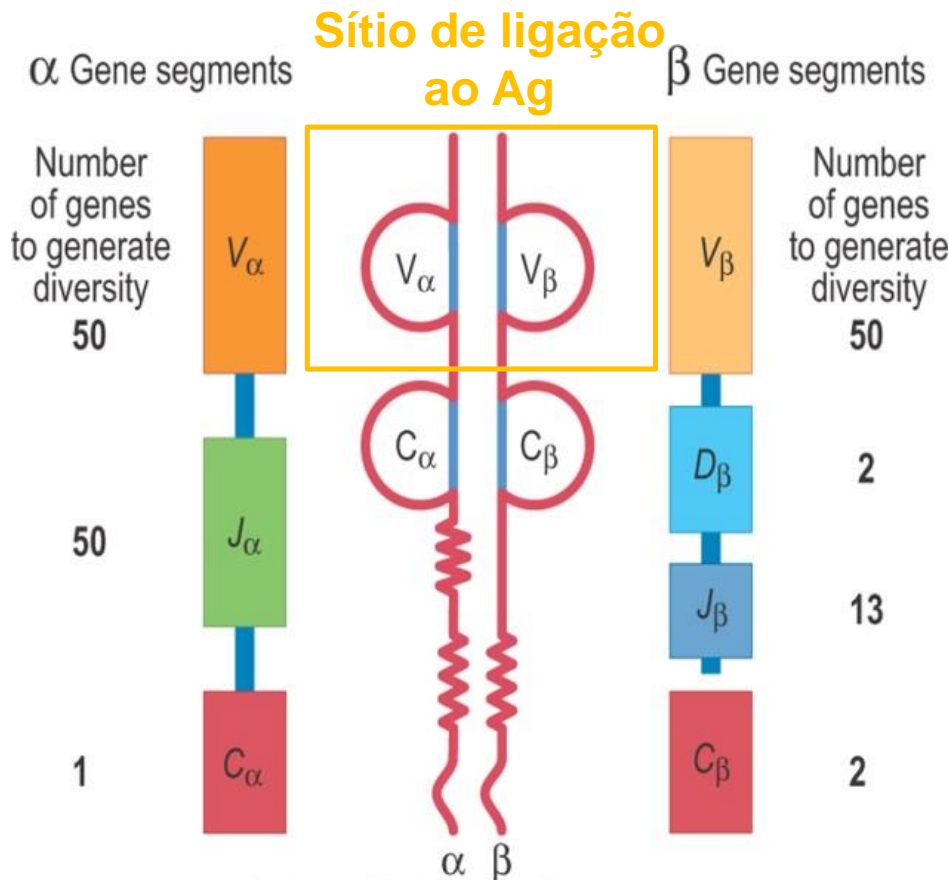
Etapas da maturação de linfócitos

Envolve uma série de eventos:

- 1) Comprometimento de células progenitoras:** com a linhagem B ou T (fatores de transcrição);
- 2) Proliferação de progenitores imaturos em estágios iniciais:** proliferação em resposta as citocinas e aos sinais gerados por um pré-receptor;
- 3) Rearranjo ou recombinação** sequencial de genes e expressão dos receptores de antígenos (**diversidade e especificidade**);
- 4) Seleção (positiva e negativa):** de linfócitos B e T (não reatividade ao próprio);
- 5) Diferenciação de células B e T:** em subpopulações funcionais distintas (**especialização**).

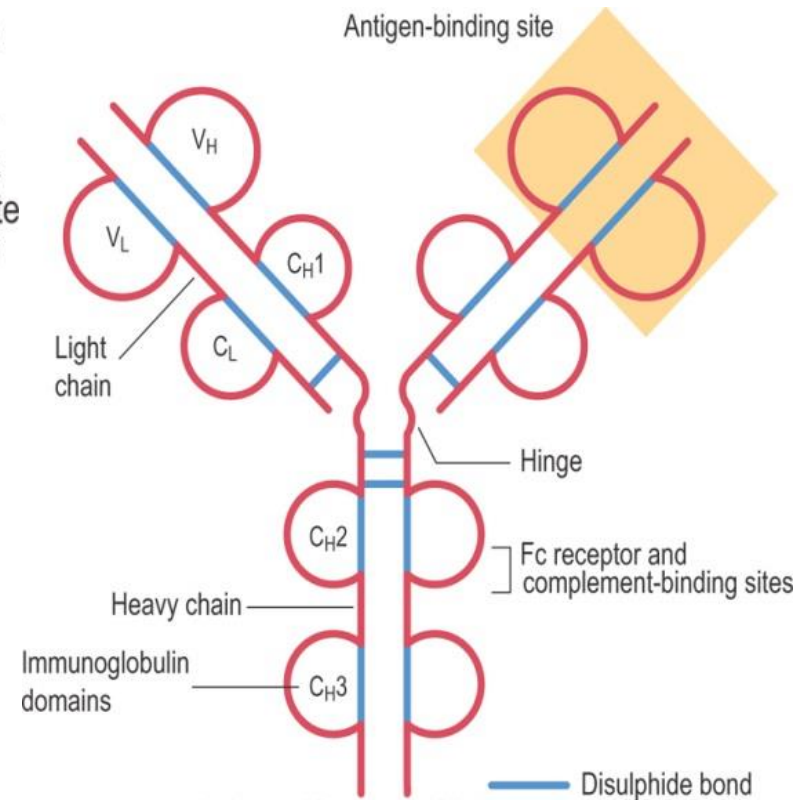
Receptores de de linfócito T e B

TCR: Heterodímero formado pelas 2 cadeias (α e β)



Vergani & Peakman: Basic & Clinical Immunology, 2nd Edition.
Copyright © 2009 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, Ltd. All rights reserved.

BCR (IgM): Formado por 4 cadeias (2 pesadas e 2 leves idênticas)



Vergani & Peakman: Basic & Clinical Immunology, 2nd Edition.
Copyright © 2009 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, Ltd. All rights reserved.

Em cada indivíduo, podem existir 10^7 ou mais clones de linfócitos T e B

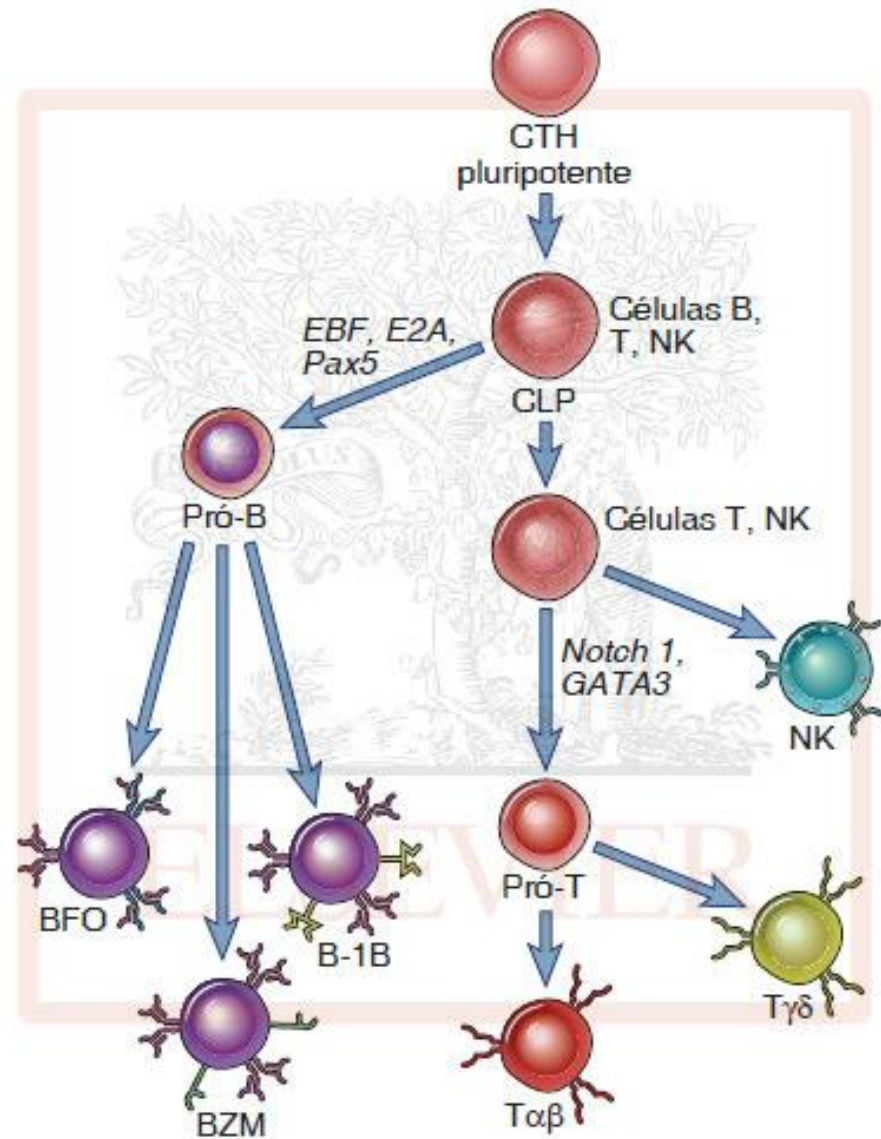
Ontogenia e maturação de linfócitos B e T

A) Origem de células B e T:

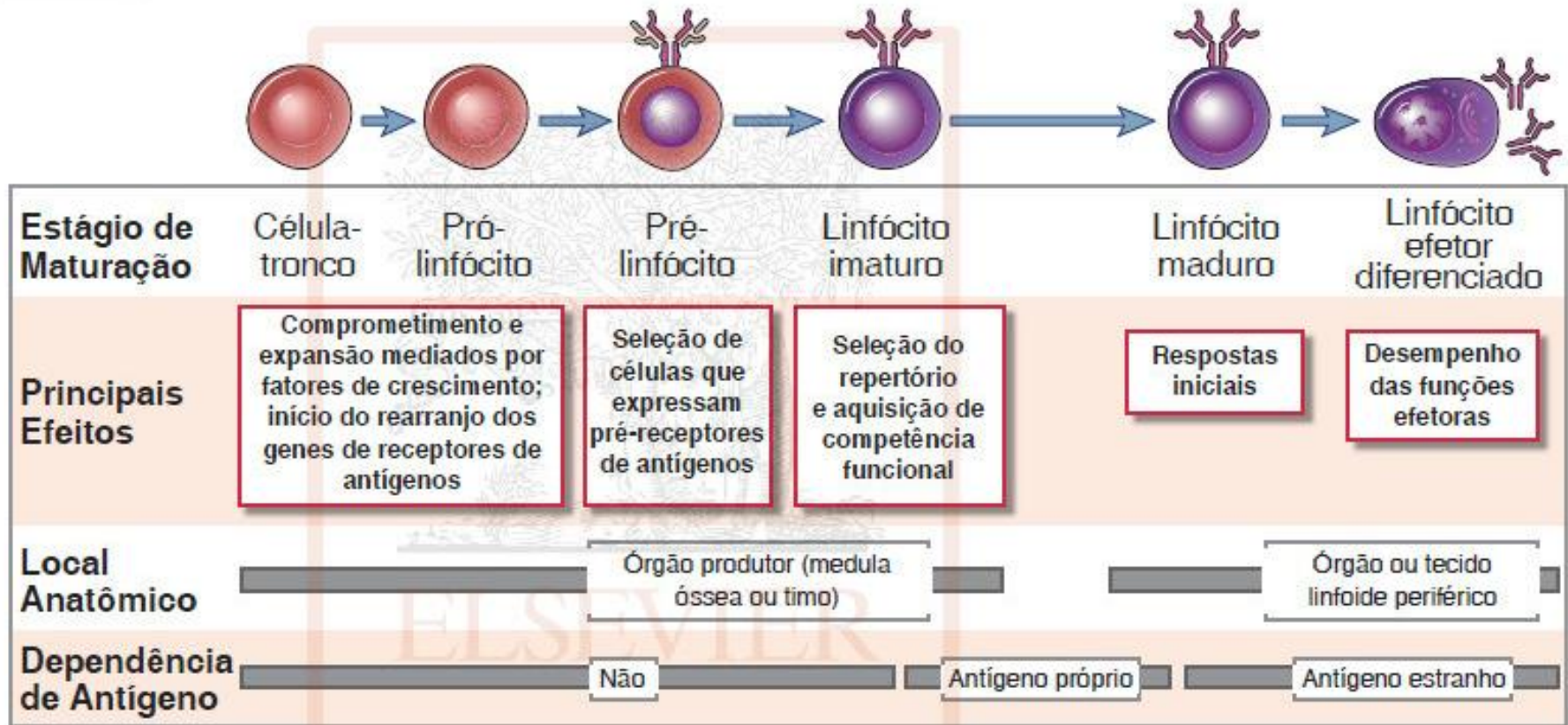
- Antes do nascimento no fígado fetal (células B1 e linfócitos T $\gamma\delta$) e após na medula óssea (BZM e BFO);

B) Maturação de linfócitos:

- **BZM:** linfócitos B da zona marginal na medula óssea
- **BFO:** linfócitos B foliculares ocorre no baço
- **T($\alpha\beta$):** linfócitos T amadurecem no timo.



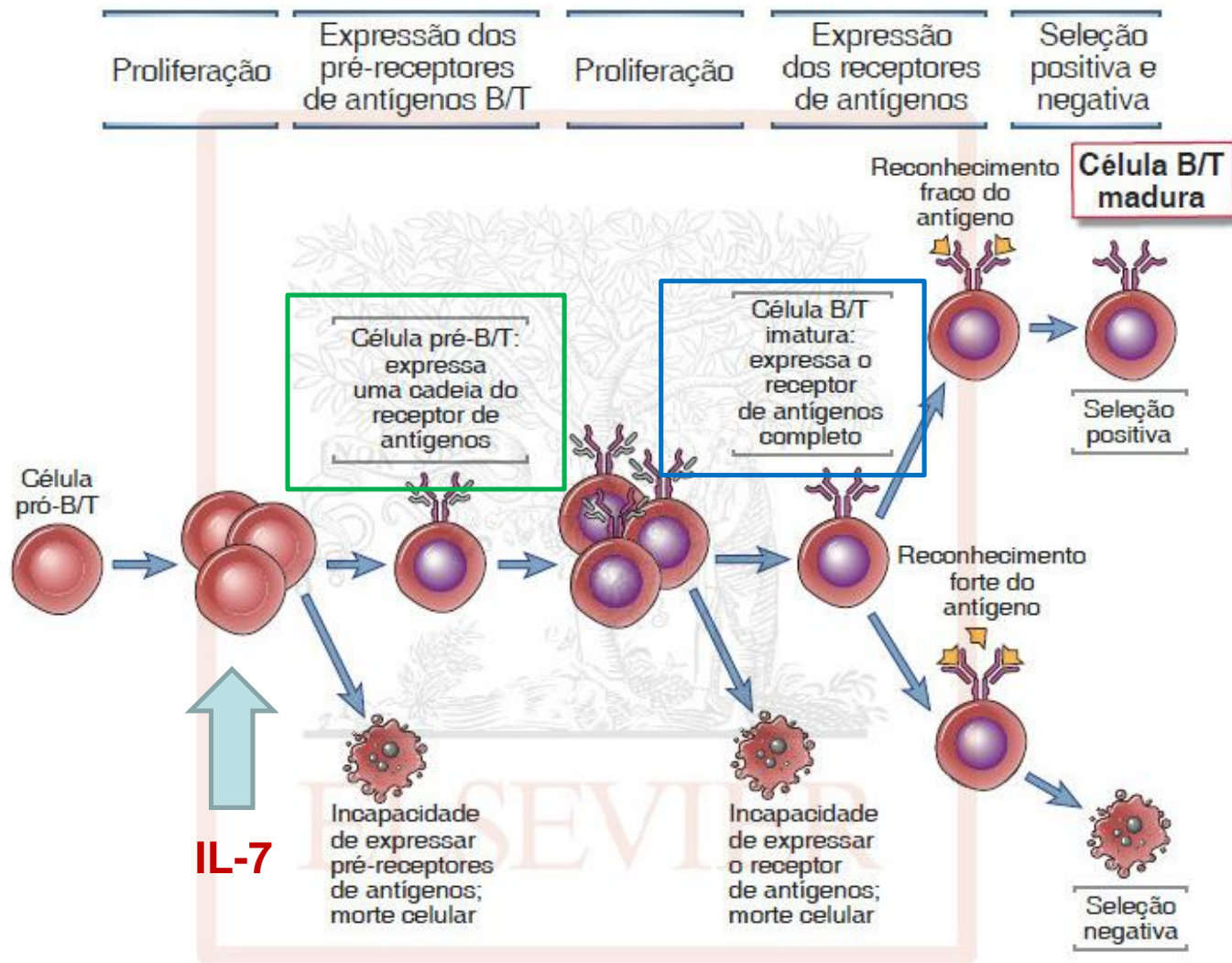
Etapas da maturação de linfócitos



IL-7 (proliferação no estágio pró-T) : produzida por células estromais da medula óssea e principalmente por células epiteliais do timo

Pré-TCR ou pré-BCR: proliferação mais massiva (independe do antígeno)

Pontos de controle



1ª Ponto de controle: Pré-BCR (a cadeia pesada μ das Ig) e pré-TCR (a cadeia β do TCR)

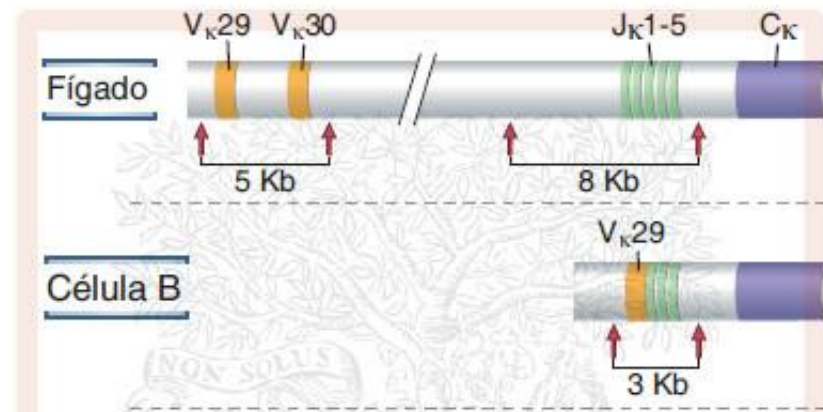
2ª Ponto de controle: Expressão do receptor completo de antígeno

Descoberta dos genes dos receptores

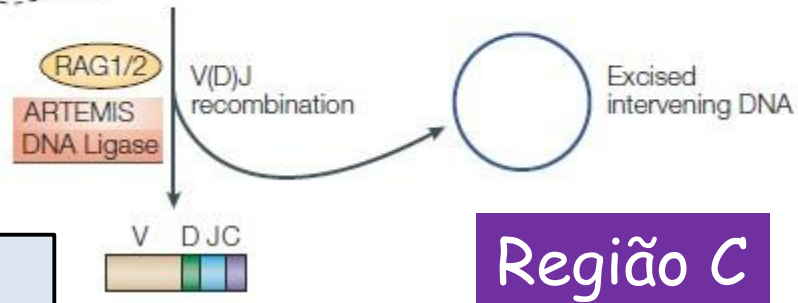
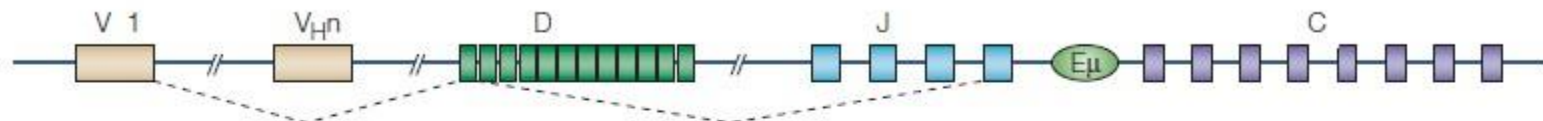
1965: Cada cadeia do anticorpo é codificada por pelo menos 2 genes (um variável e um constante), que são combinados a nível de DNA ou do RNA mensageiro para originar as proteínas Ig funcionais.

Após 2 décadas (Susumu Tonegawa): a estrutura de genes das Ig em células de um tumor que produz anticorpos, denominado **mieloma ou plasmacitoma**, é diferente daquela em tecidos não linfóides .

Os segmentos de DNA que são separados dentro dos loci hereditários que codificam as cadeias pesadas e leves das Ig são agrupados e unidos apenas em células B em desenvolvimento.



Tipos e rearranjos dos segmentos gênicos



Região V:

DNA rearranjado

Região C

Segmentos variáveis

Segmentos de diversidade

Segmentos juncionais

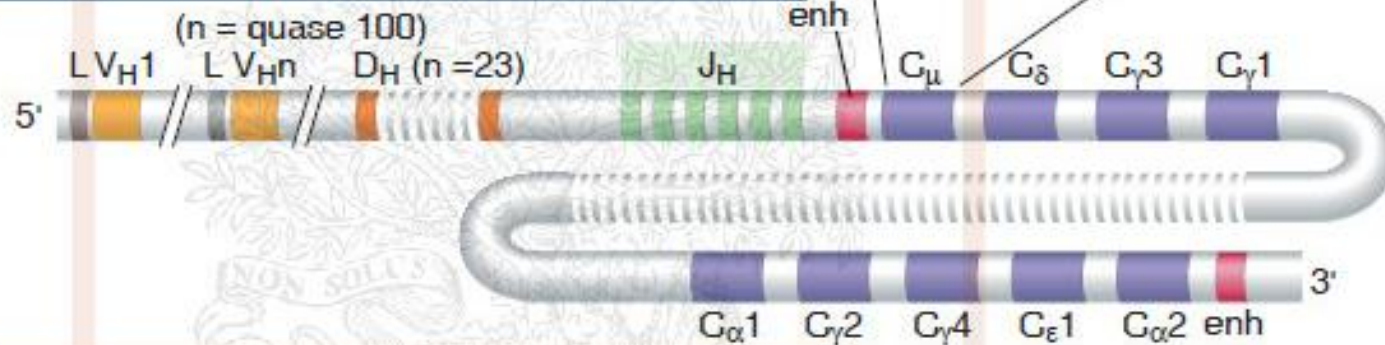
Transcrito primário de RNA

RNA mensageiro (RNAm)

Polipeptídeo BCR ou TCR

Organização do locus das Ig

Lócus da cadeia H (1.250 kb; cromossomo 14)



Lócus da cadeia κ (1.820 kb; cromossomo 2)



Lócus da cadeia λ (1.050 kb; cromossomo 22)



Número de segmentos gênicos para a região V

40 segmentos V
X 5 segmentos J
=200 regiões
diferentes κ

+

30 segmentos V
x 4 segmentos J
=120 regiões
Diferentes λ

= 320 regiões leves
diferentes

Número de segmentos gênicos funcionais nos <i>loci</i> de imunoglobulina humana			
Segmento	Cadeias leves		Cadeia pesada
	κ	λ	H
Variável (V)	34-38	29-33	38-46
Diversidade (D)	0	0	23
Junção (J)	5	4-5	6
Constante (C)	1	4-5	9

40 segmentos V
diferentes

+

23 segmentos D
diferentes

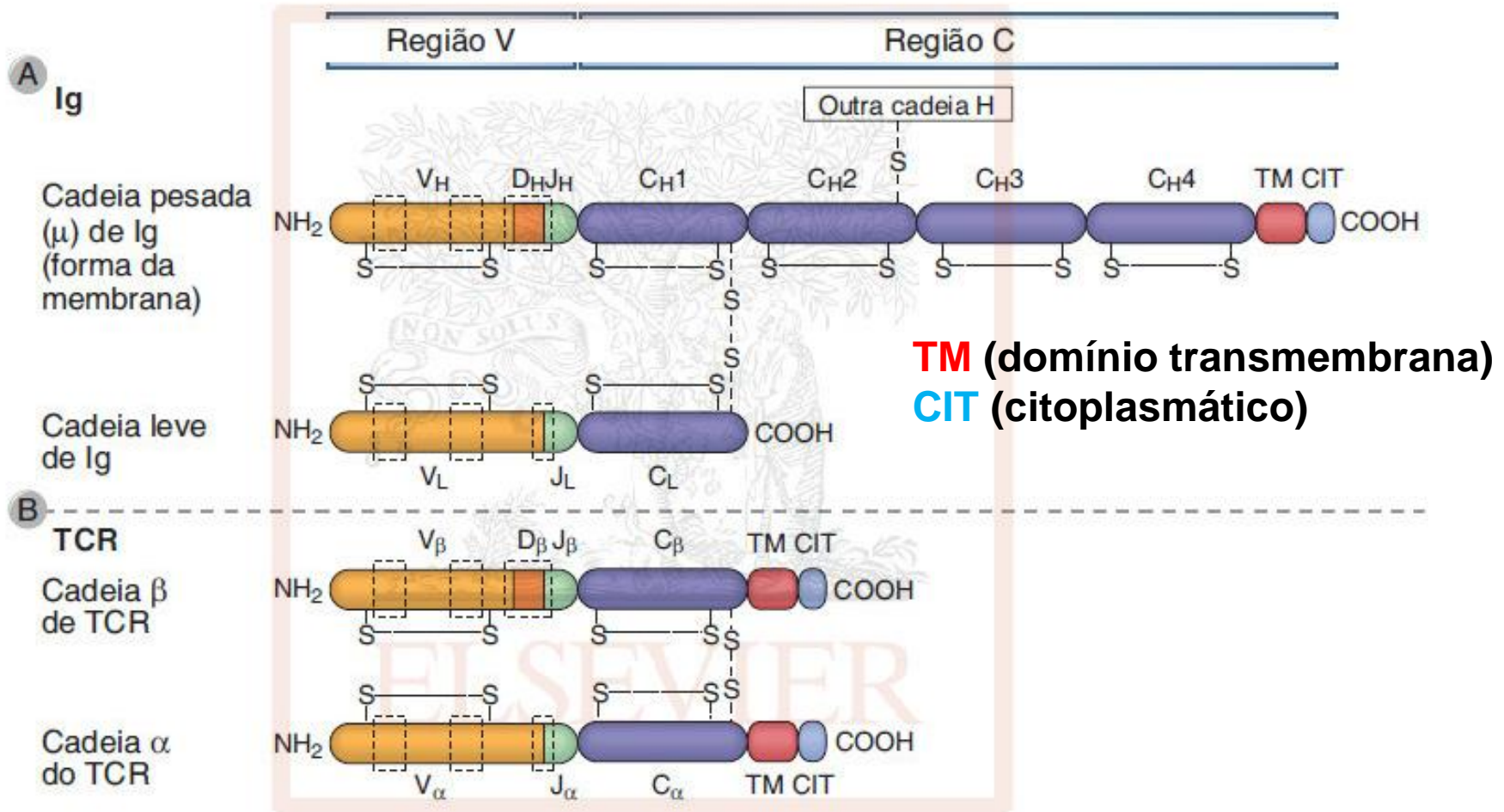
+

6 segmentos J
diferentes

= 6000 regiões VH
diferentes

$1,9 \times 10^6$ diferentes especificidades de anticorpos

Domínios das proteínas de Ig e TCR de linfócitos



Segmentos gênicos que codificam o TCR e IgM

BCR

Cadeia leve

Cadeia pesada

TCR

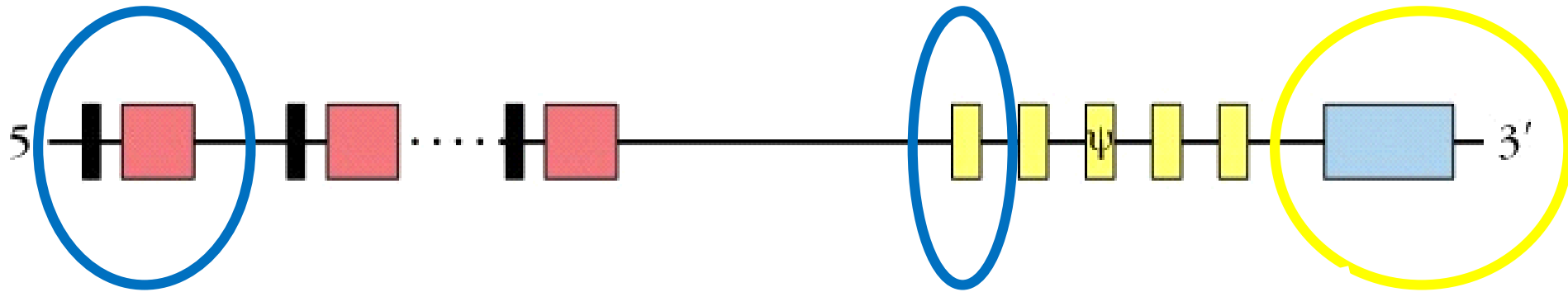
Cadeia alfa
gama ou delta

Cadeia beta

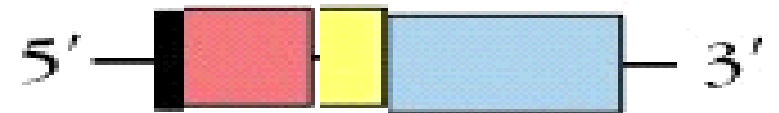
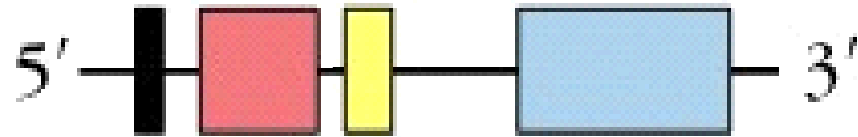
Regiões variáveis da cadeia pesada do BCR e cadeia β e δ do TCR
(segmentos V, D e J)

Região variável da cadeia leve do BCR e as
cadeias α e γ do TCR (segmentos V e J)

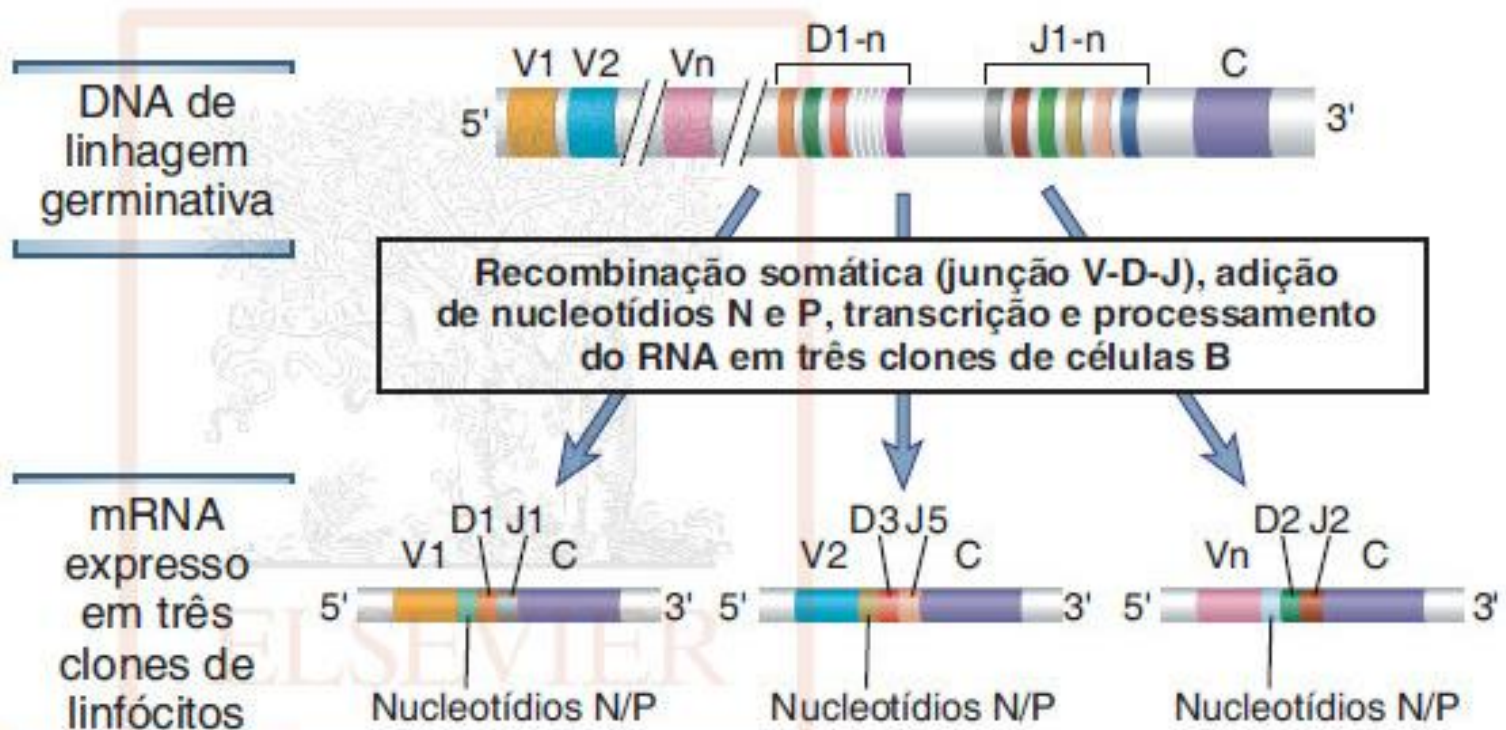
Recombinação VDJ



RAG 1 e 2 (gene ativador de recombinação) ou recombinase VDJ:
proteínas presentes somente nos linfócitos



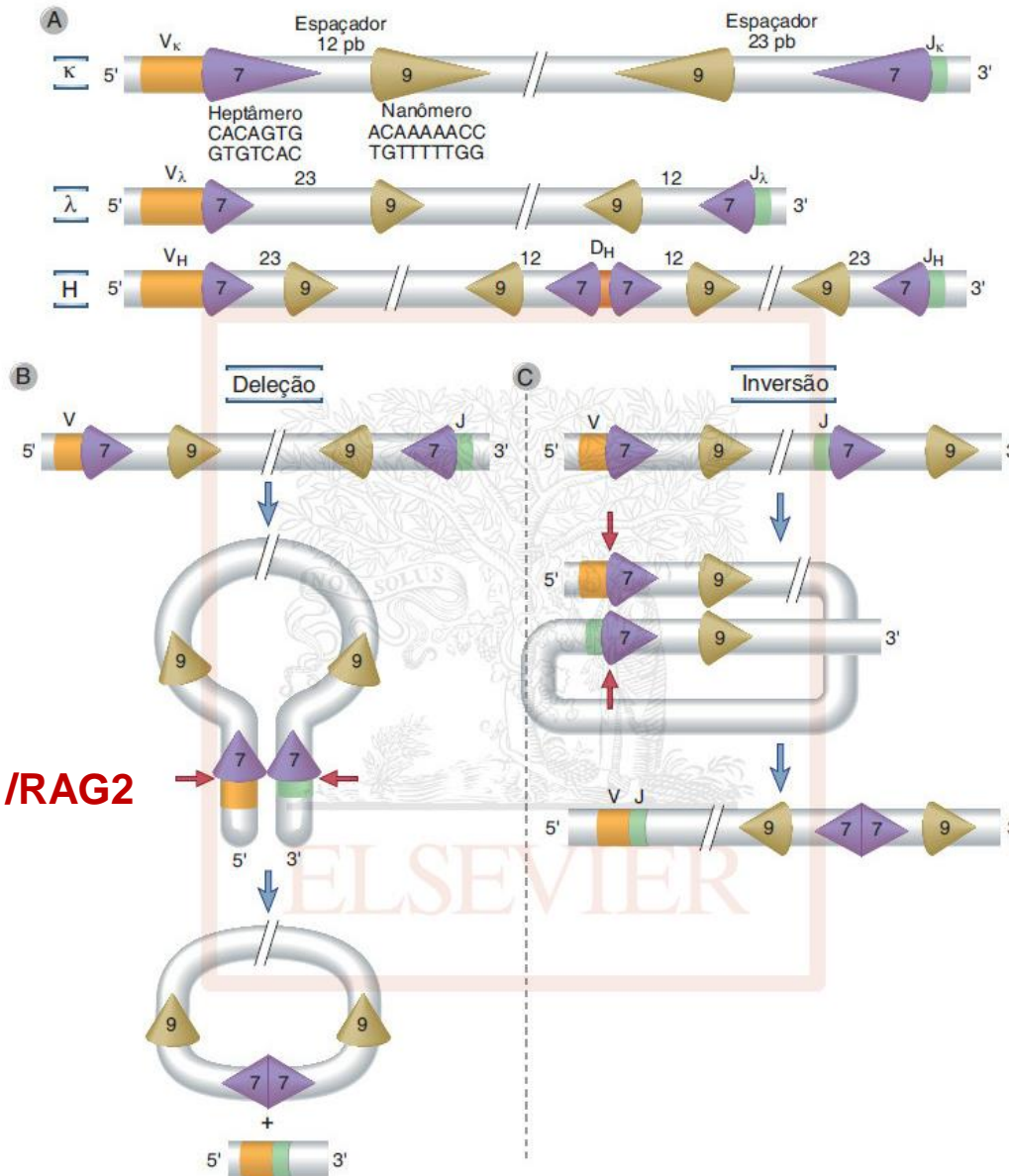
Recombinação VDJ oosomática



VDJ: único exon que codifica região variável

C: único gene que codifica região constante

Recombinação somática (VDJ)



Sequências de sinais de recombinação (RSS):

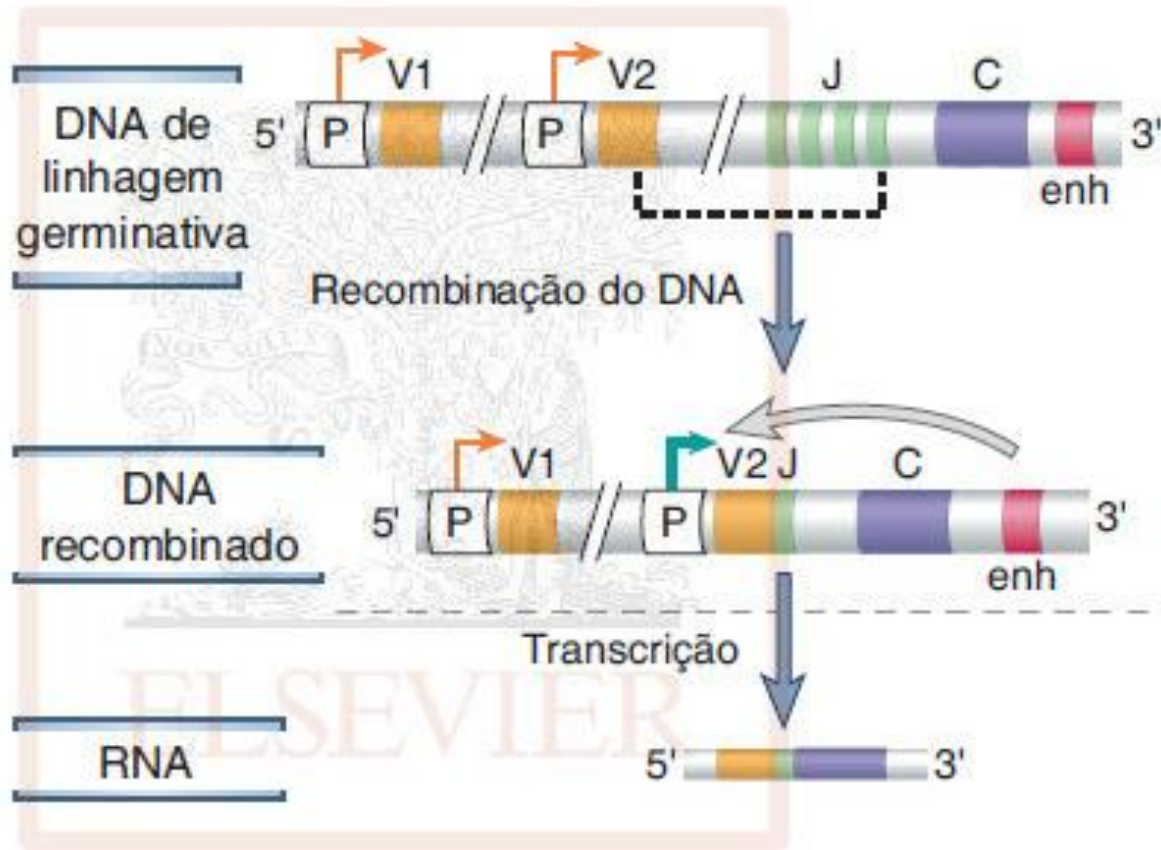
Heptâmero: sequências sinais conservadas formadas por 7 nucleotídeos (7pb)

Espaçadores: 12 ou 23 nucleotídeos não conservados

Nanômeros: sequências conservadas formadas por 9 nucleotídeos (9pb)

Setas vermelhas: locais onde as sequências são ligadas

Regulação da transcrição dos genes



Eventos sequenciais

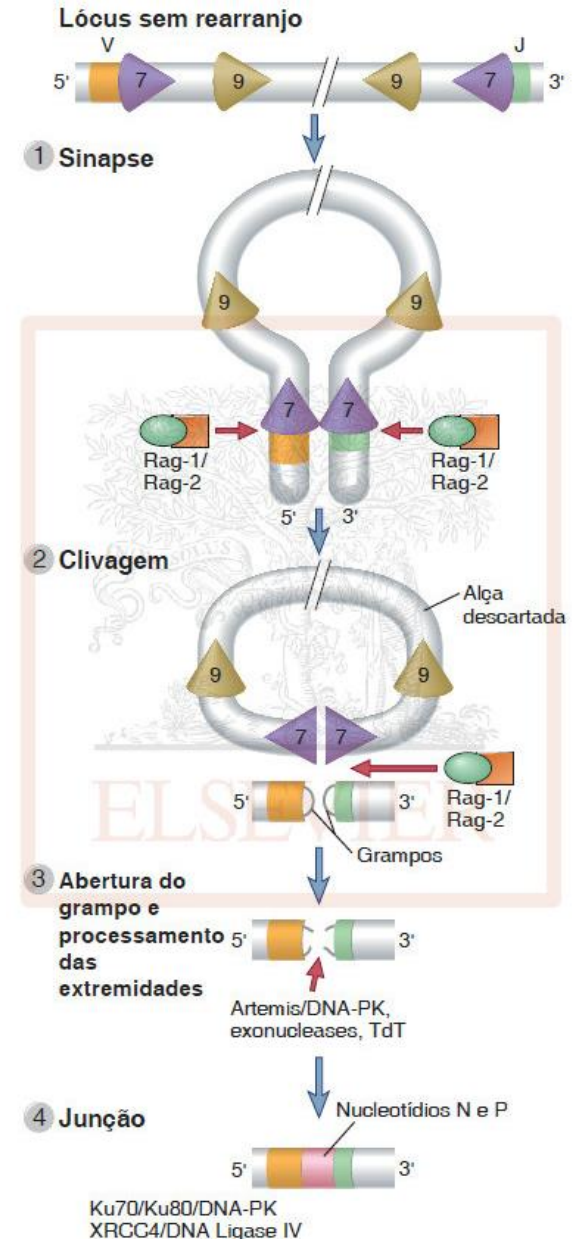
A) Sinapse: As porções do cromossomo acessíveis para a maquinaria de recombinação.

B) Clivagem: As quebras na dupla fita são realizadas nas sequências codificadoras de RSS (RAG1/2)

C) Abertura do grampo e processamento: mediada pela endonuclease Artemis e da enzima TdT acrescenta bases às extremidades quebradas

D) Junção: extremidades codificadoras clivadas são unidas e ligadas por um processo de reparo (proteínas de ligação)

Desoxinucleotidil transferase terminal (TdT)



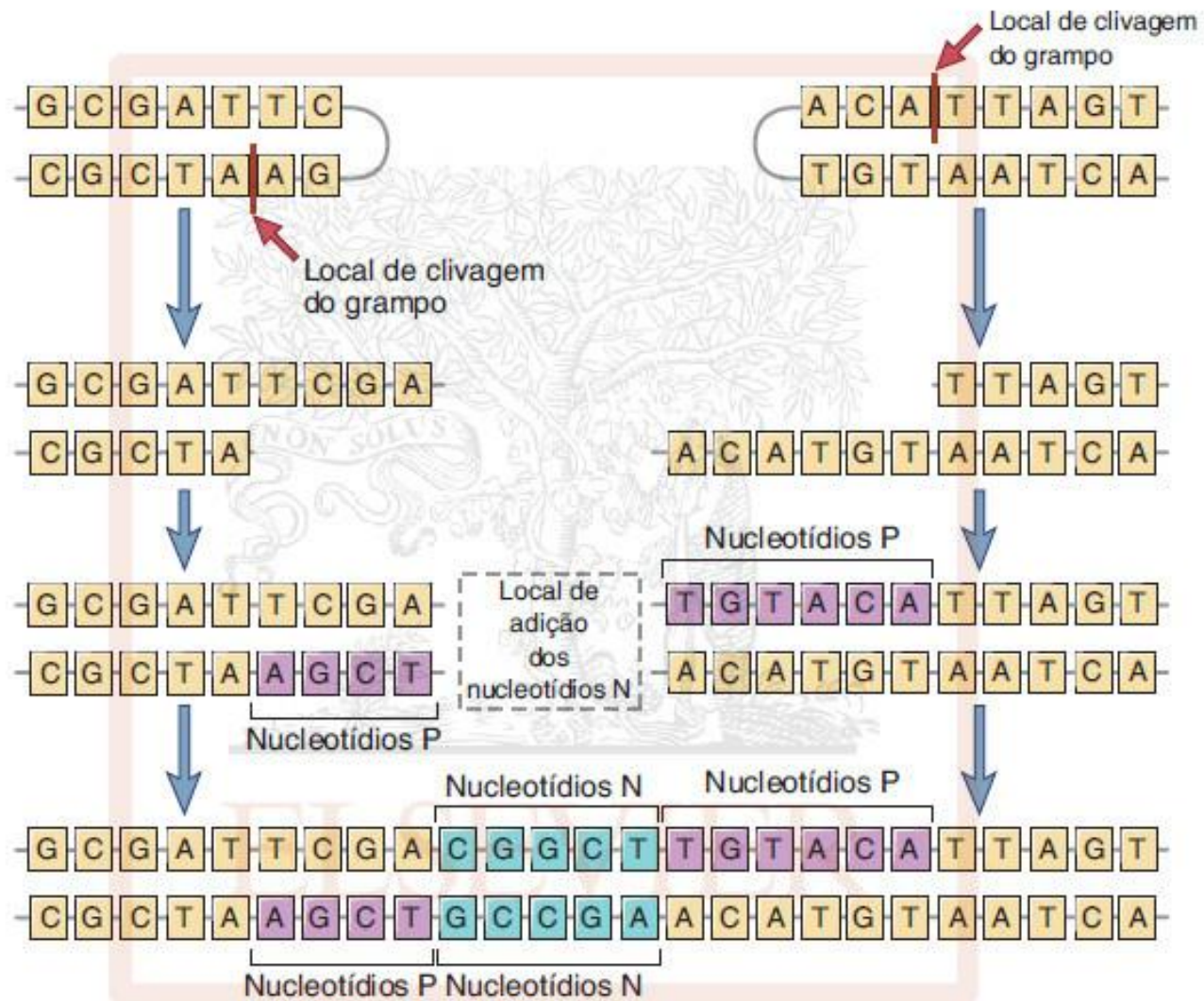
Diversidade combinatória

Mecanismos	Imunoglobulina		TCR $\alpha\beta$		TCR $\gamma\delta$	
	Cadeia pesada	κ	α	β	γ	δ
Segmentos variáveis (V)	45	35	45	50	5	2
Segmentos de diversidade (D)	23	0	0	2	0	3
Segmentos D presentes em todas as três leituras	Raros	--	--	Freqüentes	--	Freqüentes
Diversificação das regiões N	V-D, D-J	Nenhuma	V-J	V-D, D-J	V-J	V-D1, D1-D2, D1-D3
Segmentos de junção J	6	5	55	12	5	4
Repertório potencial total com a diversidade juncional	$\sim 10^{11}$		$\sim 10^{16}$		$\sim 10^{18}$	

Diversidade combinatória : É determinada por 2 mecanismos:

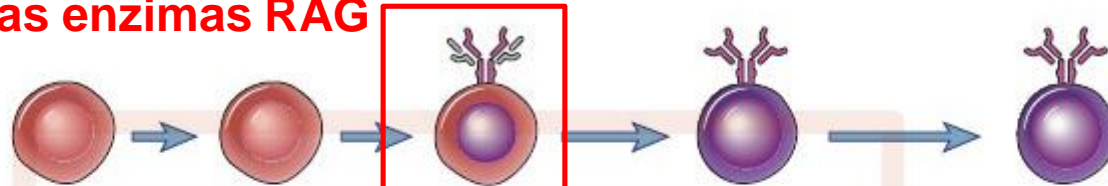
- 1) Rearranjo V(D)J aproxima vários segmentos gênicos da linhagem germinativa que podem combinar-se de forma aleatória, e diferentes combinações produzem diferentes receptores de antígenos.
- 2) Justaposição de duas regiões V diferentes geradas aleatoriamente (ou seja, V_H e V_L nas moléculas de Ig e V α e V β nas moléculas de TCR).

Diversidade juncional



Estágios de maturação do linfócitos B: Pré-B

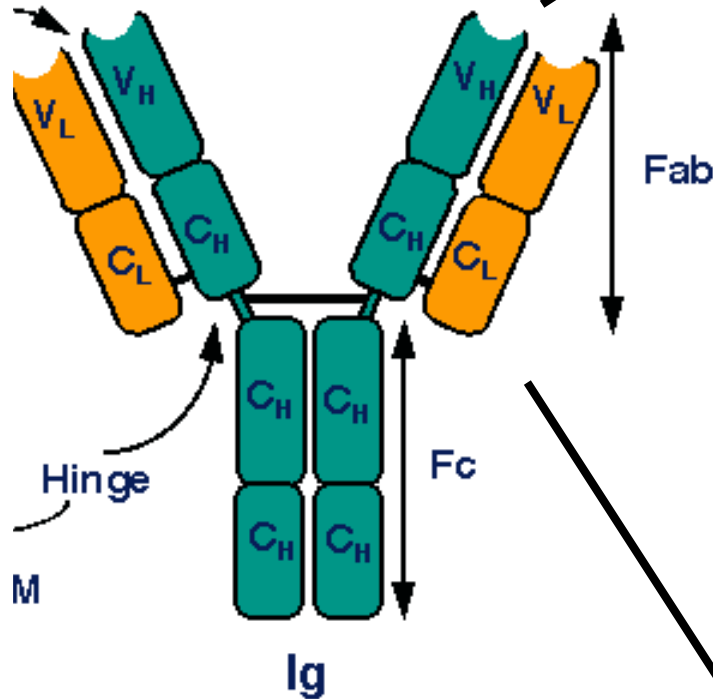
Início da ação das enzimas RAG



Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-B	Pré-B	Célula B imatura	Célula B madura
Proliferação	[Barra cinza]		[Barra cinza]		
Expressão de RAG		[Barra cinza]		[Barra cinza]	
Expressão de TdT		[Barra cinza]			
DNA, RNA das Ig	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	Gene da cadeia H recombinado (VDJ); mRNA μ	Gene da cadeia H recombinado (VDJ), gene κ ou λ (VJ); mRNA μ ou κ ou λ	<i>Splicing</i> (processamento) alternativo de VDJ-C RNA (produto de transcrição primária) para formar mRNA C_{μ} e C_{δ}
Expressão das Ig	Nenhuma	Nenhuma	μ citoplasmática e receptor pré-B – associado a μ	IgM de membrana (cadeia leve κ ou λ μ +)	IgM ou IgD da membrana
Marcadores de superfície	CD43 ⁺	CD43 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺	B220 ^{lo} CD43 ⁺	IgM ^{lo} CD43 ⁻	IgM ^{hi}
Local anatômico	[Barra cinza] Medula óssea			[Barra cinza] Periferia	
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Seleção negativa (deleção), edição do receptor	Ativação (proliferação e diferenciação)

Receptores de células Pré-B

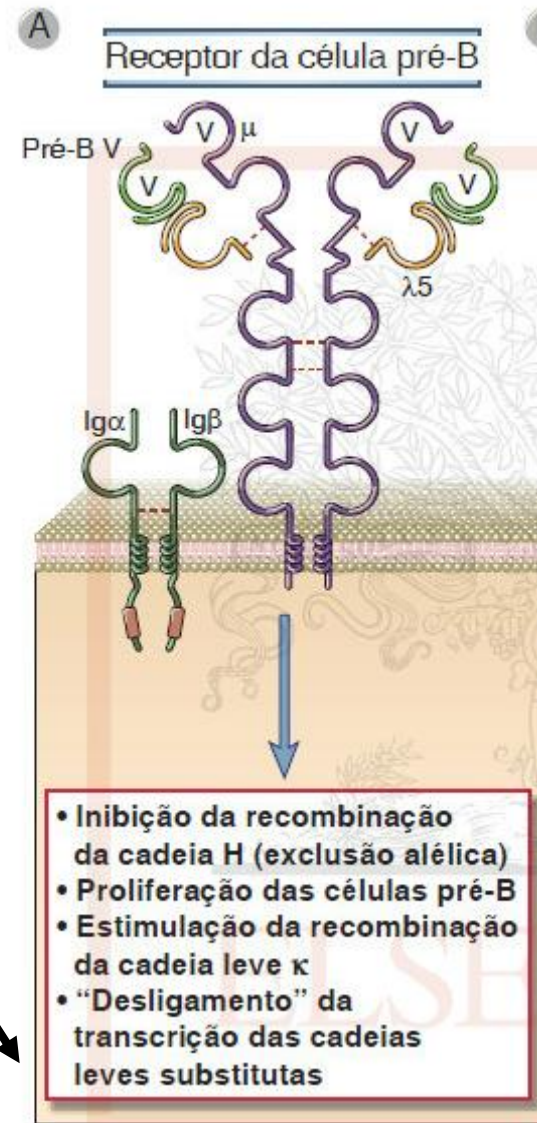
2 sítios de ligação
ao antígeno



2 cadeias pesadas

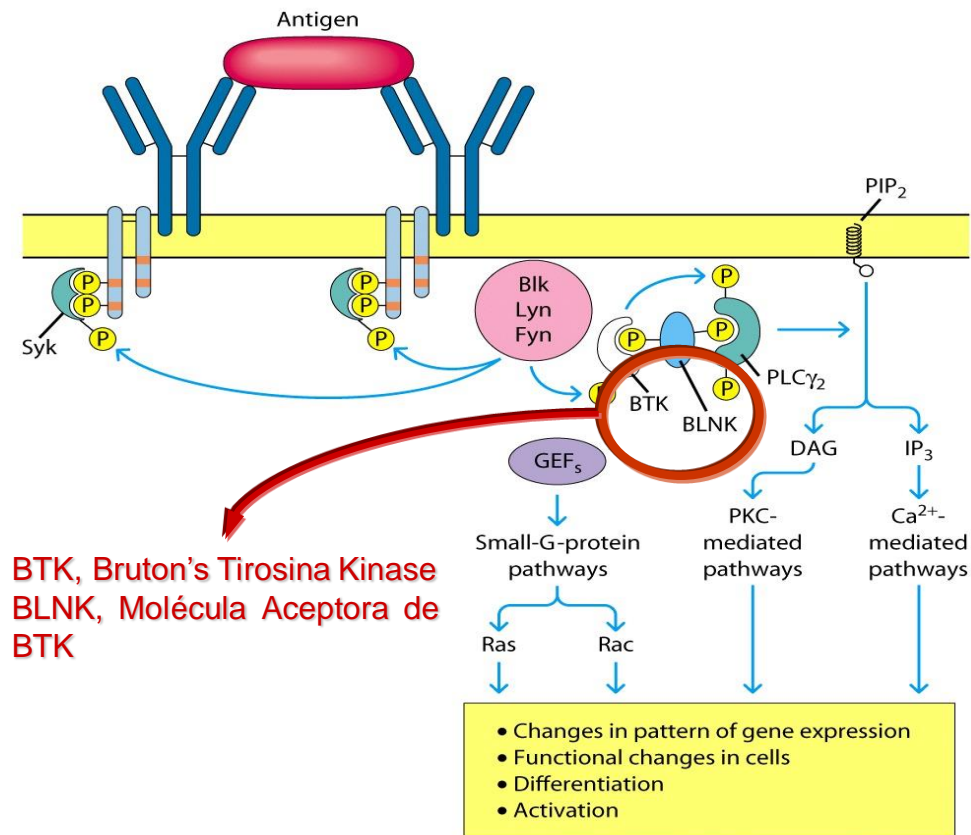
2 cadeias leves substitutas (V λ5):

são homólogas, mas não são variáveis



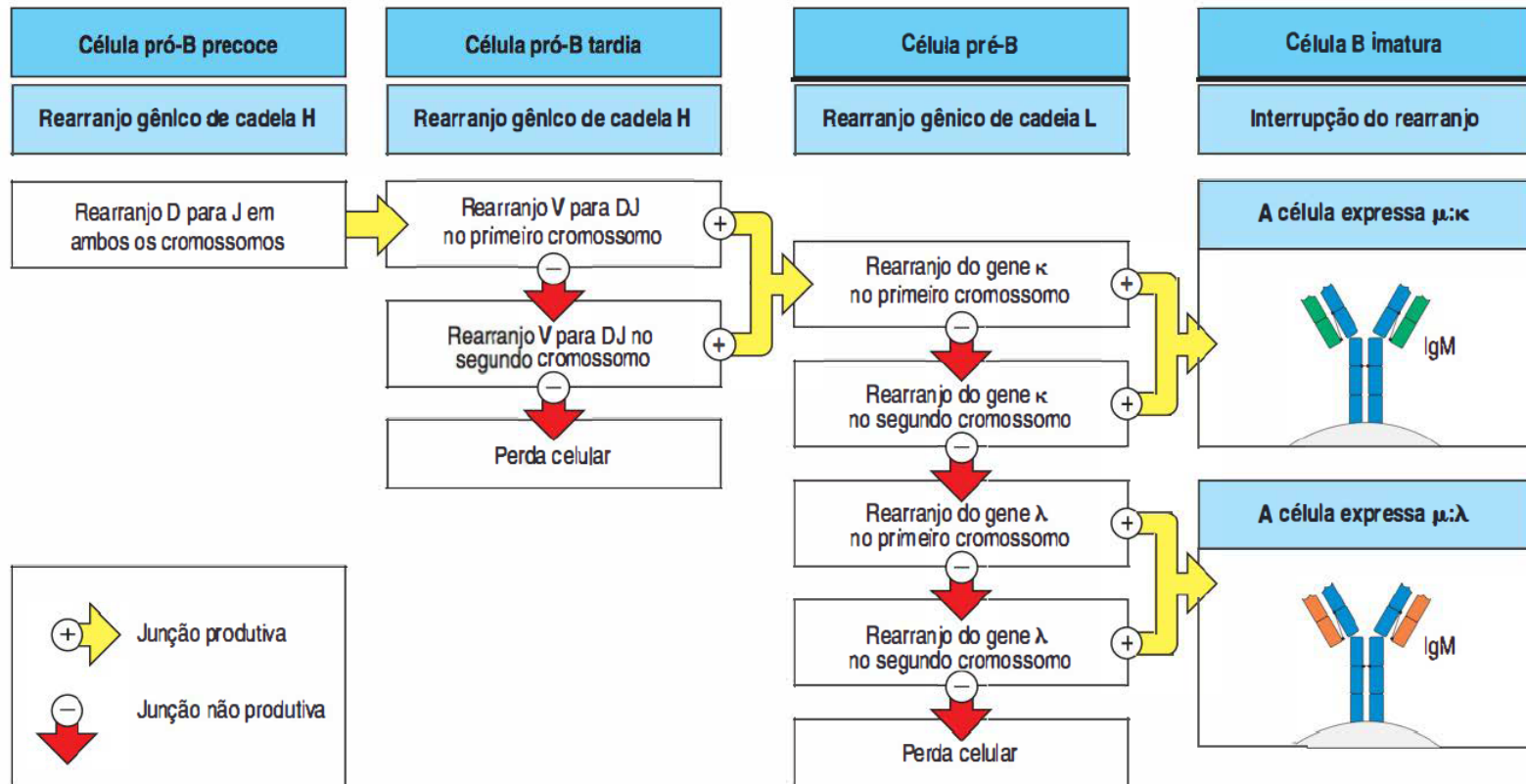
Agamaglobulinemia de Bruton

- 1) **Imunodeficiência denominada agamaglobulinemia de Bruton, é causada por mutações ou deleções no gene que codifica uma enzima chamada tirosinoquinase de Bruton (Btk)**
- 2) **Caracterizada Ig sérica baixa ou indetectável. Em mulheres portadoras da doença, apenas as células B que inativaram o cromossomo X portador do alelo mutante amadurecem.**

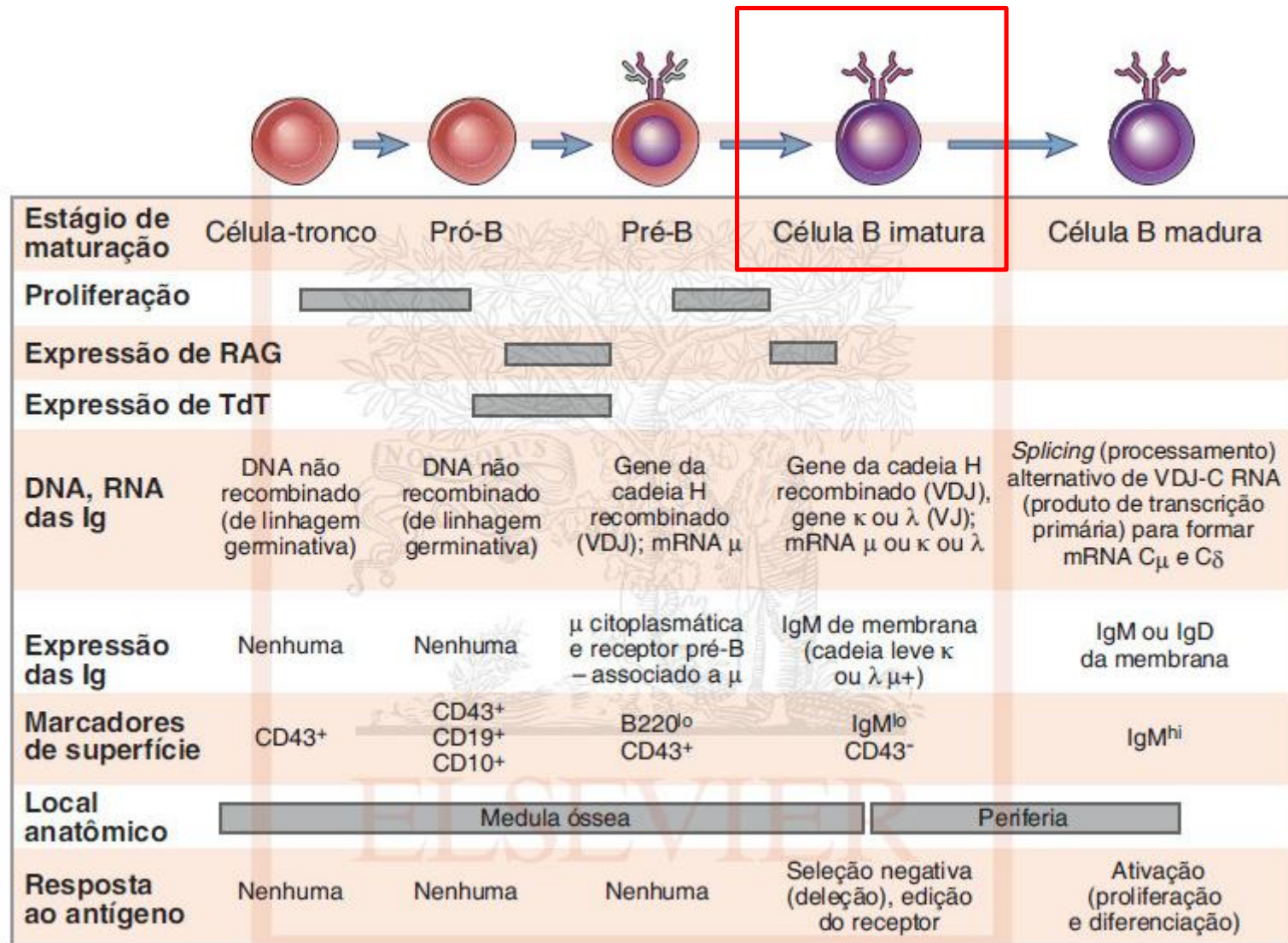


Exclusão alélica

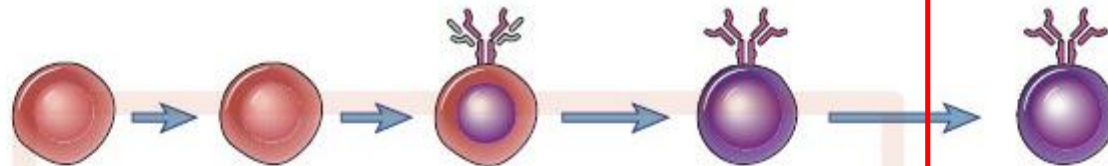
Decorre do rearranjo produtivo de somente um dos dois alelos IgH na célula B, porque a produção de um rearranjo bem-sucedido de cadeia pesada de imunoglobulina sinaliza a interrupção dos rearranjos posteriores nos genes de cadeia pesada.



Estágios de maturação do linfócitos B: Célula B imatura



Estágios de maturação do linfócitos B: Célula B madura



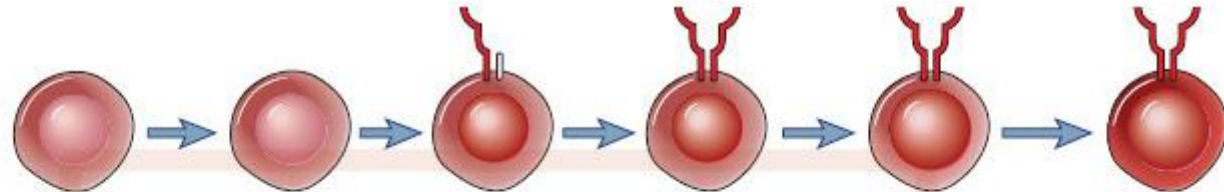
Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-B	Pré-B	Célula B imatura	Célula B madura
Proliferação	[Barra cinza]		[Barra cinza]		
Expressão de RAG		[Barra cinza]		[Barra cinza]	
Expressão de TdT		[Barra cinza]			
DNA, RNA das Ig	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	Gene da cadeia H recombinado (VDJ); mRNA μ	Gene da cadeia H recombinado (VDJ), gene κ ou λ (VJ); mRNA μ ou κ ou λ	<i>Splicing</i> (processamento) alternativo de VDJ-C RNA (produto de transcrição primária) para formar mRNA C_{μ} e C_{δ}
Expressão das Ig	Nenhuma	Nenhuma	μ citoplasmática e receptor pré-B – associado a μ	IgM de membrana (cadeia leve κ ou λ μ +)	IgM ou IgD da membrana
Marcadores de superfície	CD43 ⁺	CD43 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺	B220 ^{lo} CD43 ⁺	IgM ^{lo} CD43 ⁻	IgM ^{hi}
Local anatômico	[Barra cinza] Medula óssea			[Barra cinza] Periferia	
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Seleção negativa (deleção), edição do receptor	Ativação (proliferação e diferenciação)

Imunodeficiências combinada grave (SCID)

- 1) **SCID são imunodeficiências congênitas que afetam tanto a imunidade celular e humoral.**
- 2) **SCID ligada ao X (cromossomo X):** Deficiência da cadeia γ (receptor da IL-2, IL-7 e IL-15) e um bloqueio no desenvolvimento das células T (falta da IL-7) e células NK (falta da IL-15), mas com ou sem defeitos no desenvolvimento das células B .
- 3) **Deficiência das enzimas Rag1/2 ou Artemis:** Doenças mais raras caracterizada pela ausência total de linfócitos.

- Infecções oportunistas graves e recorrentes (*C. albicans*);
- Diarréia prolongada: Infecções intestinais;
- Pneumonia: *Pneumocystis carinii*;
- Vacinas com organismos atenuados levam a morte por infecção progressiva;
- Tratamento: Transplante de medula óssea (autólogo)

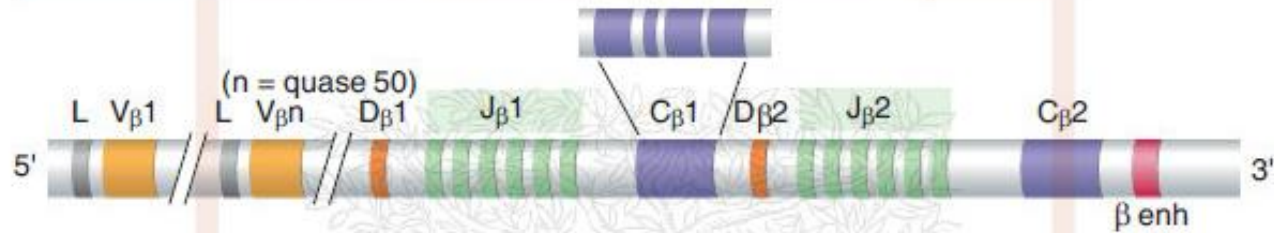
Estágios de maturação das células T



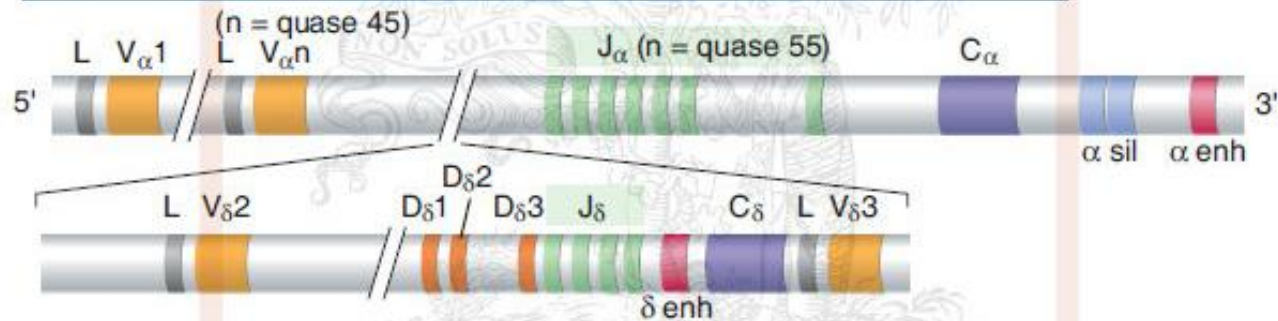
Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-T	Pré-T	Duplo-positivo	Positivo simples (célula T imatura)	Célula T madura virgem
Proliferação	■	■	■			
Expressão de RAG		■	■	■		
Expressão de TdT		■	■			
DNA, RNA do TCR	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	DNA não recombinado (de linhagem germinativa)	Gene da cadeia β recombinado [V(D)J-C]; mRNA da cadeia β	Genes das cadeias β e α recombinados [V(D)J-C]; mRNA das cadeias β e α	Genes das cadeias β e α recombinados [V(D)J-C]; mRNA das cadeias β e α	Genes das cadeias β e α recombinados [V(D)J-C]; mRNA das cadeias β e α
Expressão do TCR	Nenhuma	Nenhuma	Receptor pré-T (cadeia β/ pré-T α)	TCR αβ da membrana	TCR αβ da membrana	TCR αβ da membrana
Marcadores de superfície	<i>c-kit</i> ⁺ CD44 ⁺ CD25 ⁻	<i>c-kit</i> ⁺ CD44 ⁺ CD25 ⁺	<i>c-kit</i> ⁺ CD44 ⁻ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺ TCR/CD3 ^{lo}	CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺ TCR/CD3 ^{hi}	CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺ TCR/CD3 ^{hi}
Local anatômico	Medula óssea	Timo				Periferia
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Seleção positiva e negativa		Ativação (proliferação e diferenciação)

Organização do locus do TCR

Lócus da cadeia β do TCR humano (620 kb; cromossomo 7)



Lócus das cadeias α , δ dos TCR humano (1.000 kb; cromossomo 14)

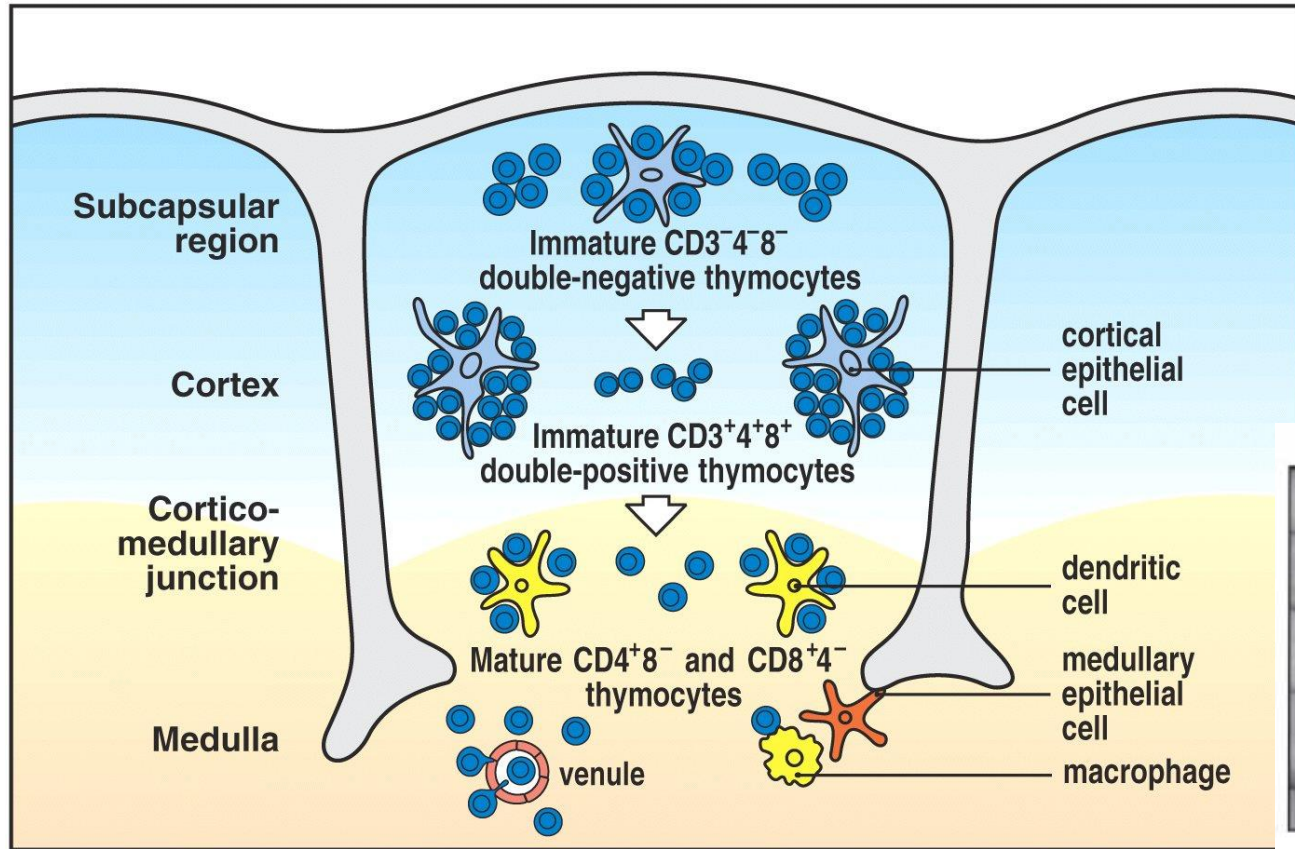


Lócus da cadeia γ do TCR humano (200 kb; cromossomo 7)



Compartimentalização do timo

As células T em desenvolvimento no timo são denominadas timócitos.
Os timócitos mais imaturos são encontrados no seio subcapsular e na região cortical exterior do timo.

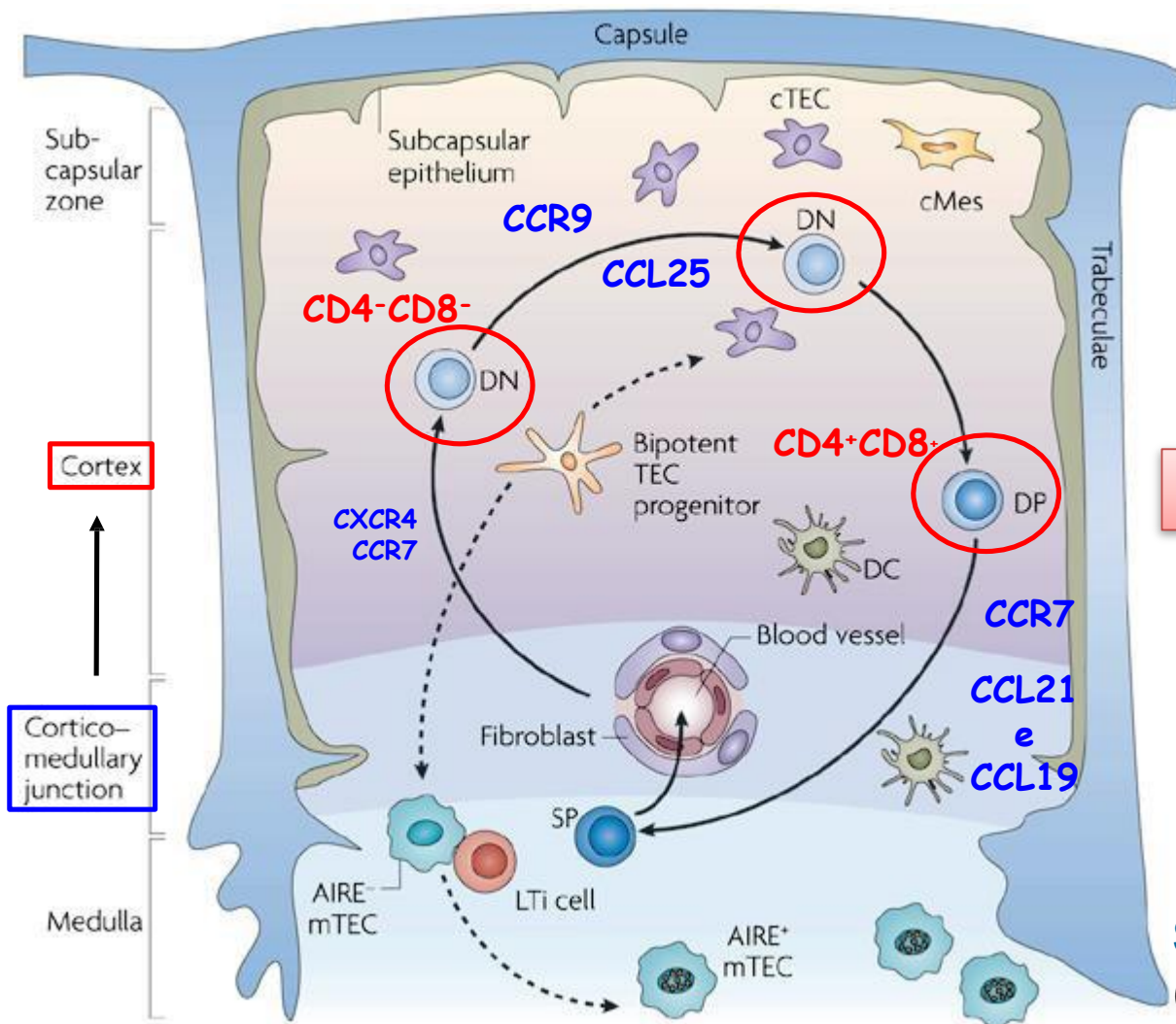


**Camundongos nude
(Foxn1)**



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

Maturação dos timócitos



cTEC: células epiteliais corticais tímicas

mTEC: células epiteliais medulares tímicas

Expressão do TCR

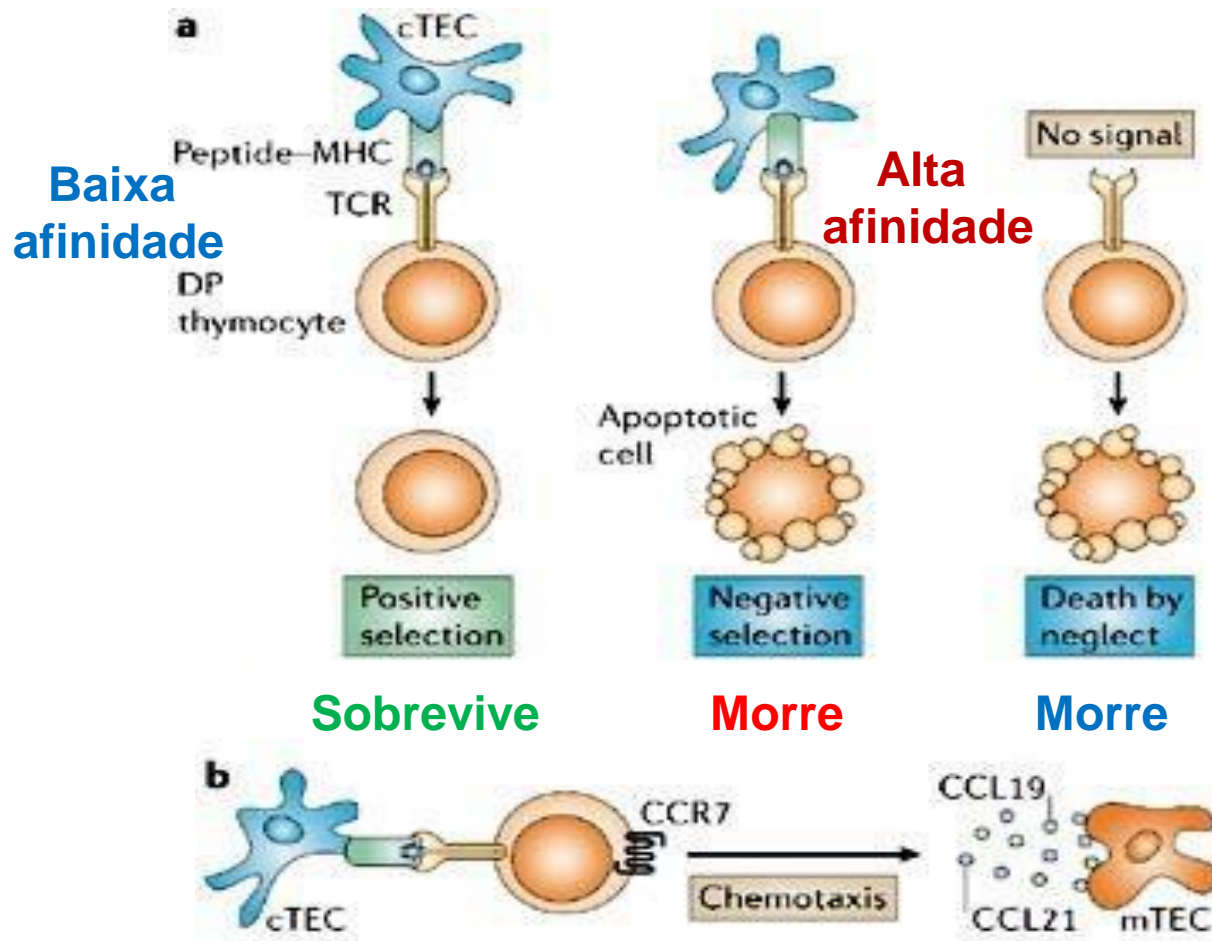
DC: células dendríticas

DN: linfócitos duplo negativos

DP: linfócitos duplo positivos (CD4 e CD8)

SP: linfócitos simples positivos (CD4 ou CD8)

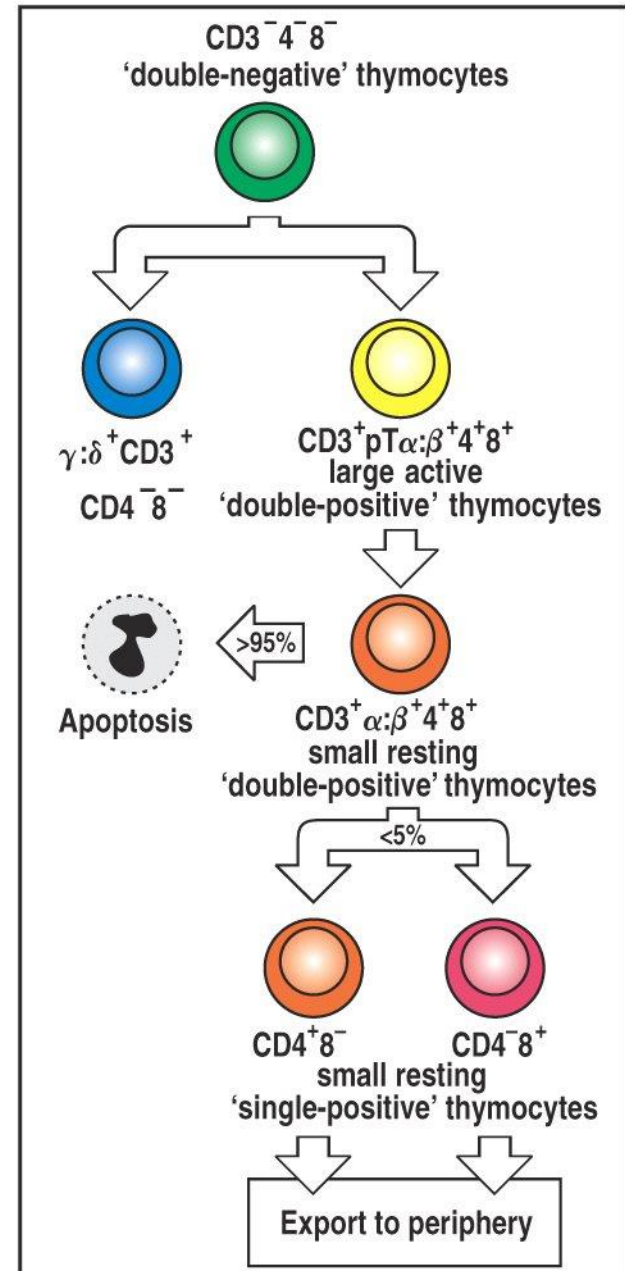
Migração dos timócitos do córtex para a medula



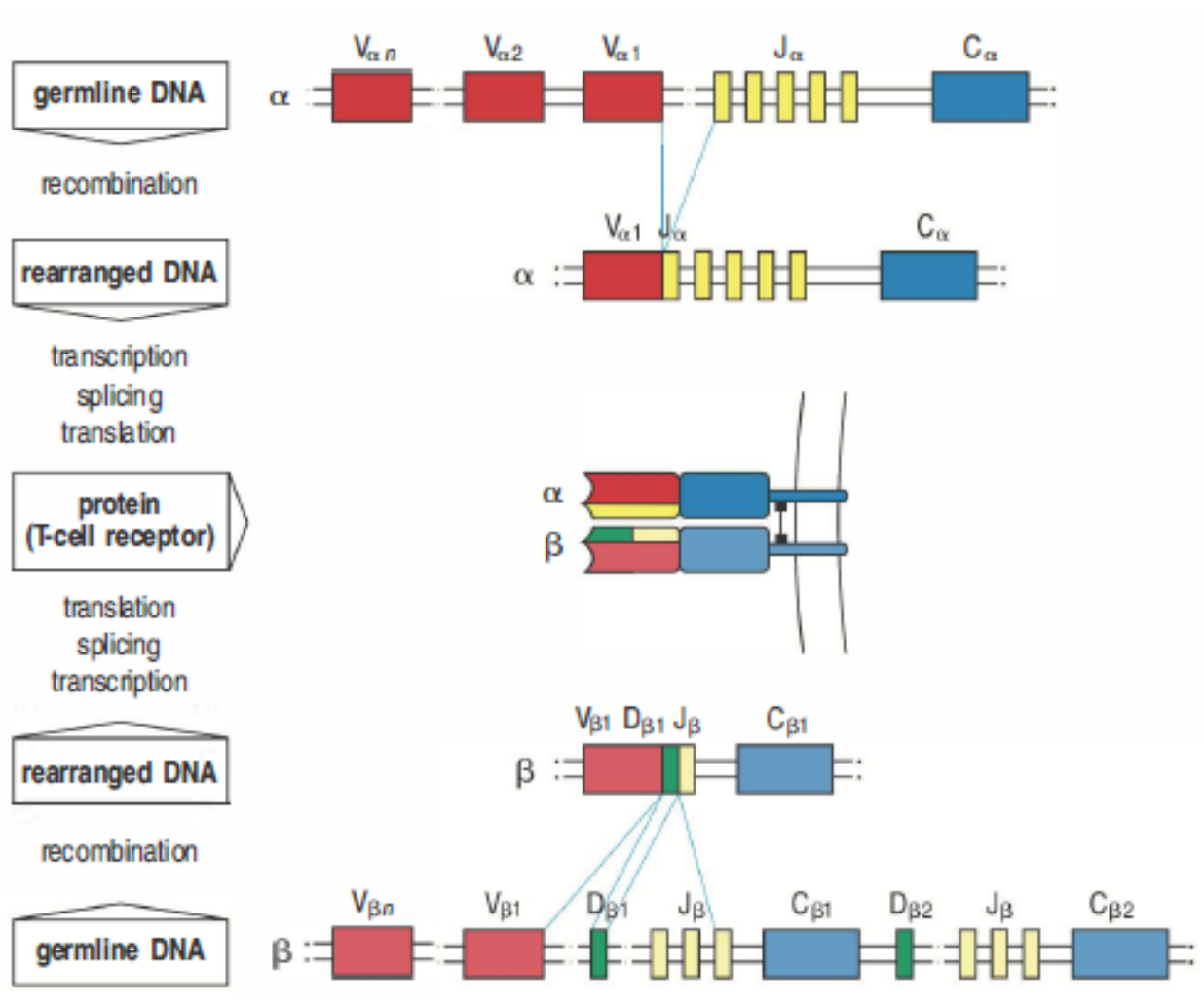
Estágios de maturação

- **Células T em desenvolvimento:** timócitos;
- **Região subcapsular:** timócitos duplo negativos (pró-T)
- **Região cortical:** timócitos TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ duplo positivos (CD4 e CD8);
- **Região medular:** timócitos simples-positivos CD4 ou CD8

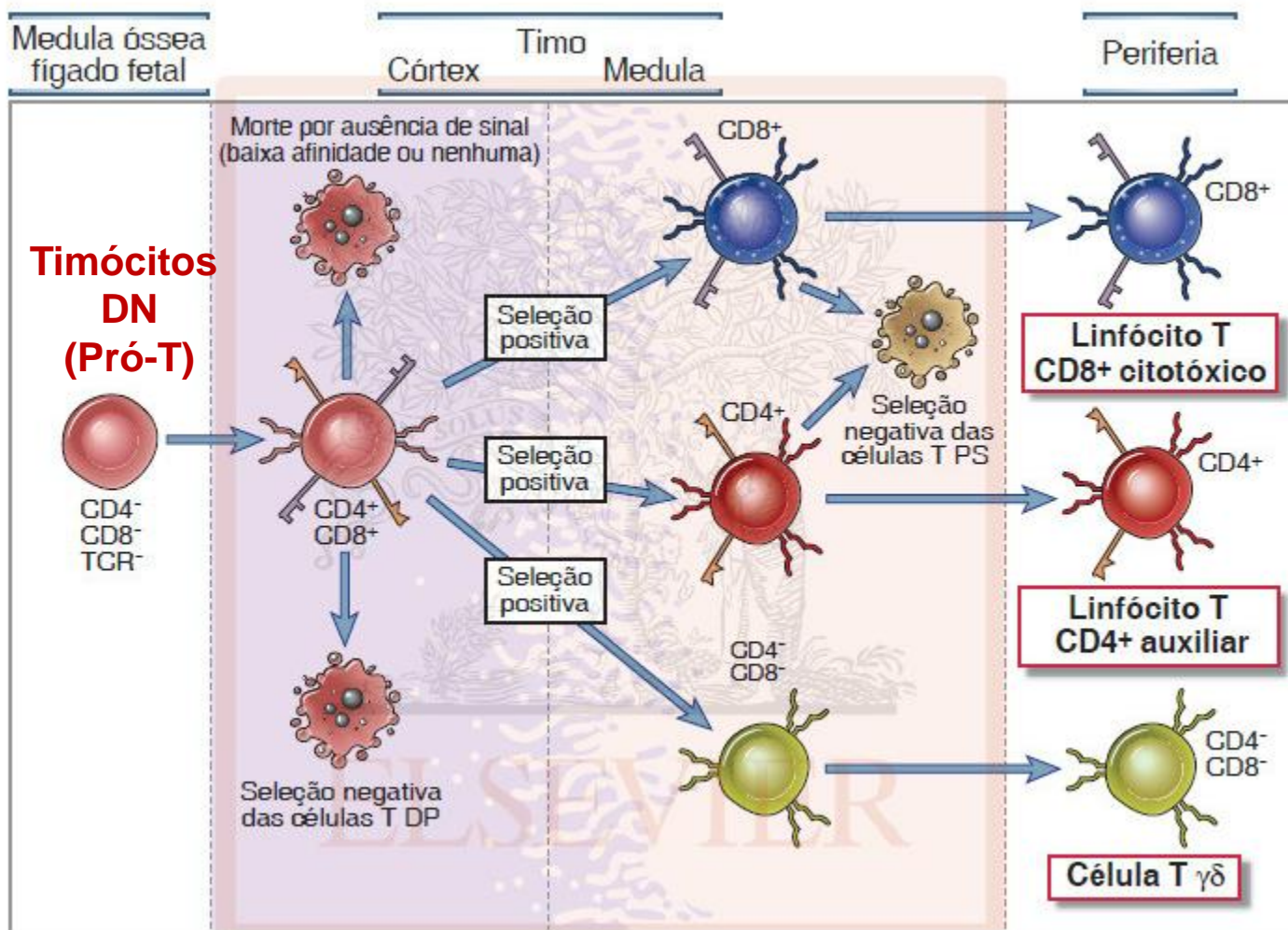
IL-7: fator de crescimento linfopoiético (células do estroma tímico)



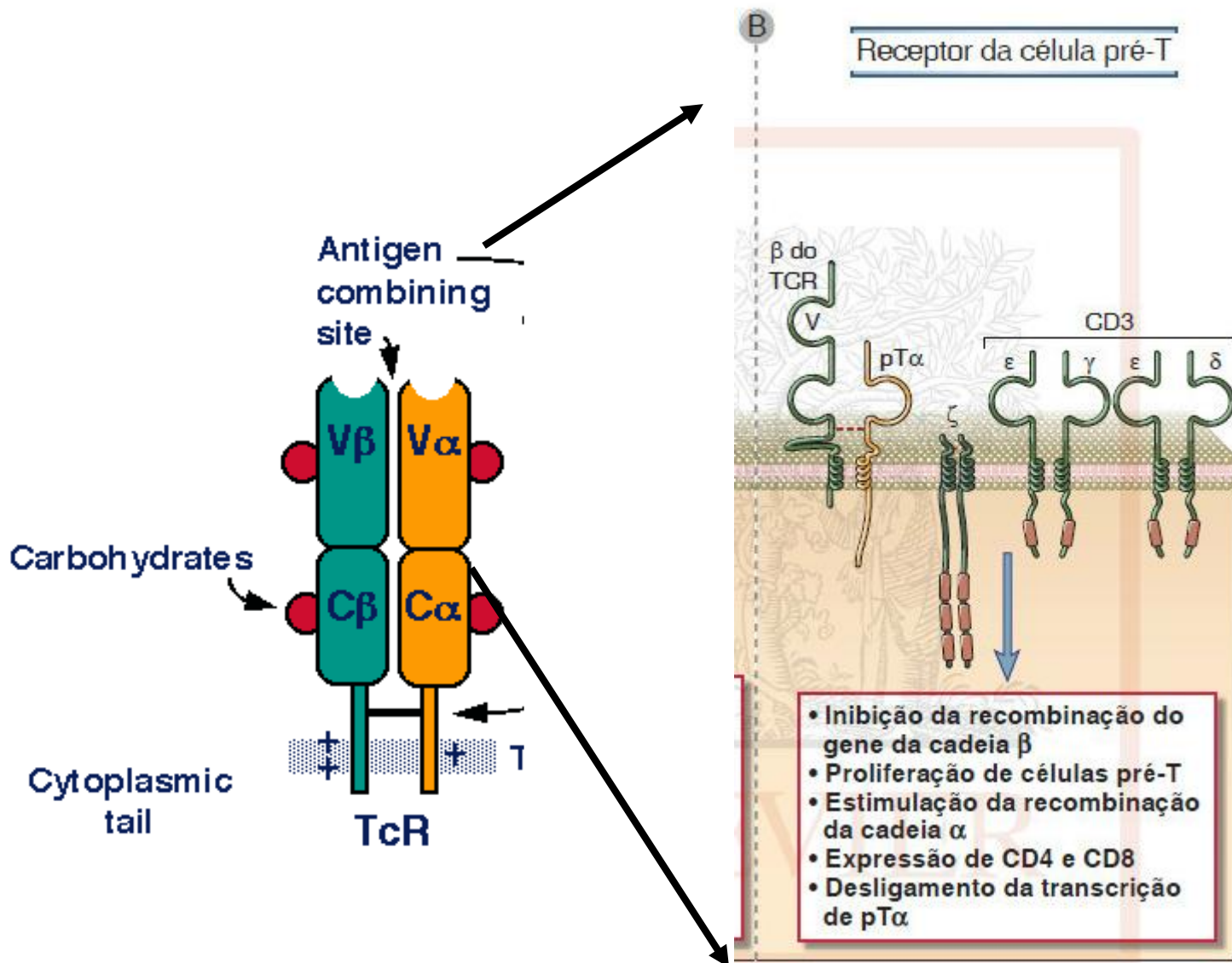
Rearranjos das cadeias α e β do TCR



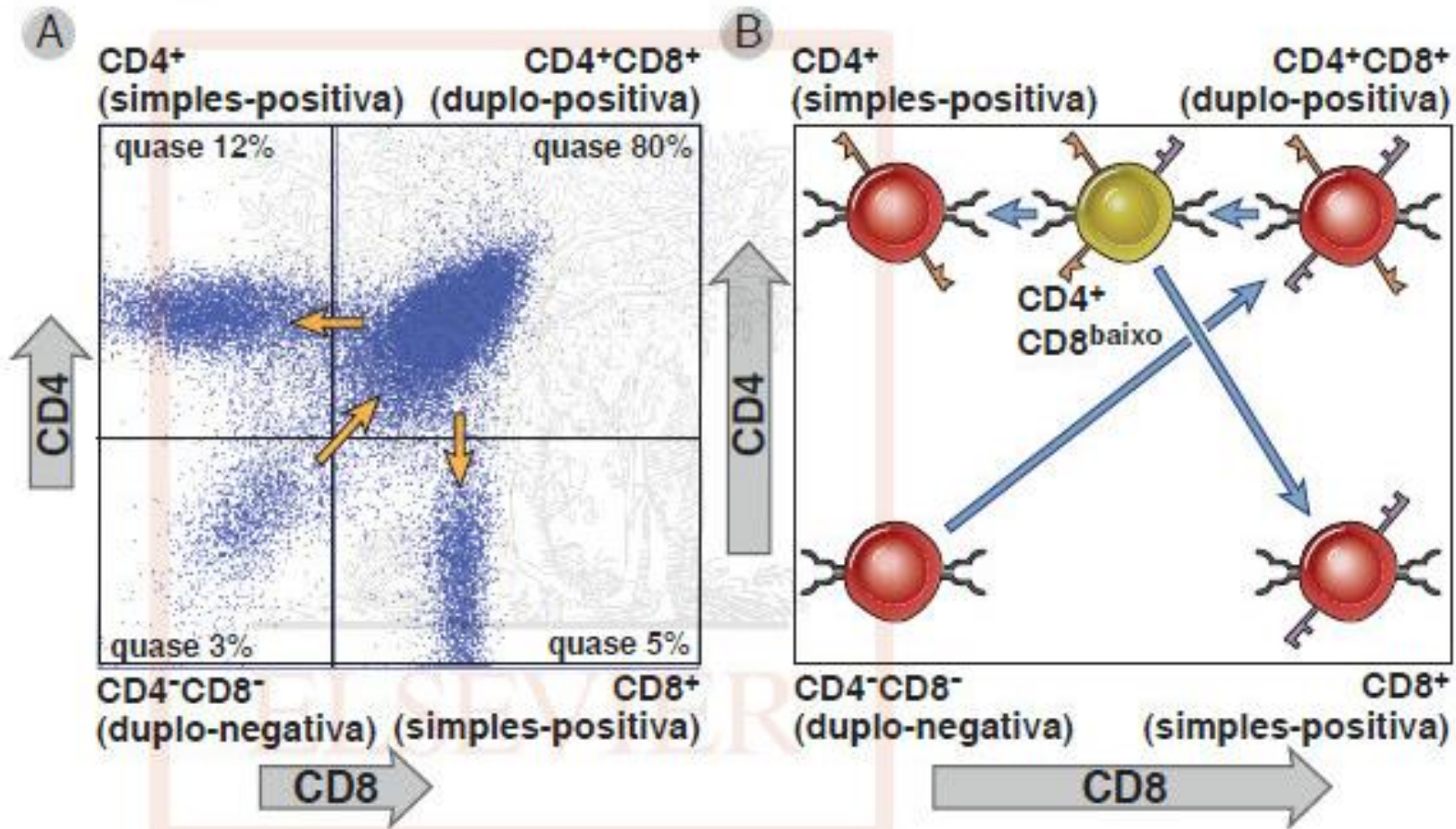
Maturação dos linfócitos T no timo: Linfócito Pró-T



Receptores de linfócitos pré-T

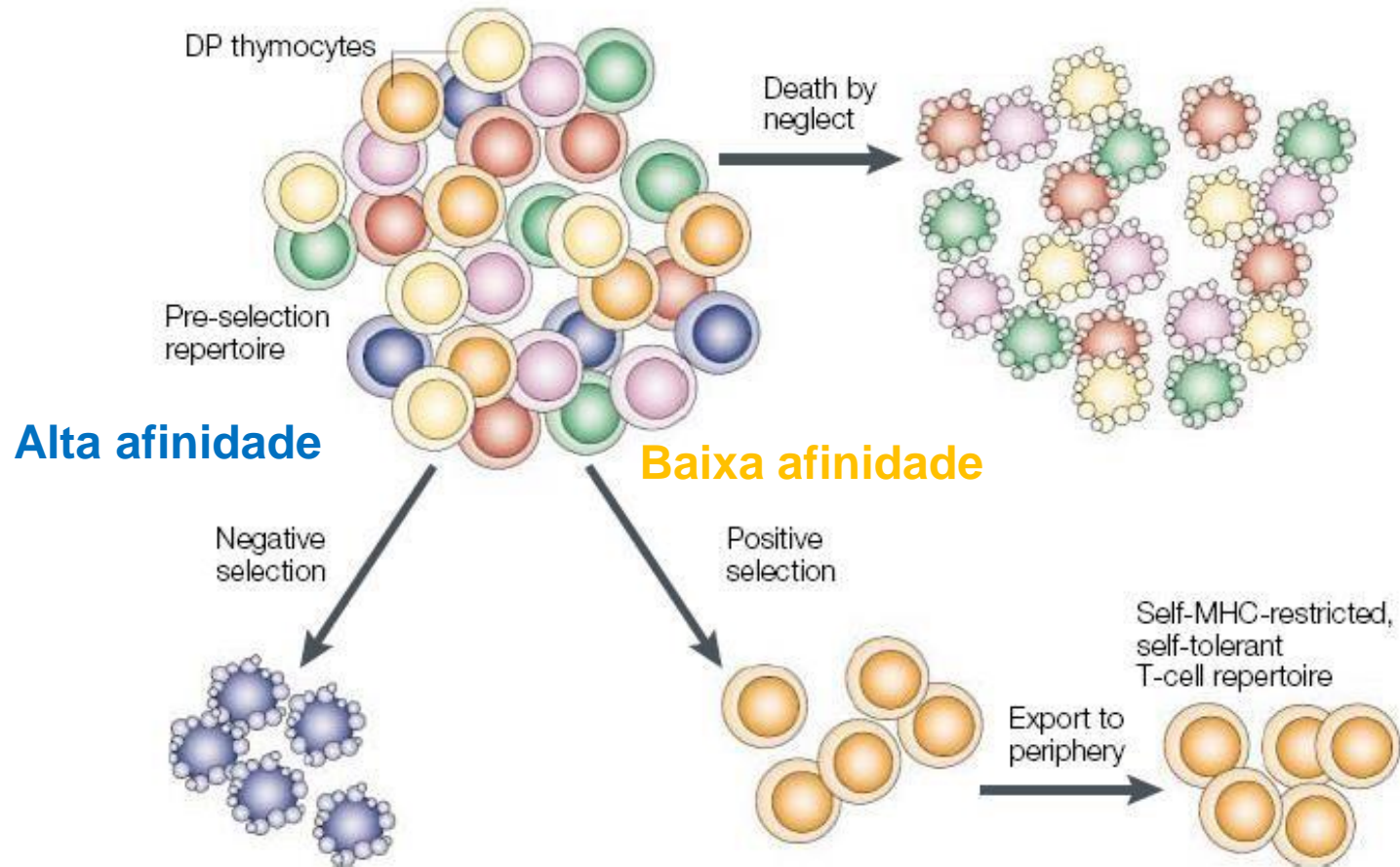


Expressão de CD4 e CD8 em timócitos



Seleção positiva e negativa

Repertório de linfócitos: receptores podem reconhecer (antígenos próprios ou estranhos) e apresentados por moléculas de MHC (próprias e estranhas)



Maturação de linfócitos T CD4 ou CD8

É a especificidade do TCR para os complexos molécula de peptídeo próprio:MHC próprio que determina qual correceptor será expresso pela célula T madura.

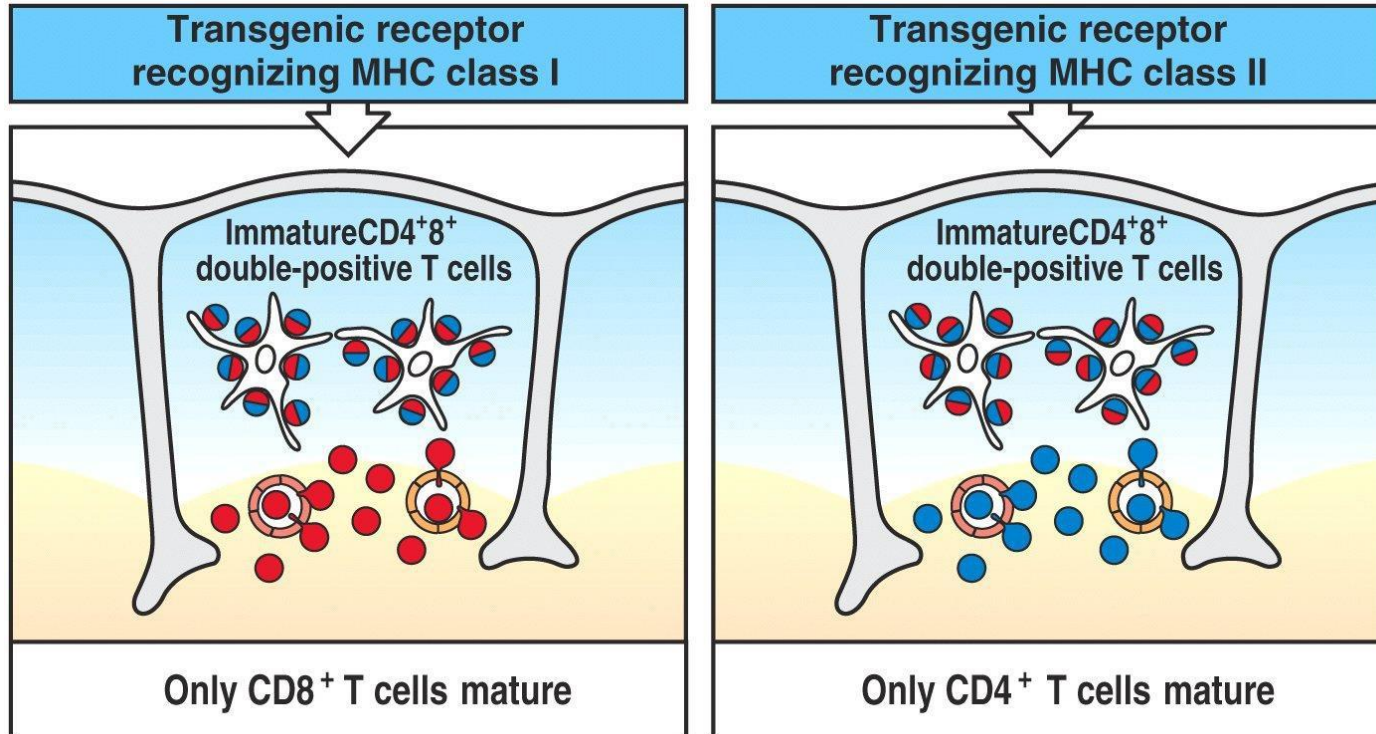
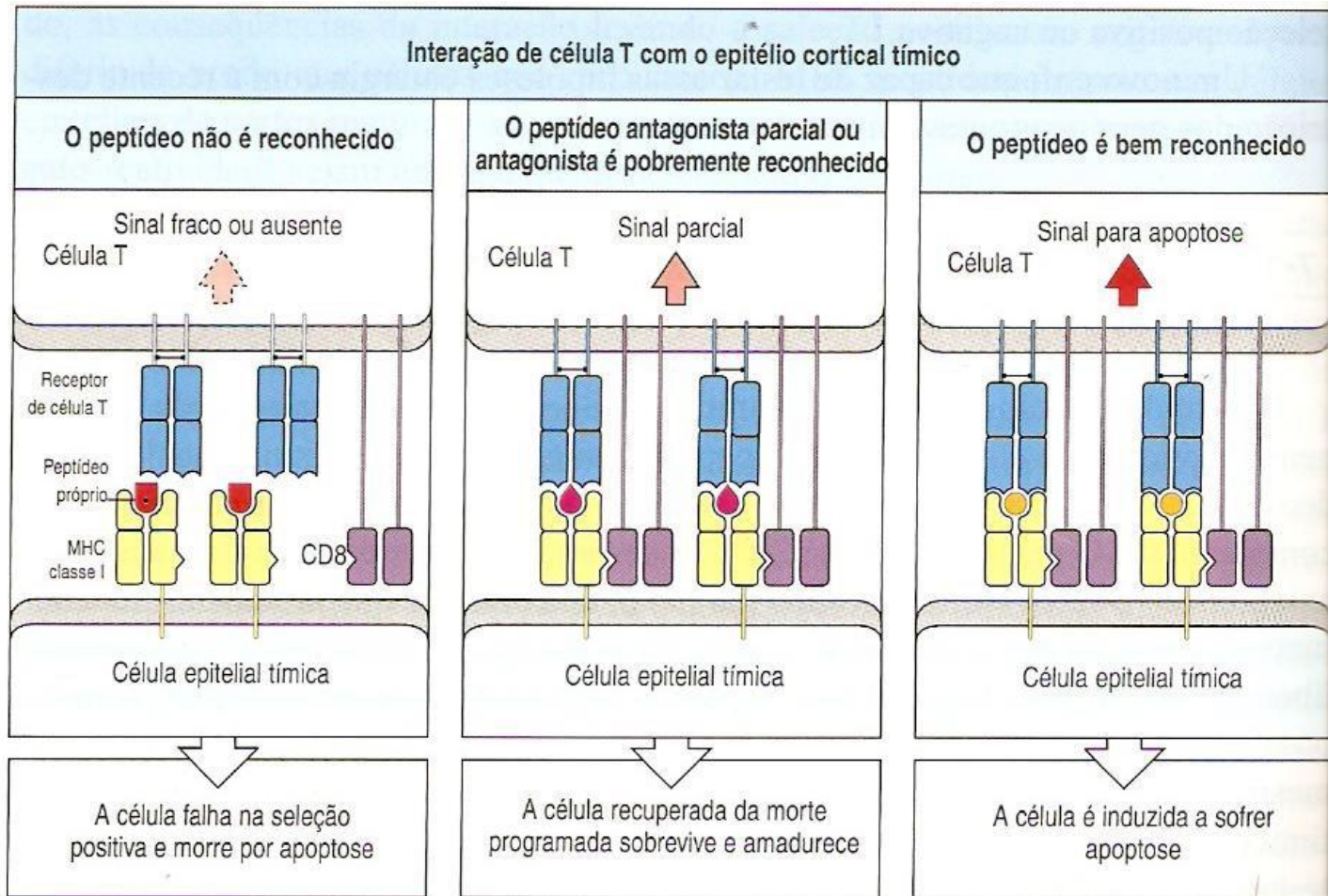


Figure 7-30 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Papel dos peptídeos na seleção positiva

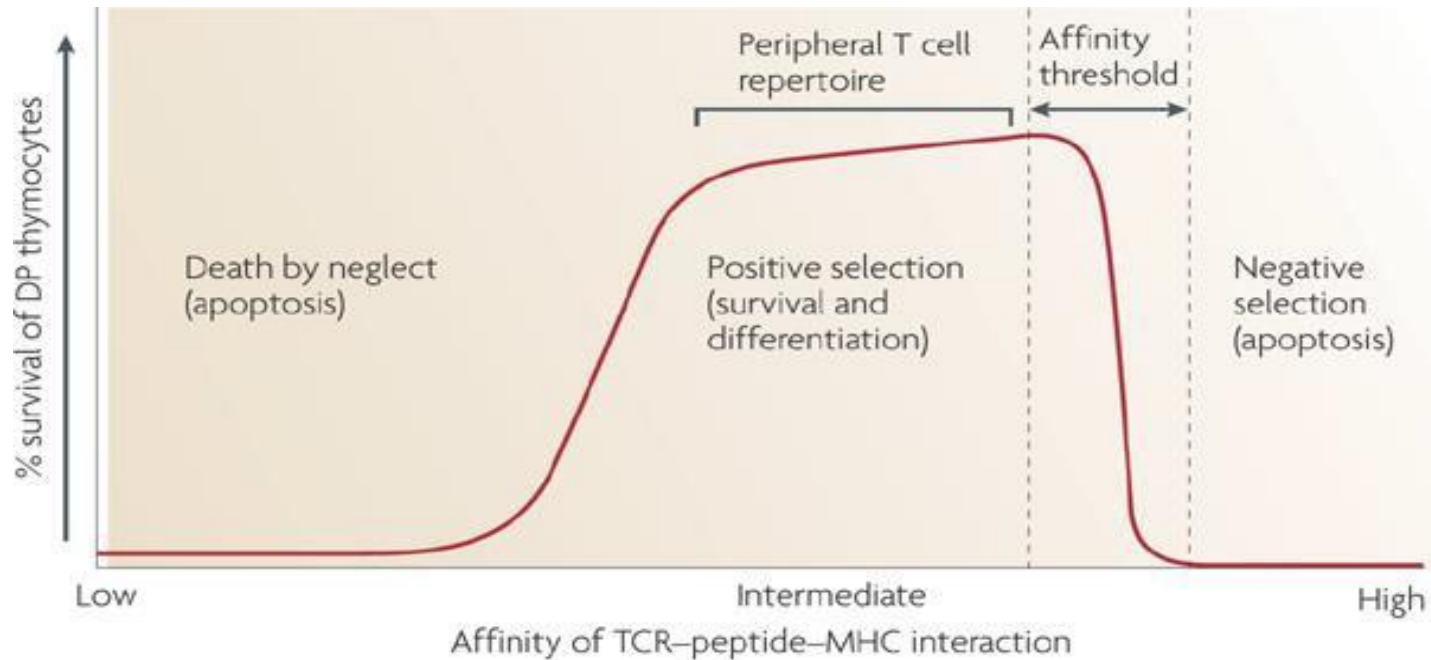
Moléculas de MHC I e II sempre contêm peptídeos ligados:

- 1) Expressão estável dos MHC
- 2) Seleção de especificidades de TCR

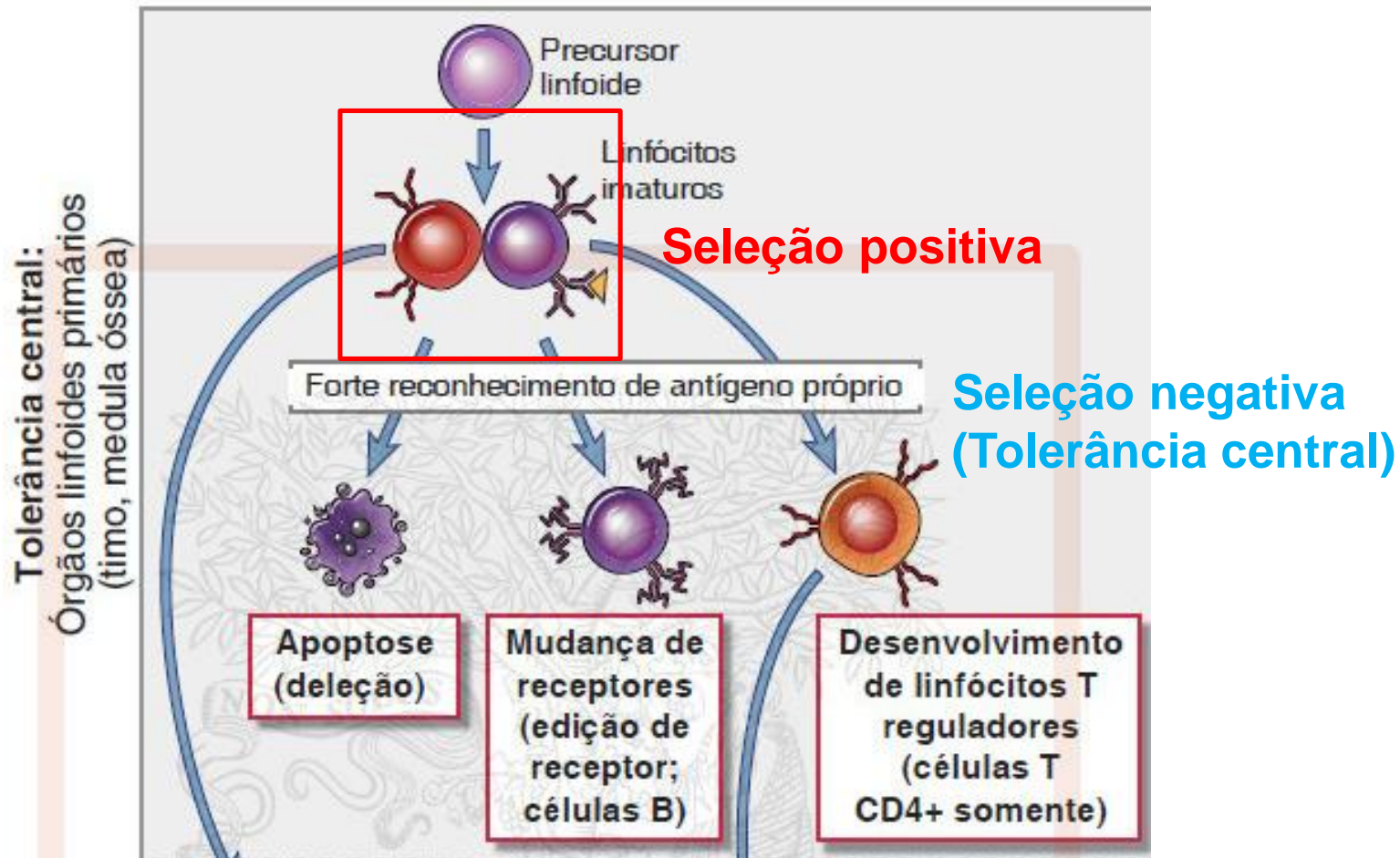


Modelo de afinidade na seleção de timócitos

Como a seleção positiva conduzida pelo reconhecimento fraco de antígenos próprios produz um repertório de células T maduras específico para antígenos estranhos?



Processos de seleção (positiva e negativa)



Seleção negativa de linfócitos T

É o processo pelo qual os timócitos cujos TCR se ligam fortemente a antígenos peptídicos próprios via MHC sofrem deleção ou morte por apoptose (medula).

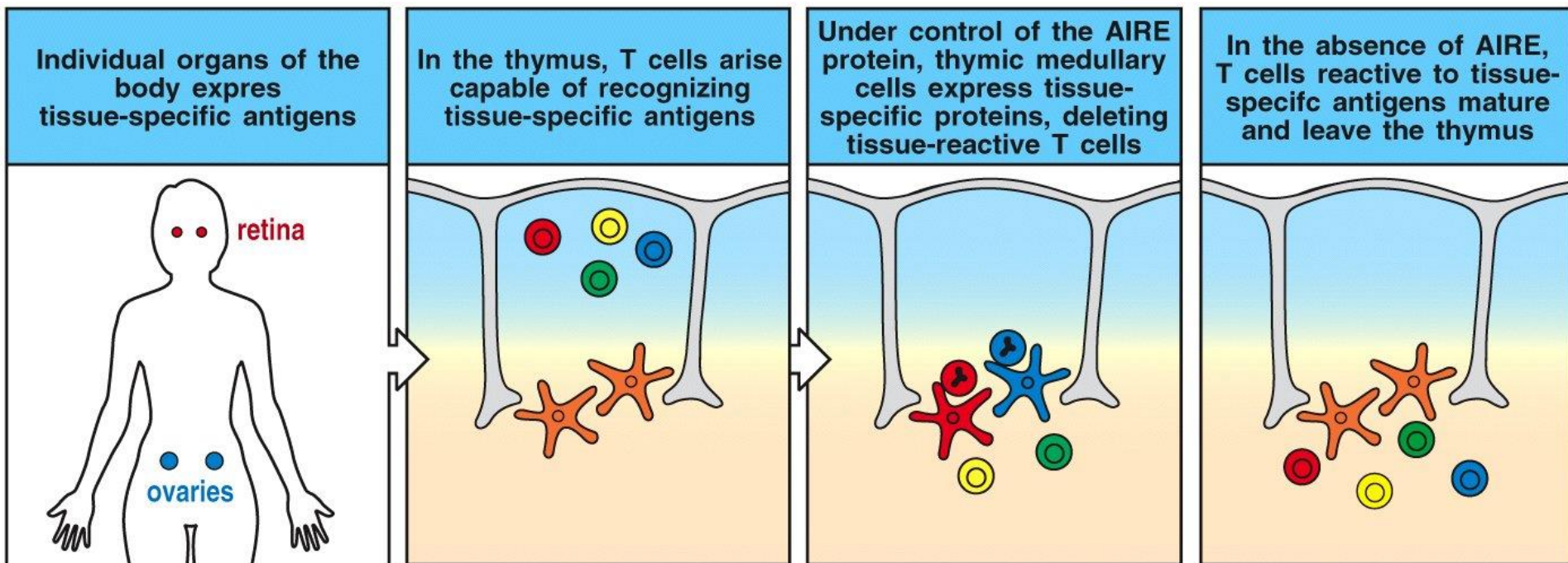
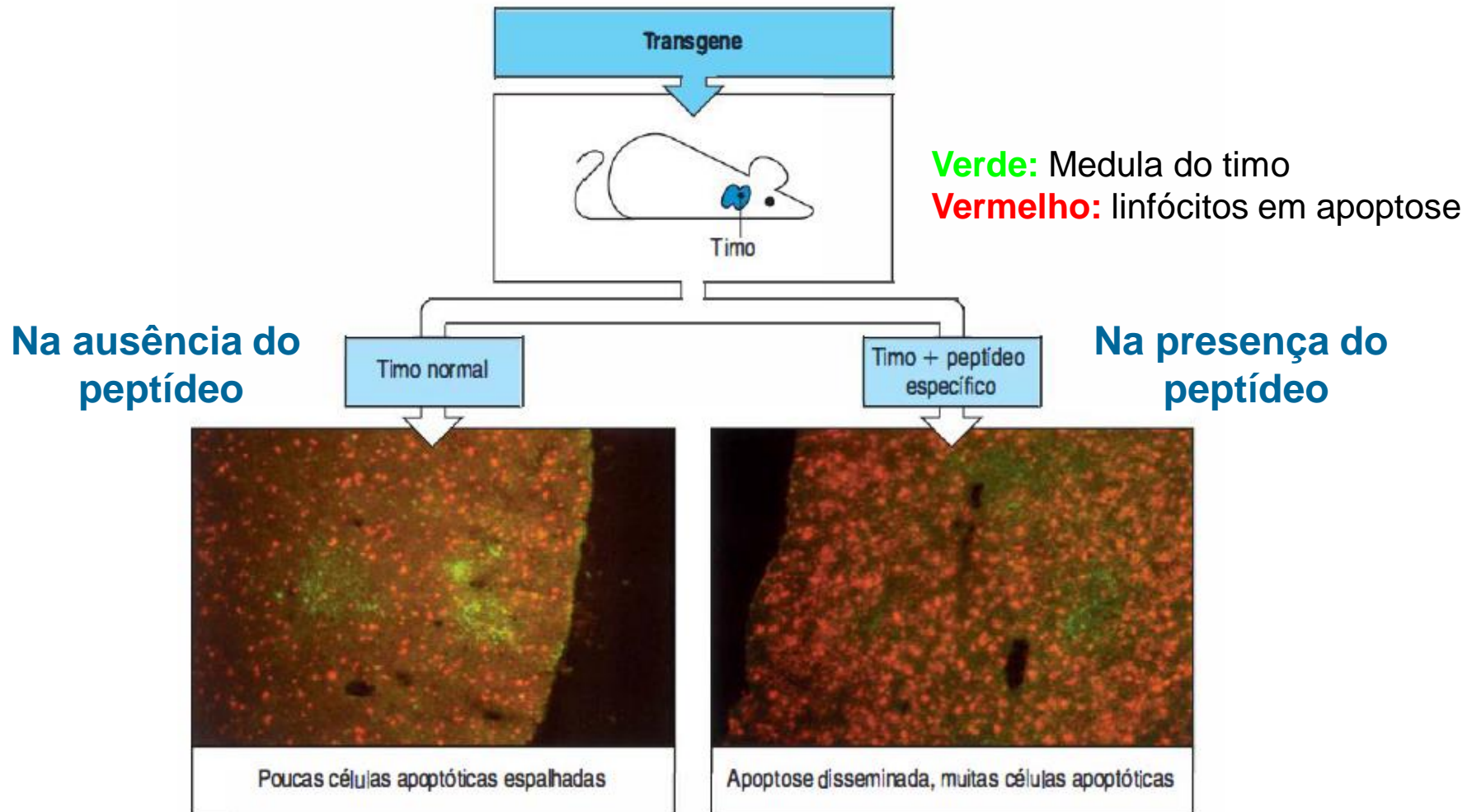


Figure 13-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

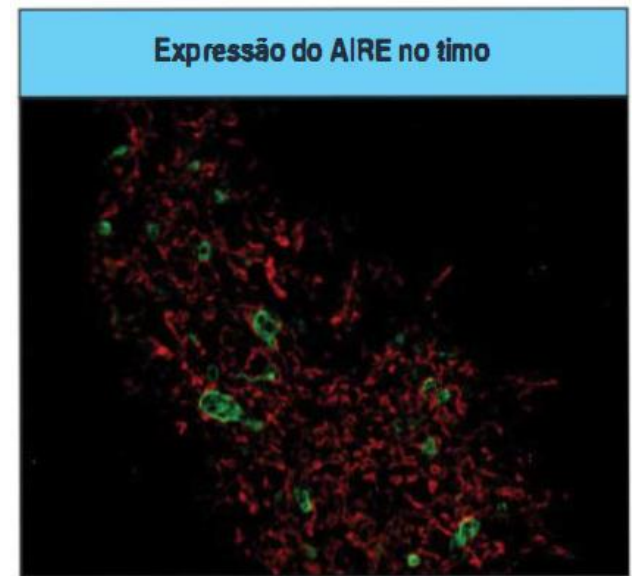
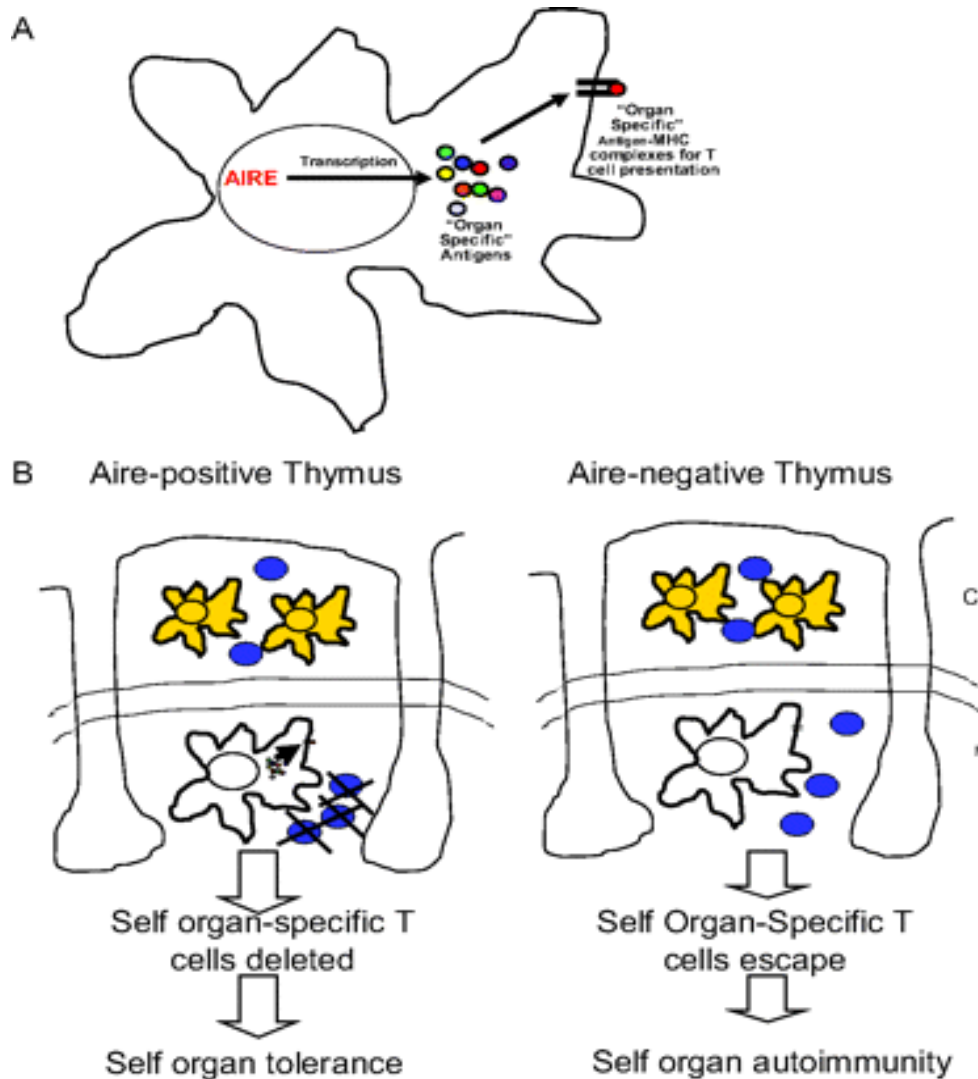
Evidências experimentais

Uma constatação da seleção negativa usando camundongos transgênicos
(expressão do TCR específico para a **ovalbumina-
proteína presente na clara do ovo**)



Proteína AIRE na auto-tolerância

A auto-tolerância (tolerância central) é o processo que elimina as células T autorreativas potencialmente mais prejudiciais (auto-antígenos)



Síndrome Poliglandular Automune: (APS)

(*J Clin Endocrinol Metab* 93: 3663–3670, 2008)

Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Importância da seleção positiva e negativa

