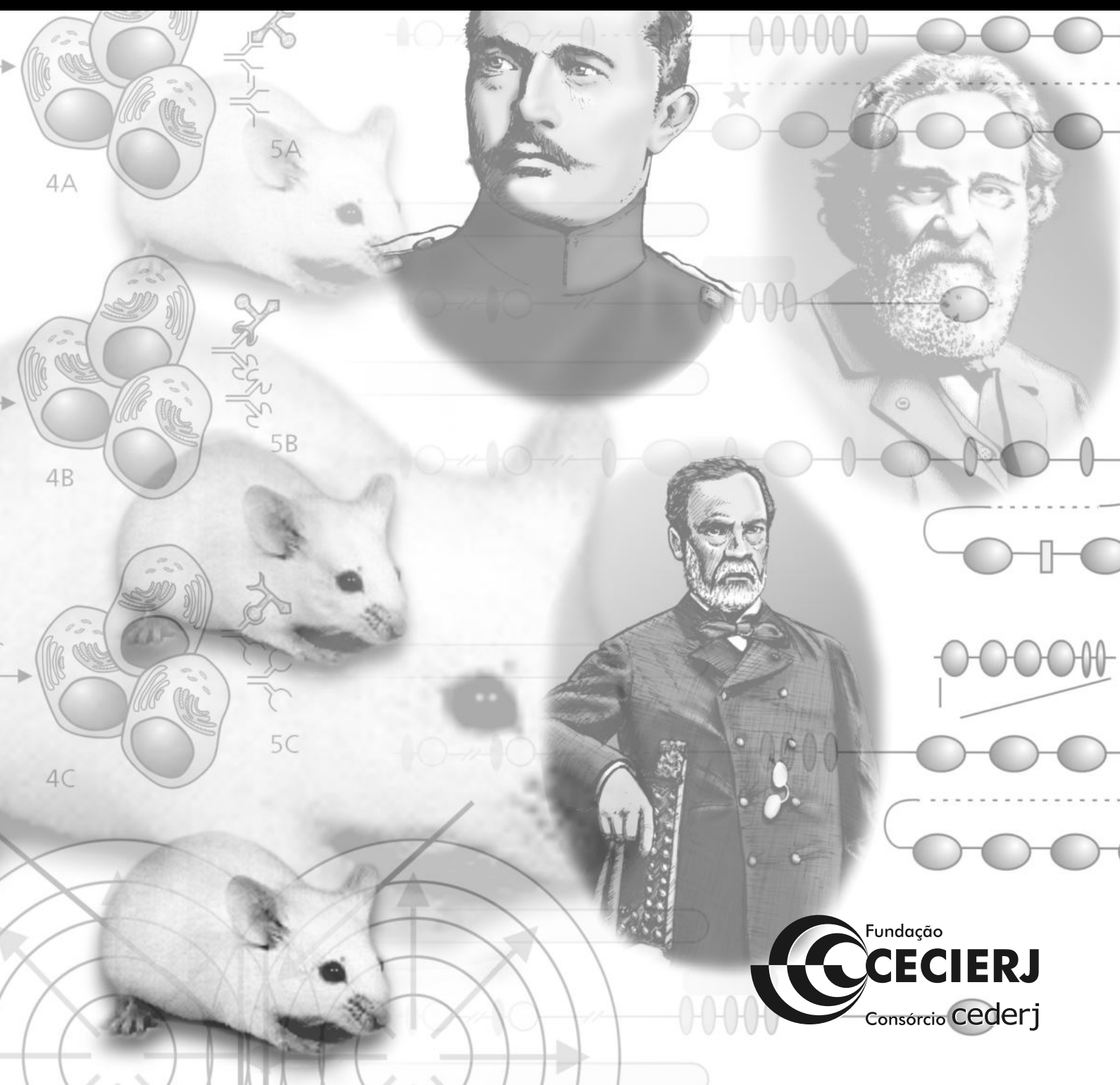


Lílian M. G. Bahia Oliveira
Milton M. Kanashiro

Imunologia





Fundação

CECIERJ

Consórcio **cederj**

Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro

Imunologia

Volume 1 - Módulo 1

Lílian M. G. Bahia Oliveira

Milton M. Kanashiro



SECRETARIA DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Ministério
da Educação



Apoio:



Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Rua Visconde de Niterói, 1364 – Mangueira – Rio de Janeiro, RJ – CEP 20943-001

Tel.: (21) 2334-1569 Fax: (21) 2568-0725

Presidente

Masako Oya Masuda

Vice-presidente

Mirian Crapez

Coordenação do Curso de Biologia

UENF - Milton Kanashiro

UFRJ - Ricardo Iglesias Rios

UERJ - Cibeles Schwanke

Material Didático

ELABORAÇÃO DE CONTEÚDO

Lílian M. G. Bahia Oliveira

Milton M. Kanashiro

COORDENAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL

Cristine Costa Barreto

DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL E REVISÃO

Marta Abdala

Marcelo Bastos Matos

Patrícia Alves

COORDENAÇÃO DE LINGUAGEM

Maria Angélica Alves

Cyana Leahy-Dios

COORDENAÇÃO DE AVALIAÇÃO DO MATERIAL DIDÁTICO

Débora Barreiros

AVALIAÇÃO DO MATERIAL DIDÁTICO

Ana Paula Abreu Fialho

Aroaldo Veneu

Departamento de Produção

EDITORA

Tereza Queiroz

COORDENAÇÃO EDITORIAL

Jane Castellani

COPIDESQUE

Cristina Freixinho

José Meyohas

REVISÃO TIPOGRÁFICA

Cristina Freixinho

Elaine Barbosa

Patrícia Paula

COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO

Jorge Moura

PROGRAMAÇÃO VISUAL

Alexandre d'Oliveira

Bruno Gomes

Renata Borges

ILUSTRAÇÃO

Morvan Neto

CAPA

Morvan Neto

PRODUÇÃO GRÁFICA

Patrícia Seabra

Copyright © 2005, Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, mecânico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, da Fundação.

O48i

Oliveira, Lílian M.G. Bahia.

Imunologia. v. 1 / Lílian M. G. Bahia Oliveira; Milton M. Kanashiro. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2010.

232p.; 19 x 26,5 cm.

ISBN: 85-7648-170-7

1. Imunologia. 2. Sistema imunológico. 3. Anticorpos. 4. Antígenos. I. Kanashiro, Milton M. II. Título.

CDD: 571.96

Governo do Estado do Rio de Janeiro

Governador
Sérgio Cabral Filho

Secretário de Estado de Ciência e Tecnologia
Alexandre Cardoso

Universidades Consorciadas

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**
Reitor: Almy Junior Cordeiro de Carvalho

**UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**
Reitor: Ricardo Vieiralses

UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
Reitor: Roberto de Souza Salles

**UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO**
Reitor: Aloísio Teixeira

**UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DO RIO DE JANEIRO**
Reitor: Ricardo Motta Miranda

**UNIRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**
Reitora: Malvina Tania Tuttman

SUMÁRIO

Aula 1 – Imunologia: uma ciência experimental _____	7
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira / Milton M. Kanashiro</i>	
Aula 2 – Imunidade: propriedades gerais _____	23
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira</i>	
Aula 3 – Células e órgãos do sistema imune _____	45
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira</i>	
Aula 4 – Sistemas experimentais em Imunologia _____	75
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira / Milton M. Kanashiro</i>	
Aula 5 – Inflamação e tráfego de leucócitos: princípios gerais _____	99
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira</i>	
Aula 6 – Anticorpos _____	121
<i>Milton M. Kanashiro</i>	
Aula 7 – Sistema complemento _____	141
<i>Milton M. Kanashiro</i>	
Aula 8 – Aula prática: interação antígeno e anticorpo _____	173
<i>Milton M. Kanashiro</i>	
Aula 9 – Geração de diversidade dos receptores antigênicos de linfócitos B e T _____	185
<i>Lílian M. G. Bahia Oliveira</i>	
Aula 10 – Atividade presencial obrigatória: Estudo dirigido referente às Aulas 1-9 _____	223
Referências _____	225

Imunologia: uma ciência experimental

AULA

1

Metas da aula

Apresentar a história da Imunologia e demonstrar a importância e a dependência da experimentação para a construção do conhecimento vigente sobre a disciplina.

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Descrever a origem e a evolução do conhecimento em Imunologia.
- Identificar os experimentos que demonstraram que o fenômeno da imunidade podia ser adquirido por meio de imunização (vacinação), bem como ser transferido de um indivíduo imune a outro não-imune.
- Avaliar a influência de outras áreas na construção do conhecimento em Imunologia.

INTRODUÇÃO

As palavras e expressões imunologia, imunidade, resposta imunológica (ou resposta imune), sistema imunológico (ou sistema imune), imunodeficiência e outras variações certamente já foram ouvidas e lidas por você. Você também deve ter ouvido falar em “contagem de células CD4 positivas” e “testes de ELISA”, enquanto assistia a uma reportagem sobre AIDS em algum telejornal, por exemplo. Pois bem, a Imunologia, no decorrer de sua história, contou com conhecimentos acumulados ao longo de muitos anos na prática da Medicina. As observações registradas na história dessa ciência relatam casos de pessoas que adoeciam mas que, no entanto, sobreviviam a um surto epidêmico de uma determinada doença, tornando-se resistentes (imunes) a essa moléstia. Essas pessoas, ao entrarem em contato pela segunda vez com a doença, não apresentavam mais sintomas (tornavam-se imunes) e podiam cuidar de outros doentes.

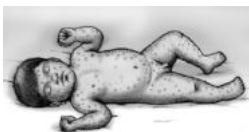
IMUNIDADE

Estado de resistência a doenças, geralmente infecciosas.

A imunidade adquirida pelo indivíduo (humano ou animal) confere resistência ao adoecimento; pode ser adquirida contra substâncias estranhas ao nosso organismo, como, por exemplo, patógenos ou substâncias tóxicas.

Como poderíamos hoje definir a Imunologia, esta disciplina que vamos começar a estudar? Para que possamos conceituá-la de forma clara até o final desta aula, vamos fazer uma “viagem” no tempo recorrendo a um passado para conhecermos as implicações da Medicina, Zoologia, Química, Microbiologia e Genética. Sim, você está surpreso?

O “nascimento” da Imunologia e a sua consolidação contaram com a participação de muitas outras áreas da ciência. Veremos que, na história da Medicina, foram feitos alguns experimentos com seres humanos inimagináveis nos dias de hoje! Essa viagem nos auxiliará a entender por que a Imunologia, uma ciência que investiga os fenômenos imunológicos, dependeu, e ainda depende, de outros campos do conhecimento.



VARÍOLA

Doença altamente infecciosa, muitas vezes fatal, causada por um vírus de DNA. Esta enfermidade se caracteriza por febre alta, dor de cabeça e formação de vesículas (erupções avermelhadas com bolhas de pus) na pele.

VARÍOLA: O INÍCIO DA HISTÓRIA

Provavelmente, o relato mais antigo sobre o fenômeno da **IMUNIDADE** pode ser atribuído a Tucídides (um grande historiador da Guerra do Peloponeso), ao descrever em 430 a.C. o episódio no qual uma praga assolou Atenas (há alguns relatos na literatura médica indicando que essa praga tenha sido a **VARÍOLA**, mas esse fato não foi definitivamente comprovado). Ele observou que somente as pessoas que haviam se recuperado da praga podiam cuidar de outras doentes, pois não contraíam a moléstia pela segunda vez.

Na época de Tucídides, e mesmo antes, a humanidade acreditava que as pragas e as doenças eram fenômenos sobrenaturais, influenciados por espíritos, deuses e demônios.



O termo “imunidade” deriva do latim *immunis*, que significa “isenção de encargos”. Designa o privilégio concedido a senadores romanos de não serem processados pela justiça durante seus mandatos. Em imunologia, esse termo veio a ser empregado cerca de dois mil anos depois da observação de Tucídides!

Foi somente muitos anos depois, no século XV, que apareceram as primeiras descrições de indução de imunidade na tentativa de salvar vidas humanas, prevenindo a infecção pela varíola. Esta doença matou milhões de pessoas ao longo da história da humanidade. Como exemplo de sua antiguidade, citamos o fato de que cabeças mumificadas de pessoas que morreram nos milênios que antecederam a Cristo evidenciavam traços da infecção. A cabeça mumificada do faraó egípcio Ramsés V, morto ainda jovem, 1.157 anos antes de Cristo, apresentava sinais bem preservados de cicatrizes de varíola.

Vários relatos do século XV descreveram procedimentos realizados pelos chineses e turcos, mostrando que crostas dissecadas de pústulas de varíola humana (apenas de casos de sobreviventes à doença) eram inaladas ou sopradas nas narinas das crianças com o auxílio de um tubo de prata. Há indícios também de que havia, em diferentes partes do mundo, a prática de se fazer pequenas incisões na pele de pessoas saudáveis, para inocular, com uma fina haste, material líquido proveniente das pústulas de doentes de varíola. Esses procedimentos conferiam imunidade contra a varíola humana e eram chamados **VARIOLIZAÇÃO**. Como dissemos no início desta aula, havia experimentos com seres humanos que, hoje em dia, são inconcebíveis! Imagine, pegar o material das pústulas de pessoas doentes e inocular em indivíduos saudáveis!

A varíola, uma das primeiras doenças a serem clinicamente definidas na história da Medicina, influenciou a compreensão da imunidade certamente pela sua importância epidemiológica (muitas crianças morriam de varíola no passado) e pelo fato de que a imunidade adquirida contra a doença ser aparentemente definitiva, ou seja, de longa duração.

Havia, no entanto, muita polêmica e crítica em relação à variolização por parte do clero e mesmo de alguns médicos daquela época. Porém, a prática se perpetuou por uma razão óbvia: a taxa natural de mortalidade das pessoas que contraíam varíola era de 15 a 20% (ou seja, de cada 100 pessoas que pegavam a doença, cerca de 15 a 20 morriam).

VARIOLIZAÇÃO

Prática da inoculação de material retirado de pústulas de pessoas que contraíam a varíola, mas não morriam (forma benigna de varíola), em pessoas saudáveis, a fim de diminuir as chances destas últimas de contraírem a forma grave e mortal da doença.



**EDWARD JENNER
(1749–1822)**

Médico inglês que utilizou o vírus da varíola bovina para conferir proteção contra a varíola humana, o que veio a substituir a prática clássica da variolização utilizando-se material humano. Seu trabalho, ao ser publicado, foi considerado ridículo e sofreu muitas críticas, especialmente por parte do clero, que considerou repulsivo e demoníaco inocular uma pessoa com material originado de um animal doente.

**AGENTE
ETIOLÓGICO**

Nome dado ao organismo causador de determinada doença. Exemplos: o agente etiológico da varíola é o vírus da varíola, o da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, e assim por diante.

A prática da variolização proporcionava a diminuição da taxa natural de mortalidade para cerca de 2 a 3%. Não havia, portanto, como negar o seu benefício.

Na Inglaterra, a variolização ganhou força maior com o exemplo dado pelo príncipe e pela princesa de Gales, que permitiram que seus próprios filhos fossem inoculados. Isto aconteceu em 1722.

Várias décadas depois, em 1796, o médico inglês **EDWARD JENNER** introduziu um grande avanço nos procedimentos da variolização.

Naquela época, Jenner fazia atendimentos médicos em área rural da Inglaterra e observou que ordenhadores que contraíam a varíola bovina, uma forma branda da moléstia que provocava pústulas no úbere e nas tetas das vacas, se tornavam imunes à varíola humana. Este fato o deixou muito intrigado e o levou a formular a seguinte hipótese: se o fluido das pústulas da varíola bovina fosse inoculado em indivíduos saudáveis, eles se tornariam imunes à varíola humana? Para testar essa hipótese, Jenner inoculou fluido da varíola bovina em um garoto de 8 anos de idade e, posteriormente, infectou-o, intencionalmente, com a varíola humana! Felizmente, ele estava certo, e o garoto não adoeceu.

O médico inglês, aparentemente, nunca se questionou sobre a razão e o meio de as pessoas adquirirem imunidade a partir da prática da variolização com material bovino. Vejam, não se sabia naquela época que algumas doenças podiam ser causadas por microrganismos! Isto foi descoberto cerca de 100 anos depois, com a teoria dos germes de Louis Pasteur, que você já estudou em Microbiologia.

Na época de Jenner, acreditava-se que as pessoas já nasciam predestinadas a contraírem determinadas doenças. A teoria formulada por Thomas Fuller é um exemplo disso: ele acreditava que as pessoas nasciam com as “sementes” ou “óvulos” causadores de determinada doença. É interessante observar que, por trás dessa inocente concepção de agente causador de doença, havia uma formulação correta de **AGENTE ETIOLÓGICO**. Assim, ele propôs que a “semente” da varíola era diferente da “semente” do sarampo etc. Ou seja, havia na hipótese de Fuller a percepção de que para cada doença havia uma determinada “semente” ou “óvulo”, o que nada mais era do que um agente etiológico, porém concebido como “semente” ou “óvulo” e não como um organismo.

Vamos fazer uma pequena pausa. Se você tem mais de trinta anos, olhe para seu braço esquerdo. Se tem menos, procure seus pais, tios ou alguém que tenha essa idade ou mais e examine o braço esquerdo dessa pessoa. Provavelmente, você encontrará uma cicatriz. E qual a origem dessa marca? Ela é resultante da lesão deixada pela vacinação contra o vírus da varíola. Essa vacina, elaborada com base na descoberta de Jenner, foi utilizada em campanhas de vacinação mundial pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As campanhas resultaram na erradicação da varíola humana em todos os países, anunciada pela OMS em 1980.

No Brasil, a varíola era também conhecida como “bexiga”. Se você leu o romance de Jorge Amado *Capitães da areia*, deve estar se lembrando desse vocábulo, empregado para descrever a varíola, que assolava os meninos de rua no estado da Bahia na década de 1930 do século passado.

A partir de 1980, a OMS convocou todos os laboratórios no mundo para destruir os estoques do vírus da varíola, a fim de evitar que ele pudesse ser reintroduzido no ambiente de forma acidental ou mesmo criminoso. Dois laboratórios têm a guarda oficial do estoque deste vírus: o Centro de Controle de Doenças (CDC) de Atlanta, EUA, e o Instituto Vector, na Rússia. Atualmente, a grande preocupação é que esse vírus seja utilizado como arma biológica.

AS DESCOBERTAS DE PASTEUR

Você já ouviu dizer que muitas descobertas científicas acontecem por acaso, certo? Veja esta história que aconteceu com **LOUIS PASTEUR**. Durante a década de 1870, Pasteur, Robert Koch e outros cientistas trabalhavam em prol da divulgação da teoria dos germes. Naquela época, foram identificados agentes específicos de doenças, e o seu modo de ação foi elucidado. Pasteur havia conseguido cultivar, em laboratório, a bactéria causadora da doença da cólera aviária e, ao inoculá-la em galinhas, reproduziu a doença, mortal para as aves.

Por esquecimento, Pasteur deixou na bancada de seu laboratório tais culturas, que envelheceram, pois seu meio de cultivo não fora renovado no tempo necessário. Conta a história que Pasteur teria tirado alguns dias de férias. Afinal, ninguém é de ferro! Ao retornar ao laboratório, inoculou algumas galinhas com a cultura velha. Para sua



**LOUIS PASTEUR
(1822–1895)**

Químico francês considerado o pai da Imunologia e um dos cientistas mais produtivos dos tempos modernos. Entre suas contribuições para a ciência estão a derrubada da teoria da geração espontânea e o uso de cepas atenuadas de vírus e bactérias para produzir vacinas. Ele desenvolveu vacinas para cólera aviária, raiva e antraz.
Fonte: http://www.academie-sciences.fr/fondations/fondation_Pasteur_fr.htm

surpresa, as aves adoeceram, mas não morreram! Ele, então, preparou uma cultura nova e a inoculou nas galinhas do experimento anterior e também em um grupo novo de aves, que não haviam recebido a cultura velha.

ATIVIDADE



1. O que você acha que aconteceu com as aves deste experimento de Pasteur?

(Dica: lembre-se de que esta bactéria é mortal para as aves.)

COMENTÁRIO

Nova surpresa! As galinhas que não haviam recebido as bactérias da cultura envelhecida morreram, e aquelas que haviam recebido não morreram nem adoeceram!

VIRULÊNCIA

Capacidade (grau) de um agente infeccioso causar doença.

ATENUAÇÃO

Processos de manipulação de agentes infecciosos em laboratório que levam à redução da virulência.

Dotado de uma notável inteligência e perspicácia, Pasteur rapidamente percebeu que esse fenômeno era semelhante à variolização descrita por Jenner, ou seja, os organismos patogênicos podiam ter a sua **VIRULÊNCIA** diminuída por **ATENUAÇÃO**. O experimento demonstrou que o tempo poderia enfraquecer a virulência das bactérias e que a cultura de bactérias atenuadas poderia ser administrada a outros indivíduos para protegê-los da doença.

Pasteur chamou essas bactérias atenuadas de vacina (do latim *vacca*, que significa vaca), em homenagem a Edward Jenner, que utilizou o vírus da varíola bovina para induzir proteção contra a varíola humana. A partir dos experimentos com a cólera aviária em 1870, Pasteur estabeleceu, então, o princípio da atenuação para o desenvolvimento de vacinas. Essa descoberta foi determinante para o nascimento da Imunologia como ciência.

Como teria Pasteur interpretado os resultados de seus experimentos de vacinação? Consegue imaginar?

Você deve lembrar-se de que Pasteur era um químico. Ele conhecia a cinética de crescimento de microrganismos em meios de cultivo, então, imaginou algo semelhante para explicar o fenômeno de imunidade, que havia descoberto por acidente. E propôs a seguinte explicação: um determinado agente infeccioso quando contamina naturalmente ou é intencionalmente inoculado pela primeira vez em um hospedeiro, consome “nutrientes específicos” daquele organismo para se desenvolver. Assim, no segundo contato do agente infeccioso com o hospedeiro, ele não poderia mais crescer (a infecção não poderia se estabelecer), pois os “nutrientes específicos” para o seu crescimento já teriam sido consumidos na primeira infecção.

Mas a explicação proposta por Pasteur não era suficiente para elucidar novos resultados que surgiam da indução de imunidade, como, por exemplo, a demonstração feita por Theobald Smith de que organismos mortos podiam induzir à imunidade, e a demonstração de Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato de que apenas o meio de cultivo (sem os microrganismos) dos agentes causadores de difteria e tétano podia também induzir imunidade. Esses dados contribuíram para demonstrar a inadequação da explicação de Pasteur.

Agora nos dedicaremos ao estudo da história de observações experimentais de cientistas (pesquisadores) que propuseram explicações para o fenômeno da imunidade decorrente do contato prévio do organismo com um determinado agente infeccioso. Vamos falar um pouco sobre duas escolas de pensamento da época que tentavam explicar a imunidade. Uma corrente acreditava que as células eram as responsáveis por esse fato; outra defendia que a parte líquida (sem células) do sangue, isto é, o soro, é que era a responsável por tal fenômeno. A imunidade do soro foi chamada imunidade humoral; e a baseada em células, imunidade celular.

A TEORIA DA IMUNIDADE CELULAR DE ELIE METCHNIKOFF

Em 1884, o zoólogo russo **ELIE METCHNIKOFF** propôs a teoria da imunidade celular baseando-se nos princípios da teoria evolutiva de Charles Darwin (você estudou sobre isso na disciplina Evolução). Ele sugeriu que as funções digestivas intracelulares de organismos primitivos haviam persistido na escala evolutiva e se expressavam na capacidade de ingestão e digestão



**ELIE METCHNIKOFF
(1845–1916)**

O zoólogo russo e o médico alemão, Paul Ehrlich, dividiram em 1908 o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina “em reconhecimento ao trabalho de ambos em imunidade”.

de células móveis capazes de exercerem a fagocitose (isto é, os fagócitos) de metazoários e animais superiores.

Metchnikoff propôs que a capacidade fagocítica era o elemento primário para a promoção do fenômeno da imunidade, tão discutida na década de 1880. Ou seja, ele acreditava que a fagocitose do agente infeccioso, realizada pelas células fagocíticas do organismo vacinado ou naturalmente infectado, é que proporcionava o fenômeno da imunidade adquirida com a vacinação ou com a primeira infecção. Então, em 1884, ele sugeriu que os leucócitos (devido à sua capacidade fagocítica) teriam um papel importante na defesa contra agentes infecciosos.

O que teria levado Metchnikoff a propor tal explicação? Certamente sua experiência como zoólogo foi determinante para isso. Vejam por quê: ele havia observado que macrófagos de invertebrados marinhos eram capazes de ingerir e destruir corpos estranhos e até bactérias. Ou ainda, se os fagócitos não os destruíam, os corpos estranhos ou bactérias eram contidos em células gigantes ou em **GRANULOMAS**, que se formavam em função da sua ingestão.

Convidado por Pasteur na década de 1880 para trabalhar no recém-fundado Instituto Pasteur, em Paris, Metchnikoff teve vários seguidores, que defendiam a teoria da imunidade celular. Este pesquisador, brilhantemente, propôs que a fagocitose exercia papel importante na inflamação e que se constituía em importante mecanismo evolutivo que protegia o organismo.

O pensamento de Metchnikoff sobre a imunidade celular e inflamação somente foi amplamente aceito muitos anos depois. As publicações dos seus trabalhos e dos de seu grupo estimularam a crítica de adeptos da outra escola de pensamento, ou seja, da escola que acreditava que a imunidade humoral é que seria responsável pela proteção. As disputas entre ambas as correntes de pensamento duraram mais de trinta anos!

A revolução conceitual por que passava a Medicina no século XIX possivelmente explica o porquê da duradoura cisão entre as duas correntes de pensamento. Durante milênios esta ciência sofreu grande influência e dominação do conceito grego de que as doenças eram o resultado do desequilíbrio (quantitativo e qualitativo) dos humores (líquidos) do corpo. Assim, era natural que o **COMPONENTE HUMORAL** do sangue, responsável pela imunidade fosse estudado pelos cientistas da época para desvendar o fenômeno.

GRANULOMA

Massa ou nódulo tecidual composto por células que se organizam de modo circunscrito. É normalmente associado à fibrose e à necrose do tecido. Os componentes celulares e o estado de ativação das células do granuloma serão descritos e abordados novamente nesta disciplina, em aulas futuras.

COMPONENTE HUMORAL DE IMUNIDADE

Fator(es) presente(s) no soro (parte acelular do sangue) de organismos vacinados ou naturalmente infectados, responsável(eis) pelo fenômeno da imunidade.

IMUNIDADE HUMORAL

A imunidade humoral, definida naquela época, se referia à propriedade exclusiva do soro, responsável pela proteção de animais e seres humanos vacinados ou naturalmente infectados.

Em 1888, Emile Roux e Alexandre Yersin demonstraram que os sintomas da **DIFTERIA** podiam ser reproduzidos em animais, apenas com a injeção de **SOBRENADANTES DE CULTURAS** de bactérias causadoras daquela doença, ou seja, uma toxina solúvel é que causava os sintomas da doença. Os experimentos desses pesquisadores mostravam que, pelo menos em algumas situações, as toxinas produzidas pelas bactérias eram suficientes para causar doenças, sem a necessidade das bactérias *per se*.

Logo em seguida, em 1890, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato, atentos aos resultados descritos anteriormente, demonstraram que a **VACINAÇÃO (OU IMUNIZAÇÃO)** com a toxina diftérica e com o **TOXÓIDE TETÂNICO** produzia “alguma substância” no sangue que neutralizava ou destruía as toxinas, prevenindo, portanto, as doenças causadas por essas toxinas. Esses pesquisadores demonstraram ainda que, se o soro de um animal vacinado com o toxóide tetânico fosse transfundido a um outro animal não-vacinado, o animal receptor do soro também se tornaria protegido contra a ação da toxina tetânica.

Soros de animais vacinados com aquelas toxinas passaram a ser utilizados para tratar doentes com difteria ou tétano, obtendo-se sucesso quando administrados aos pacientes durante os estágios iniciais das doenças. A expectativa de se poder tratar moléstias com soros de animais imunizados provocou um grande crescimento da pesquisa nessa área. A substância que neutralizava as toxinas, e que estava presente no soro dos animais vacinados, foi denominada “antitoxina”. Logo em seguida, o termo **ANTICORPO** foi utilizado para denominar genericamente essa nova classe de substâncias do soro. O material responsável pela geração dos anticorpos foi denominado **ANTÍGENO**.

DIFTERIA

Também conhecida como crupe, é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, que acomete principalmente crianças.

SOBRENADANTES DE CULTURAS

Meio líquido onde crescem bactérias ou qualquer outro tipo de célula cultivável em laboratório. Os sobrenadantes de culturas não contêm a parte celular das culturas.

VACINAÇÃO (OU IMUNIZAÇÃO)

Processo experimental de inoculação de organismos ou substâncias, formulados para se tornarem inócuos à saúde, e que visa ao desenvolvimento de imunidade pelo organismo inoculado, conferindo a este resistência ao organismo ou substância.

TOXÓIDE TETÂNICO

Toxina tetânica quimicamente inativada.

ANTICORPO

A definição molecular dos anticorpos foi estabelecida apenas em 1930, quando se descobriu que esta classe de substâncias era uma glicoproteína, a qual foi denominada imunoglobulina.

ANTÍGENO

Substância de natureza molecular diversa que induz resposta imune e interage com anticorpos. Veremos ao longo da disciplina Imunologia que os antígenos não interagem apenas com os anticorpos, mas também com outros elementos moleculares e celulares do sistema imune.

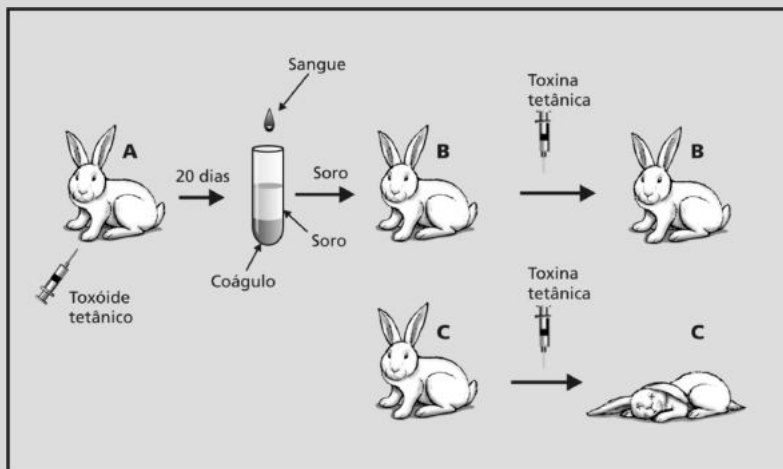


ATIVIDADE

2. Vamos simular um experimento de vacinação em coelhos. Suponhamos que o coelho "A" tenha sido vacinado com o toxóide tetânico, e que algumas semanas depois tenha sido colhido o soro deste animal. Imaginemos que o soro de "A" tenha sido transfundido a um segundo coelho, "B". Vamos considerar que um terceiro coelho, "C", não tenha recebido a transfusão de soro do coelho "A". Suponha agora que os animais "B" e "C" tenham sido inoculados com a toxina tetânica na sua forma ativa (não o toxóide tetânico, que é a toxina inativada). O que você acha que teria acontecido com os coelhos "B" e "C"? Dica: a toxina tetânica ativada da dose injetada neste experimento hipotético é mortal ao animal.

COMENTÁRIO

Se você respondeu que o coelho "B" sobreviveu e o coelho "C" morreu, acertou, parabéns! Se errou, olhe para a ilustração a seguir. Você imaginou um esquema parecido com este? Leia novamente o enunciado da atividade e procure associá-lo a este esquema. Você percebeu como a resolução ficou mais fácil? Durante esta disciplina, vamos apresentar várias atividades similares a esta; procure resolvê-las seguindo essa mesma linha de raciocínio.



Os experimentos de von Behring e Kitasato foram importantíssimos para reforçar as argumentações em favor dos defensores da imunidade humoral, mas nem por isso Metchnikoff e seu grupo se intimidaram. Ao contrário, continuaram trabalhando e produzindo resultados que, muitos anos mais tarde, vieram a ser mais bem compreendidos.

Em 1897, **PAUL EHRLICH**, um médico alemão, brilhantemente propôs uma teoria, chamada “teoria da cadeia lateral”, para explicar a formação de anticorpos no soro. Os anticorpos, segundo Ehrlich, seriam receptores (cadeias laterais) específicos presentes na superfície celular que interagiam com os antígenos e com o **COMPLEMENTO**. A ligação com o antígeno induziria a célula a produzir mais cadeias laterais e a liberá-las para o soro como anticorpos. Assim, graças um mecanismo de compensação, haveria uma produção maior desses anticorpos pelas células, o que permitiria que eles fossem detectados no soro.

Ehrlich figura entre os mais brilhantes imunologistas de todos os tempos por ter proposto uma teoria dessas no final do século XIX. Só para você ter uma idéia, apenas em 1950, ou seja, 53 anos após a teoria de Ehrlich ser publicada, os linfócitos (células responsáveis pela imunidade celular e humoral) foram identificados pela comunidade científica!



**PAUL EHRLICH
(1854-1915)**

COMPLEMENTO

Fator do soro envolvido no fenômeno da imunidade. Você vai estudar mais sobre complemento numa aula futura desta disciplina.

ANTICORPO, UMA MOLÉCULA COM VÁRIAS FUNÇÕES

O crescente interesse por pesquisas no campo da imunidade humoral atraiu também os microbiologistas (bacteriologistas). Em 1896, descobriu-se que o soro poderia causar o chamado fenômeno da aglutinação de bactérias, causado pela ação de anticorpos específicos contra as mesmas. A partir daí, anti-soros passaram a ser utilizados na identificação de bactérias e vírus. Assim, o soro contendo anticorpos contra uma determinada bactéria ou vírus, pôde ser usado para identificar esses organismos – que passaram a ser chamados sorotipos – entre os laboratórios.

Por exemplo, diversos sorotipos desenvolvidos contra a bactéria do gênero *Salmonella* (bactérias que causam infecções no trato intestinal em humanos e animais) ajudaram a identificar espécies do gênero, bem como cepas, mais ou menos virulentas, de uma dada espécie desse gênero.

Com o advento da Biologia Molecular, a tendência de se classificar bactérias e vírus a partir de sorotipos vem sendo gradativamente substituída

por parâmetros do material genômico dos organismos. No entanto, muitas bactérias e vírus são ainda identificados como sendo deste ou daquele sorotipo, como é o caso do sorotipo denominado “Enteritidis”, que identifica a espécie *Salmonella enteridis*. Esta bactéria é responsável por infecções tóxicas alimentares em seres humanos e pode ser encontrada em alimentos como filé de frango cru, queijo-minas, pernil assado, maionese com legumes e doces como brigadeiro etc.

Os sorotipos são utilizados em surtos de infecção por *Salmonella* para identificar diferentes espécies e linhagens de microrganismos desse gênero presente em alimentos.

Em 1899, Jules Bordet provou a existência de anticorpos contra eritrócitos que poderiam causar a destruição destes últimos, um processo conhecido como hemólise (lise ou ruptura da membrana dos eritrócitos). A hemólise dependia de um outro fator do soro além dos anticorpos, o complemento. Estes resultados trouxeram a noção de que a imunidade poderia ter consequências maléficas ao organismo. Seria uma imunidade “aberrante” à qual Ehrlich se referiu como “horror autotóxico”.

Ao “horror autotóxico” foi dada pouca atenção até que, em 1902, Paul Portier e Charles Richet descobriram que substâncias inócuas podiam causar sintomas graves e até morte, se injetadas em animais imunizados (vacinados) previamente com aquelas mesmas substâncias. Assim, estava descrito um tipo de imunidade que não era benéfico ao organismo, contrariando a percepção vigente de que a imunidade somente trazia proteção ao indivíduo. Este tipo de imunidade foi chamado anafilaxia para contrapor-se à profilaxia, uma vez que esta última promovia a imunidade que protegia o organismo, conforme você viu por meio de vários exemplos ao longo desta aula. Veremos, em uma aula mais adiante, que as reações de anafilaxia podem ocorrer em situações que, atualmente, conhecemos como reações de alergia (ou reações alérgicas).

Os defensores da imunidade humoral eram em maior número e publicavam maior volume de trabalhos que os adeptos da imunidade celular, até porque trabalhar com o soro é bem mais simples do que trabalhar com culturas de células, que exigem condições muito apropriadas e domínio de técnicas trabalhosas.

Os anos que se seguiram, no início do século XX, foram marcados por grandes avanços na Medicina devido a descobertas feitas no campo da Imunologia. Karl Landsteiner demonstrou a ocorrência de anticorpos naturais, presentes no sangue de seres humanos, desvendando o sistema sangüíneo ABO.

Mais tarde, em 1940, Alexander Wiener relatou a existência do fator Rh (*rhesus*). Esses dois sistemas foram fundamentais para viabilizar a transfusão sangüínea, que já salvou e salva tantas vidas.

TRANSPLANTES, UM OUTRO TEMA DA IMUNOLOGIA

O sonho de poder realizar transplantes e salvar vidas é bastante antigo na história da Medicina. Sabemos que, hoje, os transplantes são objeto de estudo da Imunologia, mas ao longo de muitos anos, foram objeto de estudo principalmente de cirurgiões! O milagre de São Cosme e São Damião, médicos cristãos do século III, por exemplo, ilustra esse fato. Conforme consta da história da Igreja Católica, esses médicos teriam realizado o transplante de uma perna de um indivíduo morto para um doente que tivera a perna amputada devido a um câncer. Esse milagre foi pintado por vários artistas do Renascimento. A história de Frankenstein também ilustra o desejo de longa data do homem de construir um novo corpo para reparar membros lesados ou ausentes.

No início do século XX, oncologistas e geneticistas que há anos realizavam pesquisas em prol da viabilização de transplantes, embora distantes da Imunologia, se viram atraídos pelos novos conhecimentos dessa área. Após a década de 1940, grandes avanços foram alcançados com os estudos de Peter Medawar, que redescobriu as leis da transplantação, mostrando que o fenômeno da rejeição era puramente imunológico.



A rejeição a transplantes é uma característica presente, desde muito cedo, na filogênese. Podemos observar esse fenômeno em poríferos (esponjas marinhas), por exemplo, quando se tenta transplantar em uma dada colônia pedaços de outra colônia de uma mesma espécie (o que chamamos alotransplante) ou de uma outra espécie (o que chamamos xenotransplante). Então, isso indica que a rejeição a transplantes é um mecanismo que está presente já nos seres vivos mais primitivos e deve ter o significado evolutivo de preservação do indivíduo contra uma possível colonização por outro indivíduo, seja da mesma espécie (alo), seja de outra (xeno). Embora o fenômeno de rejeição exista desde muito cedo na escala evolutiva, ele é mais ou menos “sofisticado”, dependendo da complexidade (posição na escala evolutiva) do organismo em questão.

O QUE É, AFINAL, A IMUNOLOGIA DOS TEMPOS MODERNOS?

Podemos agora definir que a Imunologia contemporânea continua a ser uma ciência experimental como o foi desde a teoria dos germes de Louis Pasteur. O avanço da Imunologia, como ciência experimental, depende da capacidade de os imunologistas manipularem as condições que cercam os fenômenos imunológicos de maneira controlada. O que viabiliza conclusões sobre o funcionamento do sistema imune a partir de tais experimentos.

Atualmente, o conceito de imunidade é ampliado para organismos vegetais. Algumas moléculas que fazem parte do sistema imune de animais compartilham semelhanças, no nível genético, com moléculas envolvidas na resistência de plantas contra doenças causadas por vírus, por exemplo. Veremos alguns tipos de moléculas envolvidas na defesa de plantas ao longo desta disciplina.

Você viu que muito do conhecimento adquirido na história da Imunologia se deu por meio da observação de fatos do cotidiano, alguns dos quais foram pensados e interpretados considerando-se conceitos de evolução darwinianos. Pela observação cuidadosa e interpretação crítica, pode-se desdobrar uma grande descoberta. Pense nisso.

RESUMO

O relato mais antigo do fenômeno da imunidade é atribuído a Tucídides, que descreveu como pessoas sobreviviam à praga de Atenas em 430 a.C., se tornaram imunes e puderam cuidar de doentes. Somente no século XV, com a prática da variolização, observamos as primeiras tentativas de indução da imunidade com o objetivo de salvar vidas. Posteriormente, esta técnica foi aperfeiçoada por Edward Jenner, com o uso da varíola bovina. Em 1870, Louis Pasteur estabeleceu os princípios da atenuação, utilizando a bactéria causadora da cólera aviária. As bases dessas descobertas são utilizadas até hoje nas vacinas aplicadas em humanos ou animais.

Duas teorias dividiram os imunologistas do século XIX: a imunidade celular e a imunidade humoral, responsável pela ação protetora contra agentes infecciosos. Décadas mais tarde, ficou esclarecido que ambas as teorias estavam corretas.

O conhecimento atual que temos sobre Imunologia resultou da participação de cientistas de diversas áreas do conhecimento que, via de regra, interpretavam os fenômenos naturais de imunidade e os resultados de seus experimentos de imunização com base na sua formação acadêmica.

ATIVIDADE FINAL

Você já deve ter visto na mídia várias reportagens ligadas à Imunologia. Pesquise nos cadernos de ciências dos jornais, em revistas ou na internet e selecione um artigo relacionado a essa área. Leia-o e comente-o com seus colegas. Caso você tenha dúvidas, procure o tutor da disciplina nos pólos ou mande-nos um e-mail.

COMENTÁRIO

Se tiver dificuldade em encontrar algum artigo, visite o site <http://cienciahoje.uol.com.br/materia/view> e faça uma busca com as palavras-chave vacina, anticorpo, imunidade. Uma outra sugestão é o site <http://www.vacinas.org.br/>. Nesta página você vai encontrar informações sobre as principais vacinas humanas.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, veremos, com um pouco mais de detalhes, o fenômeno da imunidade, e também estudaremos as propriedades gerais da resposta imune (ou resposta imunológica). Você não está curioso? Temos certeza de que sim, então... prepare-se!

Imunidade: propriedades gerais

AULA

2

Meta da aula

Apresentar as propriedades gerais da imunidade em perspectiva evolutiva.

objetivos

Ao final desta aula, você será capaz de:

- Reconhecer o princípio geral da imunidade nos seres vivos.
- Distinguir conceitualmente imunidade inata e imunidade adaptativa.

Pré-requisitos

Para acompanhar esta aula, você precisa ter estudado a Aula 1 de Imunologia, a Aula 12 do Módulo 3, Volume 2 da disciplina Diversidade, Biológica dos Deuterostomados e os conteúdos referentes a proteínas da disciplina Bioquímica I.

INTRODUÇÃO

Embora o nascimento da Imunologia como ciência tenha ocorrido em contexto médico, conforme relatamos na aula passada, não podemos deixar de conceber a resposta imune como um fenômeno biológico, independente do significado e das interpretações da medicina. Ao concebermos a resposta imune dessa maneira, será mais fácil compreendermos o seu significado como fenômeno biológico igual a tantos outros.

Iniciaremos esta aula com a reflexão sobre a utilização dos termos que já temos empregado em nosso curso: “imunidade”, “resposta imune ou resposta imunológica” e “sistema imune”. Ao empregá-los, é necessário que tenhamos em mente que a *imunidade* se constitui no conjunto de estruturas e mecanismos que garantem ao indivíduo (ser vivo de qualquer espécie) sua integridade contra a invasão e a colonização por outros indivíduos da mesma espécie e/ou de espécies diferentes. A imunidade está presente em toda a filogênese e se constitui no fundamento da individualidade de cada ser vivo.

A imunidade existe, portanto, mesmo na ausência de um sistema imune estruturado, composto por órgãos e estruturas compartimentalizadas. Denominamos genericamente resposta imune o conjunto de mecanismos que decorrem de reações e interações entre moléculas e/ou células de um indivíduo contra um dado elemento estranho (por exemplo, um patógeno ou uma toxina); assim, podemos dizer que mesmo nos organismos de menor complexidade estrutural, e até nos unicelulares, a resposta imune se faz presente para preservar a integridade e individualidade daquele organismo.

A RESPOSTA IMUNE É O ELEMENTO ESSENCIAL PARA A PRESERVAÇÃO INDIVIDUAL

Independentemente de quão simples ou sofisticada seja a resposta imune em termos dos elementos celulares e moleculares que a compõem, isto é, se ela se passa em invertebrados ou em vertebrados, ela será dotada da capacidade de distinguir entre o que é próprio (*self*) e o que não é próprio, ou seja, o que é estranho ao organismo (*nonself*). Os termos em inglês *self* e *nonself* são bastante utilizados em Imunologia, mesmo em textos escritos em português.

Os elementos que compõem a imunidade dos animais vertebrados superiores, isto é, a partir dos peixes mandibulados, são vistos também em invertebrados, e alguns deles até em plantas. Portanto, do ponto

de vista funcional, mecanismos de imunidade observados em diferentes filos refletem analogias ou homologias, as quais resultam das diferentes estratégias que os seres vivos exploram para alcançar o mesmo propósito de preservação individual. Este propósito é alcançado por meio da capacidade de distinguir entre o que é próprio e o que não é próprio. Alguns mecanismos de imunidade observados em animais mais primitivos foram mantidos (conservados) na filogênese.

O mesmo princípio de discriminar o próprio do não-próprio dota o sistema imune dos vertebrados da possibilidade de distinguir células transformadas (tumoriais ou cancerígenas) e eliminá-las, não permitindo que se propaguem e se constituam, por exemplo, em um tumor. Atualmente, um dos grandes desafios da medicina é lançar mão da **IMUNOTERAPIA** para interferir na imunidade, visando curar ou amenizar doenças de forma a beneficiar os pacientes.

Tendo em mente que a imunidade parece ter existido ao longo da evolução, em função da preservação da individualidade dos seres vivos, vamos falar, a seguir, um pouco sobre a **IMUNIDADE INATA** e a **IMUNIDADE ADAPTATIVA**.

Considerando que, conforme vimos, a imunidade dos seres vivos se constitui no conjunto de estruturas e mecanismos que garantem aos mesmos sua integridade, facilmente concluiremos que a divisão entre imunidade inata e imunidade adaptativa nos vertebrados superiores não existe do ponto de vista da constituição da resposta imune como um todo, sendo, portanto, uma divisão meramente didática. Assim, os elementos celulares e moleculares da “imunidade inata” interagem e se integram com elementos celulares e moleculares da “imunidade adaptativa” para constituir a imunidade do indivíduo como um todo. Este fato será explicado mais adiante, ainda nesta aula, através de exemplos concretos em uma situação simulada.

IMUNIDADE ADAPTATIVA

Denominamos imunidade adaptativa (sinônimos: imunidade adquirida e imunidade específica) o conjunto de reações que, em vertebrados superiores, passam a compor a resposta imune (já iniciada em virtude da imunidade inata) em decorrência da expansão numérica (proliferação) de células (linfócitos B e T) que reconhecem antígenos de maneira bastante específica, como veremos a seguir. A imunidade adaptativa pode se desenvolver tanto contra substâncias estranhas ao organismo (patógenos ou substâncias tóxicas), por exemplo, como também, em determinadas situações patológicas, contra elementos não estranhos ao organismo (por exemplo, o organismo pode destruir as suas próprias hemácias conforme veremos em outra aula).

IMUNOTERAPIA

Tratamento de doenças com agentes terapêuticos que promovem ou inibem a resposta imune. A imunoterapia aplicada à cancerologia (área da medicina que estuda tumores malignos) visa à potencialização da imunidade contra os antígenos tumorais ou à administração de anticorpos antitumores, por exemplo.

IMUNIDADE INATA

Denominamos imunidade inata (que tem como sinônimos: imunidade natural ou imunidade não-específica) o conjunto de barreiras naturais e de elementos celulares e moleculares que já estão estabelecidos ou que passam a compor os mecanismos da resposta imune que imediatamente se inicia, logo no primeiro momento em que um organismo é invadido por um agente estranho, em geral, infeccioso. A imunidade inata consistirá na primeira linha de defesa do organismo quando este for invadido por um determinado agente infeccioso. A imunidade inata está “pronta para atuar” em questão de minutos e horas após uma situação de injúria como, por exemplo, um corte, como também após a invasão do organismo por agente infeccioso.

A ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA REFINADA

Também simplesmente chamada especificidade antigênica – permite ao sistema imune distinguir diferenças sutis entre antígenos. Assim, por exemplo, os anticorpos podem reconhecer diferenças tão mínimas entre dois antígenos (duas moléculas de proteínas quase idênticas), que diferem entre si por apenas um aminoácido!

MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

A memória imunológica confere ao sistema imune maior eficiência e rapidez na resposta contra antígenos que já se apresentaram ao organismo. Pelo fato de o sistema imune ser dotado de memória imunológica é que as vacinas podem conferir, aos organismos vacinados, proteção eficaz contra um determinado agente infeccioso, por exemplo.

LINFÓCITOS B (OU CÉLULAS B)

Tipo celular originado na medula óssea e que produz anticorpos. A denominação B, destes linfócitos, se deve à sua descoberta em aves. Nas aves, eles se originam na medula óssea, mas amadurecem em um órgão linfóide chamado *bursa de Fabricius*, daí a sua denominação B, de bursa. Em mamíferos, os linfócitos B se originam e amadurecem na medula óssea (do inglês *bone marrow*). A denominação B é, portanto, também adequada, pois designa B, de *bone marrow*. Veremos novamente esse assunto, com mais detalhes, ao longo do nosso curso e na próxima aula, embora esses linfócitos sejam responsáveis pela imunidade humoral que vimos na Aula 1.

Conforme foi dito na Aula 1, Elie Metchnikoff chamou atenção para o fato de que a “capacidade fagocítica” de células primitivas havia persistido na escala evolutiva e se fazia presente em células do sangue de animais superiores. A fagocitose em animais superiores se constitui em um dos mecanismos que compõem a imunidade inata. Avançando em complexidade na escala evolutiva, observamos o incremento de elementos celulares e moleculares que passam a compor a resposta imune. Assim, a partir dos vertebrados superiores, ou seja, em animais que na escala filogenética surgiram após os primeiros peixes com mandíbula (Gnatostomados), além dos elementos da imunidade inata, presente nos invertebrados, a resposta imune passa a apresentar mais duas características, que são a **ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA REFINADA** e a **MEMÓRIA IMUNOLÓGICA**, ambas frutos da imunidade adquirida.

A especificidade antigênica refinada dota o sistema imune da capacidade de distinguir as diferenças sutis de um dado antígeno. Ela decorre da presença, nos vertebrados superiores, de duas estruturas moleculares:

- 1) os anticorpos (ou imunoglobulinas), produzidos pelos **LINFÓCITOS B**;
- 2) os TRCs (do inglês *T Cell Receptor*) presentes na superfície de uma outra categoria de linfócitos chamados **LINFÓCITOS T**.

O TCR é a estrutura molecular que reconhece antígenos na superfície dos linfócitos T e se assemelha estruturalmente à molécula de anticorpo. Veja na **Figura 2.1** o desenho esquemático de um linfócito B e de um linfócito T, mostrando em destaque apenas as duas estruturas, respectivamente uma molécula de imunoglobulina (anticorpo) e uma molécula de TCR. Muitos outros tipos de moléculas estão na superfície dos linfócitos T e B, mas apenas o TCR e o anticorpo estão sendo mostrados na **Figura 2.1**.

A especificidade antigênica refinada confere aos vertebrados superiores a capacidade de “adaptarem” a sua resposta imune, de maneira bastante específica, aos antígenos. A memória imunológica designa a

LINFÓCITOS T (OU CÉLULAS T)

Tipo celular que participa da resposta imune adaptativa mediada por células. Estas células são originadas na medula óssea e amadurecem no timo (órgão linfóide); daí a sua denominação T. As células T são subdivididas em várias subpopulações, conforme veremos na próxima aula.

capacidade do sistema imune de “lembrar” de um antígeno ao qual foi anteriormente exposto, e agora responder com maior rapidez em comparação com a primeira exposição.



Figura 2.1: Desenho esquemático de um linfócito T e de um linfócito B mostrando, respectivamente, uma molécula de TCR e uma de anticorpo.

Para prosseguirmos entendendo a importância da imunidade na sobrevivência de todos os seres vivos em nosso planeta, fazemos a seguinte pergunta: Como seria a imunidade nos diversos filos, ou seja, nas plantas, nos animais invertebrados multicelulares e mesmo nos unicelulares eucariotos? Sabemos que todos os seres vivos são passíveis de serem invadidos e parasitados. Vimos que os linfócitos B e T e, com eles, a imunidade adaptativa, surgiram na escala evolutiva apenas a partir dos peixes mandibulados. Portanto, os peixes sem mandíbula (agnatas) e invertebrados não contam com a imunidade adaptativa. As plantas também apresentam imunidade pelas mesmas razões que os animais, ou seja, para autopreservação. Alguns mecanismos e moléculas envolvidos na imunidade de plantas são também observados em animais, mas as plantas também não contam com a imunidade adaptativa.

Estamos certos de que você já se convenceu da importância fundamental da imunidade inata para os filos que não contam com a imunidade adaptativa. Claro que sim, pois, do contrário, eles não existiriam mais em nosso planeta. Vejamos a seguir um pouco sobre a essência da imunidade inata nos seres vivos que habitam a Terra. Ao entendermos o princípio da imunidade de outros filos, poderemos compreender melhor a imunidade dos animais superiores na escala filogenética.

A IMUNIDADE INATA

Conforme vimos na primeira aula, o nascimento da Imunologia como ciência se deu em plena revolução da medicina e, naquele contexto, a imunidade adquirida foi a primeira a ser estudada. Isto porque, como vimos, a imunidade adaptativa conta com a participação dos anticorpos que são produzidos em resposta a um estímulo antigênico. A discussão vigente sobre o fenômeno da imunidade se dava em torno da busca de vacinas que promoveriam a prevenção ou a cura. Assim, estudos sobre a imunidade humoral e, em consequência, sobre os anticorpos, ocuparam durante muitas décadas o centro de atenção e foram objeto de investimento de programas de pesquisas em Imunologia. Por causa destas circunstâncias, a imunidade inata em vertebrados (em especial em seres humanos) não foi investigada em profundidade durante muito tempo.

No entanto, recentemente observamos crescente interesse e investimento em estudos que se dedicam a investigar, em maior profundidade, a imunidade inata de vertebrados superiores. Sem dúvidas, este fato decorre dos avanços que os estudos em **IMUNOLOGIA COMPARADA** têm trazido para a Imunologia como um todo. Assim, estudos sobre a imunidade em insetos, vermes (helminths) e até em plantas têm demonstrado a existência de moléculas e de mecanismos envolvidos na resposta imune, a qual é bastante eficiente na eliminação de patógenos como vírus, fungos e bactérias, por exemplo. De fato, a imunidade eficiente de invertebrados e plantas explica e justifica a fabulosa quantidade de espécies de animais e plantas (na casa dos milhões) que permanecem adaptadas desde o seu surgimento no planeta até o presente.

Uma vez que a imunidade adaptativa surgiu apenas a partir dos vertebrados superiores, os demais seres vivos contam só com a imunidade inata para se defenderem de organismos invasores. Estudos em Genética Molecular mostram que muitos genes e seus produtos, bem como mecanismos (envolvendo elementos celulares e humorais) da imunidade inata, são compartilhados entre invertebrados e vertebrados (incluindo seres humanos). As plantas também compartilham com os animais semelhanças moleculares e mecanismos intracelulares de eliminação de agentes infecciosos envolvidos na resposta a patógenos.

Um exemplo de classe de moléculas pertencentes à imunidade inata que são compartilhadas entre animais superiores, inferiores e

IMUNOLOGIA COMPARADA

Área de investigação da Imunologia em associação com a Zoologia; estuda a imunidade de animais pertencentes a diversos filos em perspectiva evolutiva.

plantas são aquelas denominadas “antibióticos intracelulares”. Essas moléculas têm em comum o fato de serem de natureza protéica e de exibirem atividades antimicrobianas de largo espectro. Dentre os antibióticos intracelulares (presentes em plantas, insetos e humanos, por exemplo) estão as “*defensinas*”, que são pequenos peptídeos com atividades contra bactérias (gram-negativas e gram-positivas), fungos e alguns vírus que contêm envelope. Os neutrófilos, que são células que compõem a imunidade inata e pertencem à linhagem hematopoiética granulocítica com altíssima capacidade fagocítica (como veremos na próxima aula) sintetizam muitas moléculas envolvidas na imunidade contra patógenos, dentre elas as defensinas. Veja, na **Figura 2.2**, o desenho esquemático de um neutrófilo evidenciando seu núcleo, mitocôndrias e dois tipos de grânulos presentes no citoplasma, grânulos primários ou azurofílicos (assim chamados porque possuem afinidade para corantes azuis) e grânulos secundários ou específicos. Os grânulos primários se formam nos estágios iniciais do processo de diferenciação dos neutrófilos; os grânulos secundários se formam mais tardiamente. Ambos contêm muitas moléculas envolvidas na resposta imune (dentre elas diferentes tipos de defensinas). Ao longo de nosso curso, iremos abordar mais vezes este assunto.

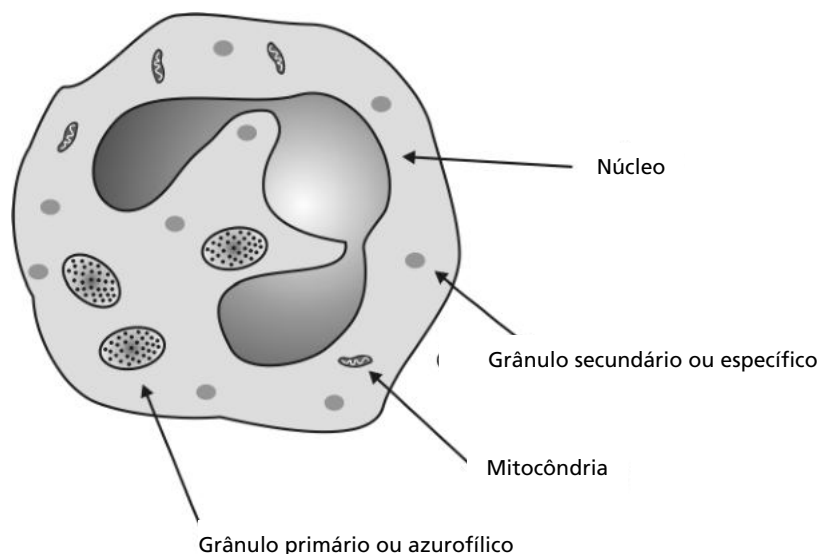


Figura 2.2: Desenho esquemático de um neutrófilo evidenciando os grânulos primários e secundários que contêm defensinas.

As defensinas compartilham domínio de estrutura contendo três pontes dissulfeto que mantêm uma estrutura hidrofóbica em folha beta (você pode rever este assunto no Módulo 3 da disciplina Bioquímica I, sobre a estrutura terciária de proteínas) que permitem estas moléculas se inserirem na bicamada lipídica de seus agressores. O desenho esquemático de uma defensina “hipotética” pode ser visto na **Figura 2.3**. As letras N e C denotam as extremidades amino e carboxila terminais, respectivamente; CC representam resíduos do aminoácido cisteína formando pontes dissulfeto. As setas representam porções da molécula de defensina, cuja estrutura terciária se apresenta como folhas β .

Se você quiser saber mais sobre antibióticos intracelulares, poderá ler o artigo publicado por Niels Borregaard (Encyclopedia of Life Sciences/2001, Nature Publishing Group/www.els.net). Sobre a imunidade de invertebrados e plantas, uma boa sugestão é consultar artigos publicados em periódicos (revistas científicas) como a *Developmental and Comparative Immunology*, o *Current Protein and Peptide Science* ou o *Current Drug Targets - Infectious Disorders*. Temos certeza de que você, estudante do curso de Biologia, encontrará muitos trabalhos interessantes e importantes para a sua formação profissional nesses periódicos. Não desanime pelo fato de estarem em inglês, pois a leitura de textos técnicos em inglês não é tão difícil, e é cada vez mais necessária em todas as áreas do conhecimento! Se você ainda não tem familiaridade com a leitura de textos em inglês, uma boa maneira de começar é tentando entender as figuras, já que elas sempre ajudam na compreensão do texto. Vamos lá! Não deixe para depois!

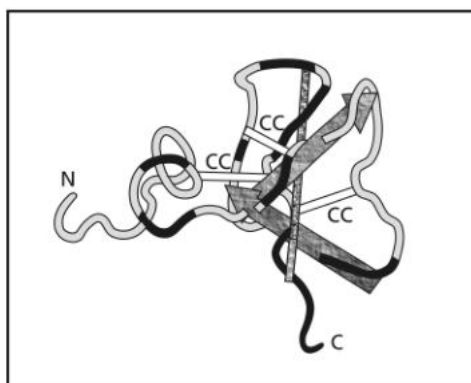


Figura 2.3: Desenho esquemático de uma defensina mostrando as extremidades amino (N) e carboxila (C) terminais. CC representam resíduos do aminoácido cisteína formando pontes dissulfeto.

A imunidade inata dos vertebrados superiores guarda o princípio (presente em toda a escala evolutiva) de utilizar “receptores para padrões de reconhecimento” (do inglês *pattern recognition receptors* PRRs), que são estruturas moleculares presentes na superfície das células componentes da imunidade inata (como, por exemplo, macrófagos e neutrófilos) que reconhecem “padrões moleculares” encontrados em microrganismos e não encontrados em células de eucariotos.

Estes padrões moleculares são também conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Vejamos alguns exemplos de moléculas de microrganismos que são padrões moleculares para reconhecimento associados a patógenos (PAMPs) e que são reconhecidas pelos PRRs: peptidoglicanas presentes na parede de bactérias; polissacarídeos (manana); monossacarídeos (manose); lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas; RNA dupla-hélice produzido durante infecções de vírus de RNA. Portanto, estes padrões moleculares são reconhecidos como estranhos (não-próprios) por componentes celulares da imunidade inata (fagócitos) dos vertebrados superiores, que o fazem através dos PRRs presentes na sua superfície celular.

Na mosca de frutas (a drosófila), foram identificados um grupo de PRRs que foram batizados de receptores *Toll*. Os receptores Toll, presentes na superfície de células da hemolinfa das drosófilas, reconhecem PAMPs e, por isso, são importantes na defesa daquelas moscas contra patógenos. Em animais superiores, foram descobertos receptores na superfície de fagócitos similares aos receptores Toll das drosófilas e, por isso, foram batizados de TLR, do inglês *Toll like receptors* (que quer dizer receptores similares aos receptores Toll). Veja a **Figura 2.4**, que exemplifica uma única célula contendo, na sua superfície, diferentes tipos de TLR que reconhecem diferentes PAMPs. Em humanos, pelo menos dez TLRs têm sido descritos, e alguns já têm a sua localização cromossômica identificada. Na **Figura 2.4**, mostramos três TLRs: TLR-2, TLR-3 e TLR-5 que, respectivamente, reconhecem lipoproteínas e **PEPTIDEOGLICANAS** de origem bacteriana; RNA de dupla-hélice de origem viral e **FLAGELINAS**.

Vamos supor que um indivíduo foi infectado pelo vírus “D”, cujo material genômico é constituído por RNA (o vírus HIV, que causa a AIDS, é um exemplo deste tipo de vírus). Ocorrerá a interação de RNA viral (de dupla-hélice) com moléculas de TLR-3 presentes na superfície

PEPTIDEOGLICANAS

São estruturas poliméricas compostas por monômeros idênticos presentes na parede de bactérias. Os monômeros são compostos por dois amino-açúcares: N-acetil glicosamina e ácido N-acetil murâmico, ao qual está ligado um pentapeptídeo cuja composição de aminoácidos se mostra conservada entre as bactérias.

FLAGELINA

É a proteína estrutural presente em flagelos de bactérias que os possuem. Os flagelos são estruturas importantes na locomoção de bactérias e constituem um fator de virulência, pois participam de processos de invasão e adesão de bactérias em seus hospedeiros. A flagelina apresenta-se como uma proteína bastante conservada entre diferentes espécies de bactérias.

de um fagócito (componente celular da imunidade inata). Estes fagócitos irão interagir com os linfócitos T que, por sua vez, irão interagir com os linfócitos B. Estes últimos produzirão anticorpos contra o vírus D, os quais irão auxiliar na eliminação de partículas virais do indivíduo. Assim, a ação dos anticorpos somada às ações contra a replicação do vírus D, mediada pelos fagócitos e linfócitos T, contribuirá (em conjunto) para o desenvolvimento da imunidade do indivíduo contra o vírus D. Este fato é um exemplo concreto (embora seja a simulação de uma situação) de que elementos celulares da imunidade inata (fagócitos) interagem com elementos da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) para comporem a imunidade, como um todo, do indivíduo, conforme comentamos anteriormente.

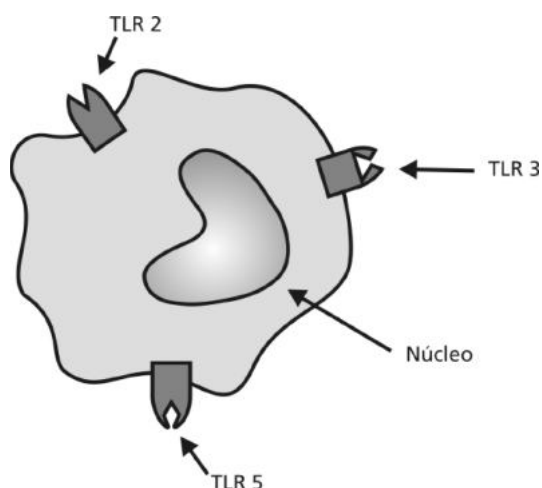


Figura 2.4: Desenho esquemático de um fagócito mostrando três tipos de TLRs presentes na superfície de uma única célula.



As lipoproteínas são uma classe de biomoléculas cujos componentes lipídicos interagem com a parte protéica de forma não covalente. A principal força de ligação à parte lipídica e à parte protéica é a interação hidrofóbica.



A ativação de células mediada por TLRs pode levar não só ao desenvolvimento de resposta imune inata como, também, poderá desencadear a resposta imune adaptativa!

O conceito de utilizar “padrões de reconhecimento” por parte dos elementos que compõem a resposta imune inata não se limita aos PRRs presentes na superfície das células fagocíticas, conforme já vimos. Este conceito se aplica também aos componentes humorais da imunidade inata, tanto de invertebrados quanto de vertebrados. Assim, verificamos o

reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos, por parte de elementos da imunidade inata humoral, na medida em que, por exemplo, moléculas como a enzima lisozima (presente na hemolinfa de insetos ou nas secreções mucosas ou lágrimas de animais vertebrados) se ligam e clivam peptidoglicanas presentes na parede de bactérias.

Didaticamente, podemos nos referir aos mecanismos de defesa que compõem a imunidade inata como sendo componentes de quatro tipos de barreiras: anatômica, físico-química, endocítica e inflamatória. O **Quadro 2.1** resume exemplos de elementos celulares e moleculares que compõem estas barreiras em vertebrados superiores.

Quadro 2.1: Tipos de barreiras que compõem a imunidade inata de vertebrados superiores

Tipo de barreira	Descrição
Barreira anatômica	A pele e as mucosas constituem barreiras anatômicas que impedem ou retardam a entrada de elementos estranhos. O pH da pele, mantido pela secreção de ácidos graxos e ácido láctico, em torno de 3 a 5, não é propício para o crescimento microbiano. A " FLORA NORMAL " das mucosas é constituída por microrganismos que competem com agentes patogênicos. O muco e os cílios da mucosa auxiliam a expulsão de agentes microbianos da superfície do corpo.
Barreiras físico-químicas	A temperatura fisiológica dos animais homeotérmicos, assim como a capacidade dos mesmos em produzir febre, inibe o crescimento de alguns agentes microbianos. Moléculas como interferon, lisozima, componentes do sistema complemento, que estão presentes como constituintes fisiológicos de humores dos animais, reconhecem "padrões moleculares" encontrados em microrganismos e, a partir deste reconhecimento, podem eliminá-los. O pH ácido do estômago é nocivo para muitos microrganismos.
Barreiras endocíticas	Células com capacidade de internalizar moléculas e/ou materiais particulados ou microrganismos e parasitas o farão através de endocitose, que se dará através da fagocitose ou pinocitose (veja a Aula 19 da disciplina Biologia Celular I). A internalização de moléculas ou de microrganismos poderá implicar mecanismos de defesa, que eliminarão patógenos no interior da célula.
Barreira inflamatória	O processo inflamatório, que é deflagrado em situações de injúria tecidual (infecciosa ou não), irá trazer ao local da inflamação moléculas com atividades antimicrobianas (proteínas do sistema complemento, por exemplo), bem como células com capacidade fagocítica, isto é, aquelas com capacidade de exercer fagocitose.

FLORA NORMAL

Consiste no conjunto de microrganismos (bactérias, fungos e protozoários) que habita o corpo de animais sem causar prejuízos, mantendo com seus hospedeiros uma relação de comensalismo ou simbiose.



ATIVIDADE

1. Vamos simular uma situação, para que possamos exercitar a conceituação da imunidade inata. Imagine que você esteja passeando com amigos em uma fazenda e resolva tirar os sapatos para ficar em maior contato com a Natureza. De repente, você se distrai e leva um pequeno corte no pé, causado por um caco de vidro deliberadamente deixado no seu caminho. Não há medicamento algum na fazenda. Você se preocupa com a contaminação do corte, pois sabe que o local está cheio da bactéria *Escherichia coli*, por causa das fezes dos animais que ali freqüentam. Você deixa o sangue fluir e lava o local do corte com água limpa, protegendo o machucado com gaze limpa (o único recurso de primeiros socorros existente na fazenda). Algumas horas depois, você continua com um pouco de dor no local, que não sangra mais. Todavia, ao redor do corte, você observa que há sinais de inflamação (a pele está vermelha, inchada e quente). Após dois dias, o local já está quase que completamente desinflamado, tendo-se formado uma crosta escurecida (casca) no local do corte. Com mais três dias (tendo-se passado cinco dias desde o corte), a crosta já se solta da pele e o machucado está completamente curado; você não sente absolutamente mais nada. Considerando que, com toda a certeza, houve contaminação do corte pela bactéria *Escherichia coli*, perguntamos: Qual(is) o(s) tipo(s) de defesa não-específica que provavelmente atuou(aram) no local do corte? Recorra ao **Quadro 2.1** para responder a esta pergunta.

COMENTÁRIO

*Se você respondeu que os mediadores químicos, as barreiras endodíticas e as barreiras inflamatórias provavelmente atuaram, você acertou. Na verdade, não é possível precisar se todos os três, apenas um, ou ainda alguns de quaisquer dos três tipos de defesa inata atuaram no local do corte. O fato é que o seu organismo eliminou, por meio da imunidade inata, a infecção causada pela *Escherichia coli* que lhe contaminou o pé, quando ocorreu o corte.*

A IMUNIDADE ADAPTATIVA

A imunidade adaptativa, conforme vimos, aparece na escala filogenética a partir dos peixes mandibulados. Na imunidade adaptativa estão envolvidas as participações de linfócitos B e T, células do sistema imunológico que reconhecem antígenos de maneira bastante específica (apresentam especificidade refinada). Tanto os linfócitos B quanto os linfócitos T são os responsáveis pela especificidade refinada e pela memória imunológica da resposta imune adaptativa.

Chamamos “*repertório imunológico*” o conjunto de possibilidades de reconhecimento de antígenos (o qual é mensurável numericamente) por parte do sistema imune. Os anticorpos e os TCRs são os elementos moleculares chave que permitem ao sistema imune de vertebrados superiores apresentarem um espantoso repertório imunológico. Para se ter uma idéia, o repertório imunológico constituído pelos linfócitos B pode discriminar entre 10^9 e 10^{11} determinantes antigênicos!

A especificidade refinada dos linfócitos se deve a uma propriedade que é exclusiva destes tipos celulares e os diferem de todos os demais tipos celulares que compõem o sistema imunológico e os demais sistemas dos animais vertebrados. Essa propriedade diz respeito à organização genômica que codifica para os anticorpos e os TCRs. Os genes que codificam para estas moléculas sofrem um processo de rearranjo somático denominado **RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA**, o qual é aleatório e dotará cada linfócito B e T de uma única estrutura molecular para reconhecimento antigênico (respectivamente o anticorpo e o TRC). Por causa desta característica, todos os demais linfócitos B e T que se originarem a partir daquele que sofreu a recombinação somática serão idênticos e pertencerão a um mesmo **CLONE** de linfócitos B ou de T. Portanto, apenas a partir do momento em que os linfócitos B e T sofrem o processo de recombinação somática é que os mesmos estão prontos (maduros) para atuarem como células competentes para a resposta imune. Em uma aula específica sobre este assunto, veremos em detalhes os mecanismos moleculares da recombinação somática, que é responsável pela geração do vasto repertório de reconhecimento antigênico composto pelo conjunto de linfócitos B e T de um indivíduo.

RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA

Também chamada rearranjo somático é o processo de recombinação do DNA que codifica mensagens para a produção de anticorpos e TCRs em linfócitos B e T. Esse processo ocorre durante o desenvolvimento e maturação (ontogenia) daqueles linfócitos. O resultado da recombinação somática, que se dá por meio de ação de enzimas que cortam e religam o DNA, é a geração de um número muito maior de possibilidades de produtos protéicos (anticorpos ou TCRs) a partir de um número relativamente pequeno de segmentos gênicos separados entre si por íntrons. Este parece ser um mecanismo evolutivo que surgiu e foi capaz de gerar diversidade de reconhecimento antigênico com economia de material genômico. Veremos mais detalhadamente este assunto na aula sobre Geração de Diversidade do Sistema Imune.

Um **CLONE** de linfócito B ou T consiste no conjunto de linfócitos B ou T idênticos entre si (porque contêm apenas um tipo de molécula de anticorpo ou TCR) e gerados a partir de uma única célula inicial após esta ter passado pelo evento da recombinação somática.

Para que os linfócitos B e T específicos atuem contra um determinado antígeno, necessitam sofrer “*expansão clonal*”. A expansão clonal consiste na multiplicação sucessiva (proliferação) de células (clones) de linfócitos específicos para o antígeno em questão. A **Figura 2.5** ilustra a expansão clonal de linfócitos B contra o antígeno X. Note que, no exemplo, o antígeno X foi capaz de estimular a expansão de três diferentes clones de linfócitos B. Os vários clones mostrados neste exemplo, embora reconheçam o antígeno X, diferem entre si, por serem capazes de reconhecer diferentes partes da molécula. Cada clone contém imunoglobulina de apenas um tipo, ou seja, imunoglobulina que reconhece uma determinada parte do antígeno X. A esta parte determinada do antígeno X que é reconhecida pelo respectivo anticorpo chamamos *determinante antigênico* ou *epitopo*. Portanto, um único antígeno (dependendo do seu tamanho) pode conter vários determinantes antigênicos ou epitopos.

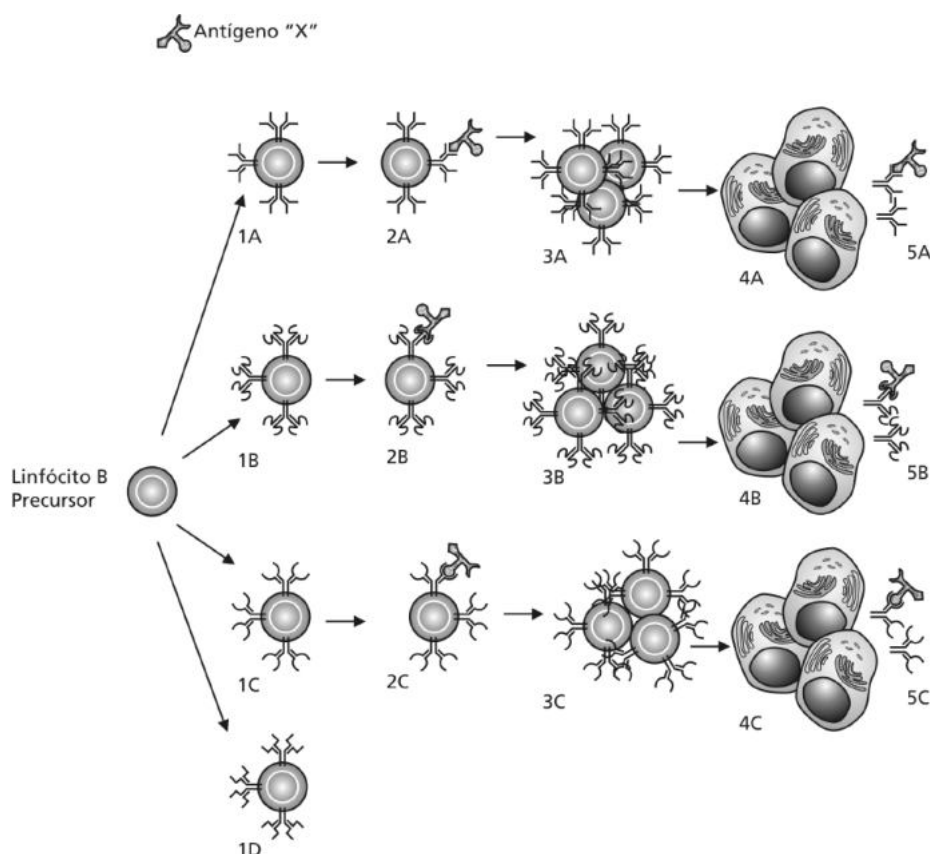


Figura 2.5: Geração aleatória de clones de linfócitos B e expansão clonal dos mesmos contra o antígeno X.

No exemplo da **Figura 2.5**, ressaltamos três epítomos do antígeno X geometricamente representados como uma extremidade triangular, uma arqueada e uma bifurcada. Nesta figura, mostramos de maneira simplificada as etapas de formação de quatro clones. A partir de um linfócito B precursor (antes do evento da recombinação somática), temos a etapa 1 em que, aleatoriamente, são formados os quatro clones. Três deles (1A, 1B, e 1C) reconhecerão o antígeno X e, um deles (1D) não o reconhecerá. A partir da ligação do antígeno X com os clones 2A, 2B, e 2C (etapa 2) ocorrerá a expansão dos mesmos (etapa 3). Segue-se à etapa 3 a diferenciação dos linfócitos B em *plasmócitos* (etapa 4). Os plasmócitos são células que secretarão grandes quantidades de anticorpos específicos para o antígeno X, mostrados na etapa 5. Note que, embora tenha havido aleatoriamente a formação do clone D, este não reconheceu o antígeno e a expansão clonal dele não ocorreu. Este exemplo simplificado ilustra que a influência do antígeno sobre a proliferação dos clones somente se dá após o evento da recombinação somática.



ATIVIDADE

2. Vamos simular a mesma situação da Atividade 1 desta aula, para que possamos exercitar sobre a conceituação da imunidade adquirida. Imagine que, ao mesmo tempo em que você estava passeando e se cortou, um amigo que estava na mesma fazenda resolveu, como você, tirar os sapatos e também se cortou. Lembre-se de que não há medicamento algum na fazenda. Ele também higieniza o corte e o cobre com gaze limpa. Algumas horas depois, continua com um pouco de dor no local, que também não sangra mais. Diferentemente de você, seu amigo amanhece com febre e com o local do corte bastante inflamado e com pus. Dois dias depois, ele sente dores na virilha (íngua), do mesmo lado do pé que sofreu o corte; ainda tem febre. Passam-se cerca de oito dias para que o seu amigo sinta que “vai sair desta”. Ou seja, a partir do oitavo dia ele observa que o local do corte já está desinflamando e começa a se formar uma crosta escurecida no local do corte. Com mais quatro dias (tendo-se passado, então, 12 dias desde o dia do corte), a crosta já começa a se soltar da pele e o machucado está quase curado. Seu amigo não sente absolutamente mais nada. Alguns dias depois, ao voltar para a cidade, ele fez um teste sorológico que mostrou a presença de anticorpos anti *Escherichia coli* no soro. Considere também que, com toda certeza, houve contaminação do corte com a bactéria *Escherichia coli*.

Perguntamos: 1) Teria havido atuação de elementos da imunidade inata no curso da resposta imune de seu amigo? Justifique sua resposta. 2) Teria havido atuação de elementos da imunidade adquirida no curso da resposta imune de seu amigo? Explique sua resposta.

COMENTÁRIO

Se você respondeu sim à primeira pergunta, você acertou. Provavelmente, a resposta inata não foi eficaz por mais de um motivo. Por exemplo, podemos considerar que a quantidade de bactérias que penetrou no corte do seu amigo foi muito grande e os elementos da imunidade inata não foram capazes de eliminá-las no mesmo espaço de tempo que atuaram no seu organismo.

*Se você respondeu sim à segunda pergunta desta atividade, você também acertou. As evidências para o fato de que tenha havido a atuação de elementos da imunidade adquirida se dão pela presença de anticorpos anti *Escherichia coli* no soro de seu amigo e também, pelo tempo de duração da resposta imune, desde o corte até a cura. Este tempo, que foi longo, é característico da resposta imune adquirida. A partir da próxima aula, você poderá compreender por que o seu amigo apresentou dores na virilha esquerda. Aguarde!*

RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA: SEMELHANÇAS E DIFERENÇAS

Você, a esta altura, pode estar pensando a respeito da semelhança óbvia que existe no reconhecimento de estruturas estranhas ao organismo (antígenos) por parte dos PRRs, dos anticorpos e dos TRCs – o que seria esperado, pois esta semelhança implica defesa contra estruturas estranhas, por meio do seu reconhecimento pelo organismo. Vamos, de agora em diante, chamar antígeno toda substância (de natureza química e de procedências diversas) que interage com estruturas de reconhecimento

(PRRs, anticorpos e TCRs) do sistema imune. Ou seja, as estruturas de reconhecimento antigênico podem ser classificadas no âmbito da resposta imune inata, quando envolvem os PRRs, ou no âmbito da imunidade adaptativa, quando envolvem os anticorpos e os TCRs. Chamamos a atenção para este fato, pois, na aula passada, ao definir antígeno, tivemos de fazê-lo em um contexto mais limitado, porque era o único possível de ser entendido naquele momento.

Portanto, agora é importante distinguir as diferenças entre os tipos de reconhecimento antigênico por parte dos linfócitos T e B (imunidade adquirida) e por parte dos fagócitos através de seus PRRs (imunidade inata).

As diferenças fundamentais entre ambas (imunidade inata x imunidade adquirida) se distinguem em três aspectos principais. O primeiro aspecto diz respeito ao tempo em que ambas começam a atuar no curso da resposta imune como um todo, ou seja, a resposta inata se inicia minutos após o organismo ter sido invadido por um patógeno, por exemplo. Já a resposta adquirida demora dias para se manifestar. O segundo aspecto está relacionado ao tamanho do repertório de ambos os tipos de resposta, sendo o repertório da imunidade adquirida bem maior do que o da imunidade inata. O terceiro aspecto diz respeito à capacidade de memória, que é propriedade exclusiva da imunidade adquirida. Devemos, ainda, destacar o fato de que cada linfócito T ou B reconhece um único determinante antigênico ou epitopo através de um só tipo de receptor presente em sua superfície, que são os TCRs e os anticorpos, respectivamente. Em contraste, cada fagócito, por exemplo, pode apresentar, na superfície (de uma única célula), uma série de receptores que reconhecem vários antígenos diferentes ao mesmo tempo. Reveja a **Figura 2.4** e compare-a com a **Figura 2.5**; olhe a diferença entre elas. Na **Figura 2.4**, uma única célula apresenta TRLs com capacidade para reconhecer diferentes antígenos; ao contrário, na **Figura 2.5**, cada clone de linfócito B apresenta anticorpos com uma única especificidade. Portanto, cada elemento celular da imunidade inata apresenta-se com especificidade antigênica mais ampla do que cada elemento celular da imunidade adaptativa. Porém, cada elemento celular da imunidade adaptativa, através de sua especificidade refinada faz, no seu conjunto, um repertório muito mais amplo do que o repertório constituído pelos elementos celulares da imunidade inata. Isto porque a imunidade adaptativa utiliza a recombinação somática para produzir uma série de linfócitos T e B que, no

seu conjunto, fazem um vastíssimo repertório capaz de reconhecer uma série de determinantes antigênicos.

A Figura 2.6 ilustra, de forma comparativa, o tempo necessário para a manifestação da resposta imune adquirida e da imunidade inata contra microrganismos. Observe que a escala de tempo para a imunidade inata é dada em horas e para a imunidade adaptativa é dada em dias.

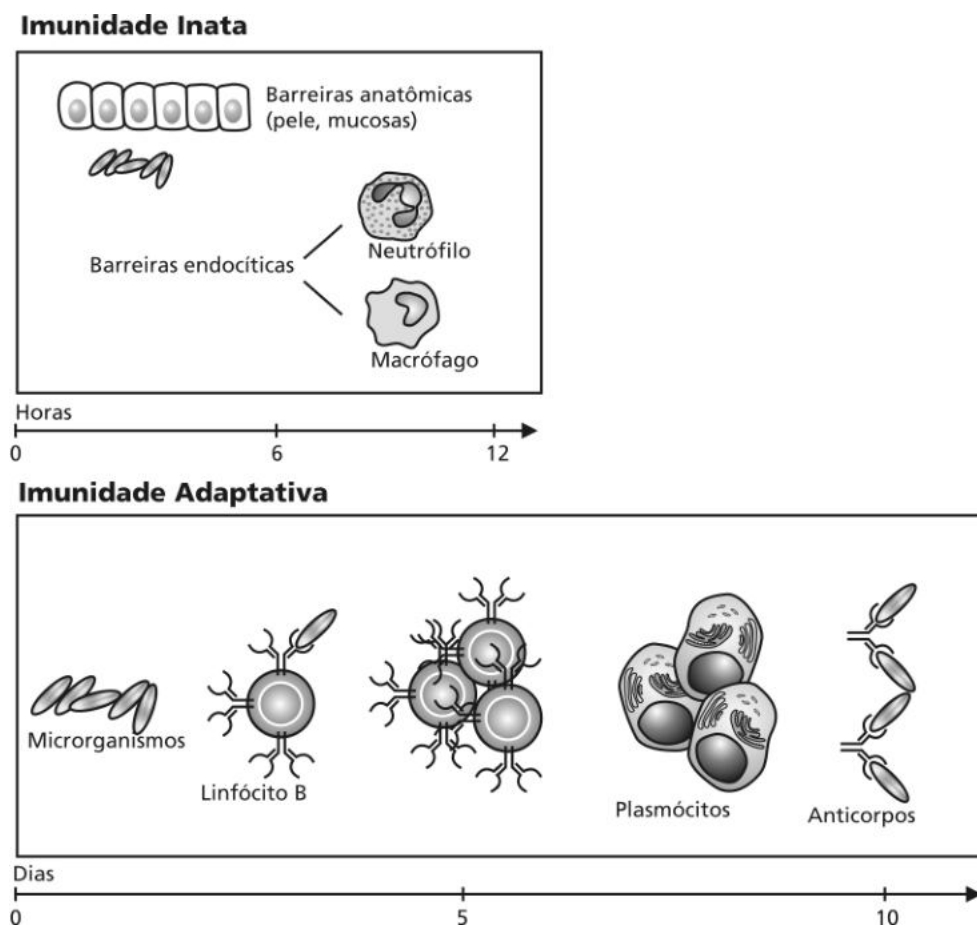


Figura 2.6: Imunidade inata e adaptativa em função do tempo após a infecção de um indivíduo por microrganismos.

A **Figura 2.7** ilustra o fenômeno da memória imunológica mostrando o tempo mais curto necessário para que a imunidade adaptativa se manifeste (neste exemplo, com a produção de anticorpos antimicroorganismos). A partir da segunda vez em que o indivíduo entra em contato com o referido antígeno, a produção de anticorpos ocorre em espaço de tempo menor. Veja a escala de tempo nos dois gráficos da **Figura 2.7**. Observe ainda que, na segunda vez em que o organismo entra em contato com o antígeno (microorganismo), a produção de anticorpos é mais vigorosa. Aguarde mais um pouco para você entender, em outra aula, por que isto acontece desta maneira.

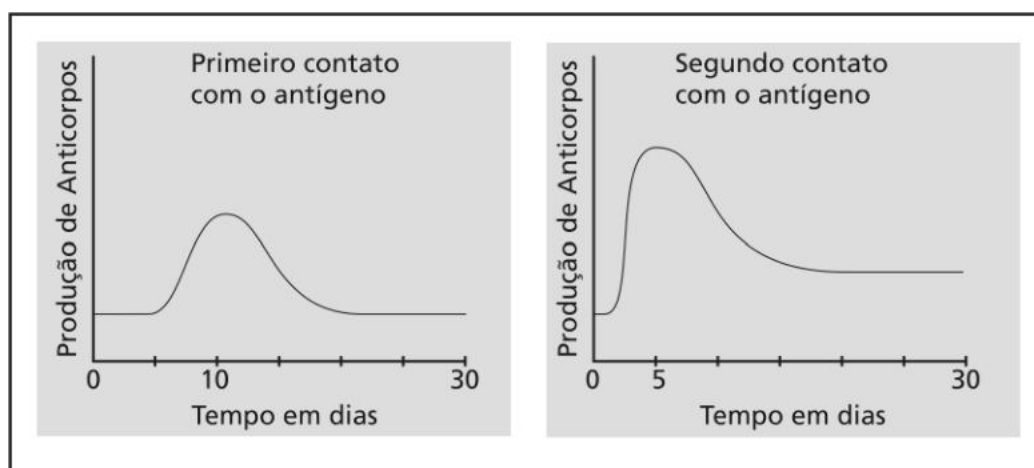


Figura 2.7: Produção de anticorpos ao primeiro contato com o antígeno e ao segundo contato com o mesmo antígeno, quando a memória imunológica garante menor tempo necessário para a produção de anticorpos. Compare as escalas de tempo de ambas as curvas de produção de anticorpos.

Hoje você deu mais um passo importante no aprendizado de Imunologia, porque agora você sabe que o sistema imune funciona discriminando o próprio do não-próprio. É provável que nunca mais você tenha um simples resfriado sem imaginar o que estarão fazendo os seus fagócitos e os seus linfócitos T e B para mantê-lo vivo! Ao longo do nosso curso iremos mostrar, em níveis cada vez mais detalhados, o que fazem as nossas moléculas e células para nos manter íntegros e hágeis! Veremos também exemplos do “estrango” que acontece quando isto não ocorre!

ATIVIDADE FINAL

1. Componha o quadro abaixo com as letras correspondentes às quais se referem as principais características que diferem a imunidade inata da imunidade adaptativa.

Principais características que diferem a imunidade inata da imunidade adaptativa	
Imunidade inata	Imunidade adaptativa

- a) Especificidade ampla de cada elemento que reconhece antígeno.
- b) Repertório amplo.
- c) Especificidade refinada de cada elemento que reconhece antígeno.
- d) Desenvolvimento de memória.
- e) Manifesta-se imediatamente após injúria.
- f) Repertório restrito.
- g) Ausência do desenvolvimento de memória.
- h) Manifesta-se algum tempo após injúria.

RESPOSTA COMENTADA

Se as letras a, e, f e g ocuparam a coluna da imunidade inata e as letras c, d, b e h ocuparam a coluna da imunidade adaptativa, você acertou. Parabéns! Se você não acertou, sugerimos que volte e releia esta aula, para que não fiquem dúvidas quanto ao preenchimento correto do quadro. Vamos lá! Estes conceitos são importantes de serem memorizados corretamente.

RESUMO

A imunidade é um fenômeno biológico essencial para a vida de qualquer ser vivo, dos mais simples aos mais complexos – animais ou vegetais que habitam o nosso planeta. A imunidade preserva a individualidade de cada organismo contra a invasão ou colonização por outro da mesma espécie ou, ainda, de espécie diferente. Distinguimos dois tipos de imunidade: a imunidade inata (presente em toda a filogênese) e a imunidade adquirida (presente a partir dos vertebrados superiores mandibulados), a qual surge com o aparecimento de dois tipos celulares chamados linfócitos B e linfócitos T. Nos vertebrados superiores, os dois tipos de imunidade se integram para constituir a imunidade do indivíduo como um todo.

O reconhecimento de elementos estranhos (antígenos) se faz através de células e moléculas solúveis nos humores (líquidos) dos animais (secreções mucosas, soro, e hemolinfa, por exemplo). Estas células e moléculas que reconhecem os antígenos podem ser classificadas como pertencentes tanto à imunidade inata quanto à imunidade adquirida. As diferenças entre ambas se referem a três características principais: 1) no tempo que levam para que se estabeleçam, 2) na capacidade de distinguir diferenças moleculares sutis dos antígenos e 3) na capacidade de memória da reação imunológica aos antígenos.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, estudaremos as células e os órgãos que compõem o sistema imune dos vertebrados superiores. Você verá o quão fantástica é a estrutura organizacional e a especialização de algumas células que compõem esse sistema fascinante. Aguarde!

Células e órgãos do sistema imune

AULA 3

Meta da aula

Descrever as células e órgãos que compõem o sistema imune dos vertebrados superiores e suas respectivas funções.

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Descrever a estrutura morfológica das células e órgãos do sistema imune de vertebrados superiores.
- Definir a estrutura funcional das células e órgãos do sistema imune de vertebrados superiores.
- Definir características fenotípicas das células do sistema imune.

Pré-requisitos

Para acompanhar esta aula, você precisa ter estudado as Aulas 1 e 2 de Imunologia, as Aulas 5 e 6 de Biologia Celular e a Aula 12 do Módulo 3, Volume 2 da disciplina Diversidade Biológica dos Deuterostomados. Também será necessário lembrar-se das noções básicas de embriologia vistas na disciplina Diversidade dos Seres Vivos.

INTRODUÇÃO

HEMATOPOIESE

Palavra de origem grega (*haima* = sangue e *poiein* = fazer) que significa o processo de produção de todas as células sanguíneas: eritrócitos (hemácias), leucócitos (células brancas, dentre as quais se incluem os linfócitos e fagócitos, entre outras) e as plaquetas (que são importantes no processo de coagulação sanguínea). A produção de todas as células do sangue ocorre a partir da *célula-tronco* comum, que se auto-renova e dá origem às células descendentes das linhagens progenitora Mielóide e progenitora Linfóide, conforme veremos a seguir. Em adultos, este processo se passa na medula dos ossos planos ou chatos, principalmente no esterno, e nos ossos ilíacos, que são os ossos da bacia.

LINHAGEM PROGENITORA MIELÓIDE

A linhagem progenitora mielóide, durante a hematopoiese, dará origem aos eritrócitos, às plaquetas, aos basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos, conforme veremos em detalhes a seguir.

LINHAGEM PROGENITORA LINFÓIDE

A linhagem progenitora linfóide, durante a hematopoiese, dará origem aos linfócitos T, aos linfócitos B e às células NK.

Conforme vimos na Aula 2, a imunidade dota os seres vivos da capacidade de distinguir o que lhe é próprio (*self*) do que não lhe é próprio (*nonself*). Na medida em que subimos, em termos de complexidade dos sistemas (veja o box de atenção), na escala evolutiva do reino animal, observamos paralelamente o incremento de elementos celulares e moleculares que passam a fazer parte da imunidade das espécies. Assim, nos vertebrados superiores, mais especificamente nos mamíferos, observamos que a imunidade resultará do conjunto de moléculas e células (originadas na medula óssea através de um processo denominado **HEMATOPOIESE**) distribuídas em órgãos especializados, que são os *órgãos linfóides*. Os órgãos linfóides serão detalhadamente definidos nesta aula. Eles são constituídos por células que formam seu arcabouço de sustentação e abrigam:

1. células provenientes da **LINHAGEM PROGENITORA MIELÓIDE**;
2. células provenientes da **LINHAGEM PROGENITORA LINFÓIDE** (linfócitos T, linfócitos B e **CÉLULAS NK**).



A palavra sistema será utilizada para designar sistemas orgânicos/biológicos, alguns dos quais lhe são familiar (por exemplo: Sistema Endócrino, Sistema Nervoso, Sistema Imune) e também para designar conjuntos de elementos celulares e moleculares que guardam alguma relação (de função e/ou origem) entre si, por exemplo, sistema complemento, sistema linfóide etc.

Os linfócitos T e B aparecem na escala evolutiva “de uma vez”, a partir dos peixes com mandíbulas. Ao contrário, os fagócitos se fazem presentes praticamente em toda a escala evolutiva, conforme vimos nas Aulas 1 e 2. Nesta aula iremos descrever os órgãos e as células do sistema imunológico dos vertebrados superiores, mais especificamente dos mamíferos. Em aves e mamíferos chamamos Sistema Imune ou Sistema Imunológico o sistema abrangente que compreende o **SISTEMA LINFÓIDE**, as células provenientes da linhagem precursora mielóide e o Sistema Complemento do qual já falamos um pouco nas Aulas 1 e 2. Iremos tratar detalhadamente sobre o Sistema Complemento na Aula 7. As proteínas que compõem o Sistema Complemento são bastante antigas do ponto de vista filogenético, o que significa dizer que, na escala evolutiva inicial, observamos animais cujas respostas imunes contam com mecanismos que envolvem proteínas similares, algumas muito semelhantes àquelas do Sistema Complemento de animais superiores na escala evolutiva.

A origem embrionária do sistema imune se dá a partir do mesênquima. A origem de dois outros sistemas celulares, que são o sistema Nervoso e o sistema Endócrino, se dá a partir do ectoderma e do endoderma, respectivamente. Os três sistemas Imune, Nervoso e Endócrino, influenciam-se mutuamente e apresentam semelhanças no seu modo de operar. Chamamos sistema neuro-imuno-endócrino o macro sistema biológico que abrange os três sistemas, isto é, o sistema Nervoso, o Imune e o Endócrino. As interseções desses três sistemas se fazem por meio de receptores na superfície das células que compõem cada um deles. Tais receptores se ligam e respondem a moléculas produzidas por células de cada um dos três sistemas em separado. O sistema neuro-imuno-endócrino tem sido objeto de intensa investigação científica nos últimos dez anos.

AS CÉLULAS SANGÜÍNEAS DO SISTEMA IMUNE

As células que compõem o sistema imune dos vertebrados superiores têm sua origem na medula óssea, pela hematopoiese, a partir das células-tronco. Leia o box de atenção e veja a **Figura 3.1**. Caso você ainda tenha dúvida, reveja este conceito na Aula 4 do Módulo 1 de Biologia Celular I.

Em seres humanos e em camundongos, a maioria das células do sangue é originada e amadurece na medula óssea. Uma exceção são os linfócitos T, que são originados na medula e amadurecem no timo. As células do sangue que não são hemácias (ou eritrócitos) são coletivamente chamadas células brancas ou glóbulos brancos ou leucócitos.



As células-tronco são auto-renováveis e mantêm a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular. Essas células, ao se dividirem, dão origem a células de várias linhagens multipotentes como, por exemplo, aquelas que darão origem a todas as células do sangue.

Em humanos, a hematopoiese se inicia na membrana do saco vitelínico nas primeiras semanas da vida embrionária. No terceiro mês de gestação, essa função passa a ser desempenhada pelo fígado e pelo baço fetal. Nestes dois órgãos, a função hematopoiética permanece até o sétimo mês, quando a medula óssea assume esta função. Entretanto, já no nascimento, a hematopoiese fica restrita à medula óssea e, progressivamente, com a idade, apenas na medula dos ossos chatos, de tal forma que, a partir da puberdade, esta função ocorre principalmente nos ossos do esterno, nos ossos ilíacos, vértebras e costelas.

CÉLULAS NK

As células NK (do inglês *Natural Killer*, que significa assassinas naturais) consistem em um tipo de linfócito que não sofre recombinação somática, conforme vimos na Aula 2. Estas células são muito importantes na imunidade inata. Elas não reconhecem antígenos com “especificidade refinada”, assim como o fazem os linfócitos T e B. Veremos mais sobre estas células ao longo desta disciplina.

O SISTEMA LINFÓIDE

consiste no conjunto dos órgãos linfóides (primários e secundários) e os vasos linfáticos. Para que ocorra o desenvolvimento da imunidade adaptativa em vertebrados superiores, é necessário que haja o encontro entre antígenos e linfócitos no sistema linfóide.

As **CITOCINAS** são umas das responsáveis principais pelas “sopa de letrinhas” que aparece nos textos de Imunologia. Por este aspecto, dá para imaginar o quanto são importantes! Citocinas é o nome genérico que damos a uma classe de proteínas produzidas por vários tipos celulares, inclusive por células que participam da resposta imune inata e adaptativa, e que agem como os principais mediadores da comunicação entre as células do sistema imune. Elas podem ser produzidas constitutivamente (sem a necessidade de haver estimulação) ou sob estimulação antigênica. As citocinas participam de processos fundamentais de constituição e organização do sistema imune, assim como da hematopoiese. Foram, ao longo de sua descoberta, nomeadas de acordo com sua função. Por exemplo, o $\text{TNF-}\alpha$, *Tumor Necrosis Factor alfa*, é a citocina que, dentre outras funções, promove a necrose de tumores.

As células sanguíneas se originam da célula-tronco destinada a se diferenciar em célula-tronco hematopoiética, que dá origem às linhagens específicas precursoras das células do sangue, que são as eritróides (hemáceas); as megacariocíticas (megacariócitos que dão origem às plaquetas); as granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e basófilos); as monocíticas (monócitos, macrófagos e células dendríticas) e as linfocíticas (linfócitos, células dendríticas e células NK).

Para você ter uma idéia melhor, veja a **Figura 3.1**. No decorrer desta aula, vamos falar das principais células envolvidas na resposta imune. A diferenciação e proliferação das células precursoras hematopoiéticas se dão a partir de estímulos (**CITOCINAS** e outros) provenientes de células do estroma da medula óssea. Muitas destas citocinas são chamadas fatores estimuladores de colônias (CSFs, do inglês *colony-stimulating factors*) ou fatores de crescimento, porque elas foram descobertas, originalmente, devido à sua habilidade em estimular colônias de células leucocíticas ou eritróides na medula óssea. As citocinas são essenciais na hematopoiese e também funcionam como os elementos da “sintonia fina” da função da medula óssea em resposta a um estímulo antigênico.

Vamos entender melhor este assunto com um exemplo fictício!

Suponhamos que um indivíduo se infecte com o protozoário “D”. A resposta imune contra o protozoário “D” ativará elementos celulares e moleculares da imunidade inata e da imunidade adaptativa, e muitos *neutrófilos* (sobre os quais falaremos a seguir) serão consumidos. Várias citocinas serão produzidas tanto por células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa. Algumas dessas citocinas estimularão especificamente a proliferação e diferenciação de células progenitoras na medula, comprometidas com a produção de mais neutrófilos.

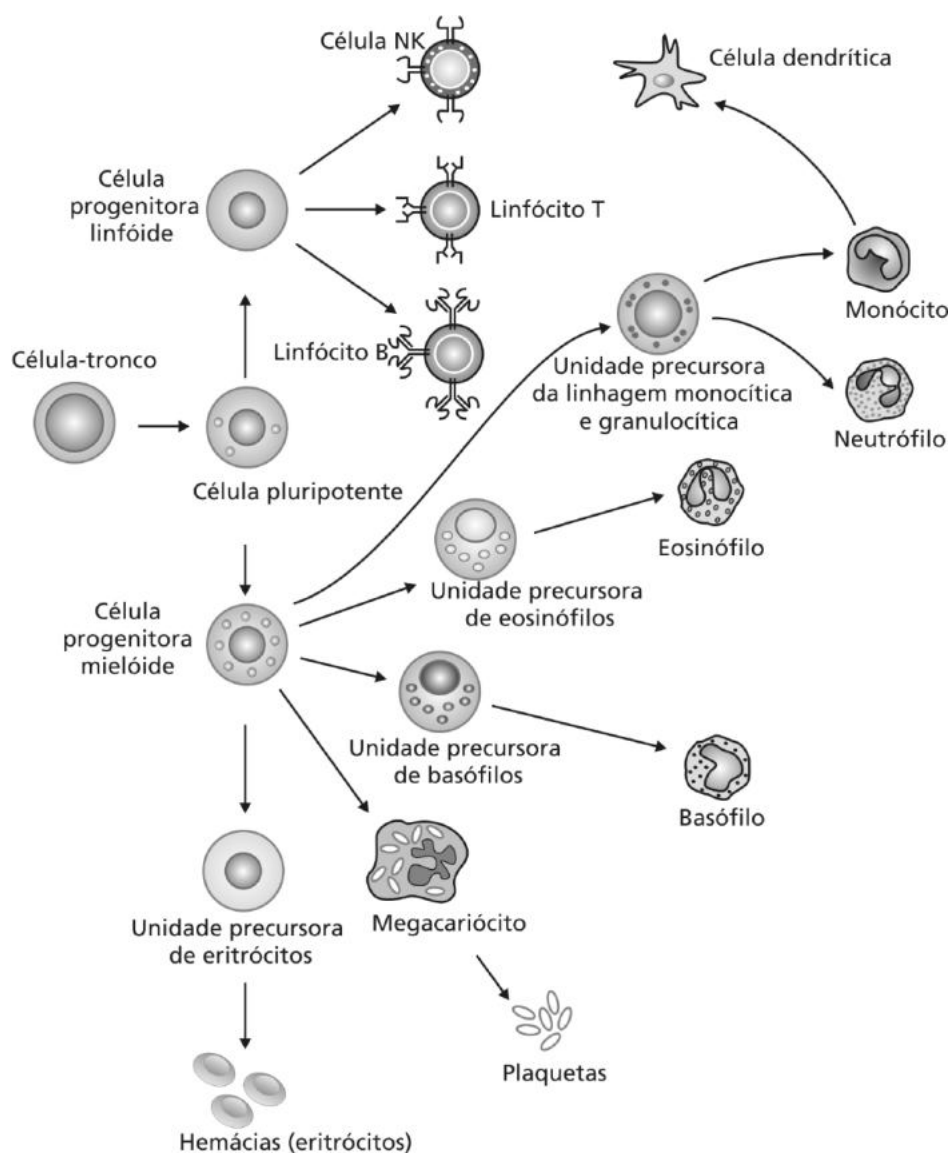


Figura 3.1: Diagrama esquemático da origem e diferenciação das células sanguíneas na medula óssea.

CÉLULAS LINFÓIDES

Os linfócitos T, os linfócitos B e as células NK, juntos, correspondem ao percentual equivalente a 20-40% dos glóbulos brancos do sangue. Na linfa sua proporção é maior, isto é, 99% das células da linfa correspondem aos linfócitos T, B e células NK. Olhe a **Tabela 3.1** para você conhecer o número médio destas células no sangue. Existem aproximadamente 10^{10} – 10^{12} linfócitos no corpo humano, o que equivaleria a uma massa celular correspondente aos neurônios de um cérebro ou aos hepatócitos de um fígado! Estas células são as únicas responsáveis por duas características que definem a imunidade adaptativa: a especificidade refinada e a memória imunológica. Quanto a este último aspecto (memória imunológica), há quem diga que o linfócito T é um “neurônio circulante”! Palavras de um imunologista apaixonado pela *Neuroimunologia*, que é o ramo da Imunologia que estuda a relação entre o Sistema Imune e o Sistema Nervoso.

Tabela 3.1: Número médio de leucócitos no sangue

Glóbulos brancos	Número médio por mililitro	Faixa normal por mililitro
Leucócitos totais	7400	4500 - 11000
Linfócitos	2500	1000 - 4800
Monócitos	300	200 - 800
Neutrófilos	4400	1800 - 7700
Eosinófilos	200	0 - 450
Basófilos	40	0 - 200

MORFOLOGIA DOS LINFÓCITOS

Os linfócitos não-ativados (do inglês linfócitos *naïves*, que significa inocentes) são aqueles que não entraram em contato com antígeno. São chamados pequenos linfócitos pelos morfologistas e têm em torno de 8–10 μm de diâmetro. Essas células têm um núcleo grande, que toma praticamente toda a célula, e uma pequena camada de citoplasma, que contém algumas mitocôndrias, ribossomos, lisossomos. Veja na **Figura 3.2.a** fotomicrografias de linfócitos. Os pequenos linfócitos, ao serem estimulados pelo antígeno, saem da fase de repouso, ou seja, da fase G_0 do ciclo celular e entram na fase G_1 aumentando de tamanho: 10-12 μm de diâmetro. Essas células ativadas apresentam maior volume de citoplasma e, com o aumento de organelas e RNA citoplasmáticos, são chamadas grandes linfócitos ou linfoblastos.

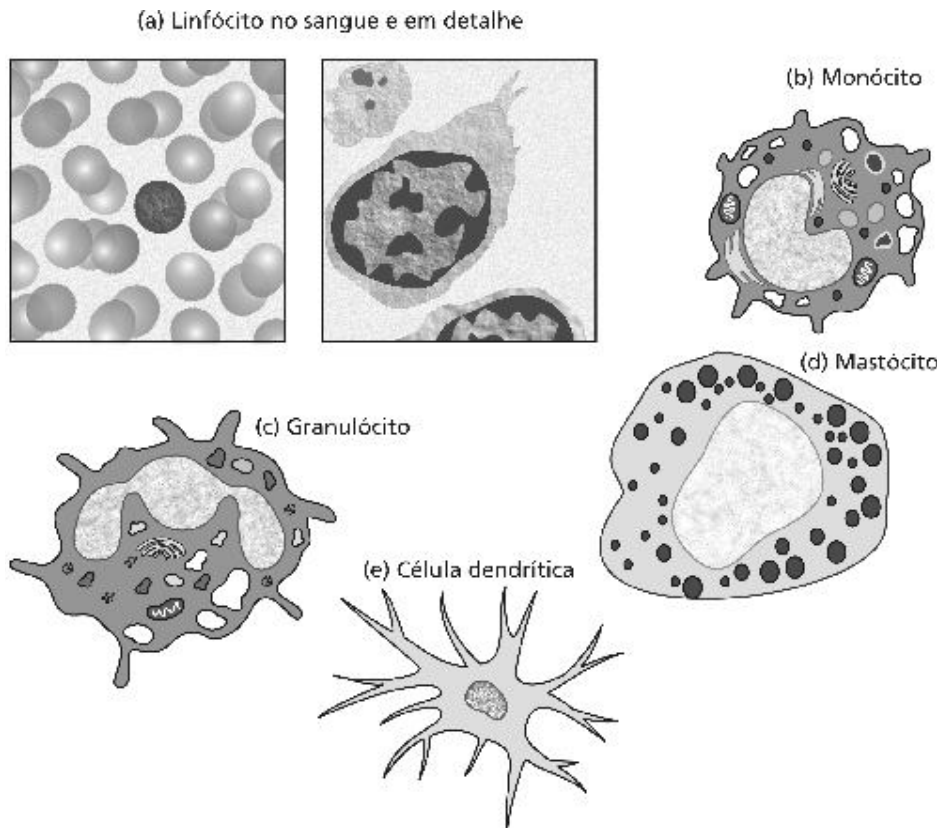


Figura 3.2: Desenho esquemático de células do sistema imune. (a) Linfócitos; (b) monócitos; (c) granulócito; (d) mastócito; (e) célula dendrítica.

CLASSES DE LINFÓCITOS

Até o presente momento, você já ouviu falar em linfócitos B e linfócitos T aos quais também chamamos, vez por outra, células B e células T (para variar, mas que são a mesma coisa). Há pouco foi apresentado aos linfócitos NK (ou células NK), que é o nome mais utilizado para estes últimos. Talvez você ainda não saiba, mas nenhuma destas células podem ser identificadas como tais, ao microscópio! Ou seja, sua morfologia não nos ajuda a distingui-las, e também a sua coloração, mesmo com diferentes corantes, não nos permite diferenciá-las! Este aspecto é peculiar aos linfócitos, pois, ao contrário, podemos distinguir outros leucócitos pela sua morfologia e coloração, conforme veremos ainda nesta aula. Como sabemos, então, que existem diferentes classes de linfócitos? Além disso, dentre os linfócitos T existem várias subpopulações, as quais também não podem ser diferenciadas pela sua morfologia ou coloração! O que nos permite, afinal, distinguir estas células?

Vamos começar esta história de um ponto com o qual você já está de certa forma familiarizado(a). Você já ouviu certamente falar em linfócitos T CD 4, ou simplesmente em níveis de CD 4, quando ouve notícias sobre AIDS! Também comentamos sobre eles na Aula 1 do nosso curso. Muito bem, chegou a hora de entender direitinho esta história de “CD”. Esta sigla vem do inglês *Cluster of differentiation*, que quer dizer grupos de diferenciação, os quais são identificados por anticorpos monoclonais. Você já ouviu falar sobre anticorpos monoclonais, mas vamos falar aqui novamente um pouco sobre eles. Veja o box de atenção a seguir para você lembrar.

Então, voltando aos CDs, eles nos ajudam a distinguir diferentes classes de linfócitos por métodos de laboratório. A sigla **CD** é seguida por números que podem estar associados a alguma letra. Assim, os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (Aulas 5 e 6 do Módulo 1 da disciplina Biologia Celular I) passam a ser os “nossos olhos”, pois nos revelam qual grupo de diferenciação está na superfície daquela célula que estamos tentando identificar.



Anticorpo monoclonal – anticorpos produzidos por um único clone de hibridoma. Por consequência, todos os anticorpos têm a mesma especificidade antigênica. Caso você tenha dúvida sobre este assunto, reveja a Aula 6 de Biologia Celular I, bem como a **Figura 2.5** da Aula 2.

Moléculas de CD

O sistema de nomenclatura por CD foi inicialmente desenvolvido para leucócitos humanos, com o objetivo de padronizar a nomenclatura de diferentes anticorpos monoclonais produzidos por laboratórios diferentes, que reconheciam a mesma estrutura na superfície de leucócitos. Estes anticorpos foram reunidos e denominados grupos de diferenciação, e cada grupo foi designado pela sigla CD seguido de um número como, por exemplo, CD1, CD2, e assim sucessivamente, de acordo com a ordem de descoberta. Estes marcadores, porque são reconhecidos por anticorpos, são denominados antígenos e são utilizados para identificar as diferentes linhagens de leucócitos, bem como as suas diferentes fases de maturação. Embora esta nomenclatura tenha sido originalmente utilizada para identificar antígenos de leucócitos humanos, hoje ela também constitui uma referência para moléculas homólogas em outras espécies animais (antígenos de leucócitos daquelas espécies) e em outras células que não sejam leucócitos. Atualmente, existem cerca de 250 moléculas de CD descritas. Veja a **Tabela 3.2**; não deixe de consultá-la sempre que tiver dúvidas.

Mas os CDs ainda não são tudo, pois não nos revelam a completa identidade de alguns linfócitos! Puxa, alguns linfócitos parecem mesmo ser células que não revelam sua “personalidade” à “primeira vista”! Veja esta história! Na década de 1980, de olho na “personalidade” dos linfócitos T que exibem o CD4, que são chamados linfócitos T *helper* (Th) ou auxiliares (veremos adiante o porquê), os cientistas Robert L. Coffman e Tim Mosmann propuseram a subdivisão em mais duas categorias, as quais foram “batizadas” como Th-1 e Th-2. Em viagem ao Brasil, o cientista Robert Coffman, assim que propôs a subdivisão dos linfócitos T helper em Th-1 e Th-2, disse o seguinte: “Estas células produzem efeitos tão diferentes sobre a resposta imune de um animal, que é como se uma delas tocasse *rock and roll* e a outra tocasse *música clássica*”. Ele disse isso mesmo, é verdade! Eu ouvi!

O que teria permitido a Coffman e Mosmann distinguirem estas subpopulações, se as mesmas exibem o CD4 igualmente em sua superfície, sendo, portanto, ambas classificadas como células T auxiliares (ou helper)? Mais uma vez, os anticorpos monoclonais passam a ser como “olhos” e nos revelam os produtos que estas células secretam e que as fazem, por isso, divididas em subpopulações distintas. Estes produtos não são nada menos que um conjunto de citocinas que permite a distinção entre Th-1 e Th-2. Portanto, os anticorpos monoclonais reconhecem cada uma das citocinas que formam cada conjunto, para distinguir Th-1 e Th-2. Por meio de testes de laboratório, podemos verificar isto. No conjunto de citocinas produzido por Th-1, temos o Interferon Gama ($\text{IFN-}\gamma$), o $\text{TNF-}\alpha$ e outras; no conjunto de citocinas produzidas por Th-2, temos a Interleucina-10 (IL-10), a Interleucina 4 (IL-4) e outras. Isto faz a diferença entre ambas as populações de células T helper. Por isso, foram descritas por Coffman como células que “tocam” estilos de música completamente diferentes.

O nome helper foi dado à classe de linfócitos T que exibem o CD4 pela sua capacidade de auxiliarem outras células a exercerem suas funções, como a produção de anticorpos por células B ou a capacitação para a função microbicida (isto é, para matar micróbios) por fagócitos (macrófagos). Daí a justificativa do nome *helper*, que significa auxiliadoras. Apenas na presença de células T CD4, alguns linfócitos B vão produzir anticorpos. Em outras situações experimentais, os linfócitos T CD4 são imprescindíveis para que os fagócitos (macrófagos) possam

exercer sua função microbicida. Foi aí que Coffman e Mosmann “mataram a charada” para a existência de linfócitos Th-1 e Th-2. Eles observaram que o tipo de linfócito T CD4 que auxilia o linfócito B a produzir anticorpos não é do mesmo tipo de linfócito T CD4 que leva o macrófago a se capacitar para exercer suas funções microbicidas. O que revelou esta diferença aos cientistas foi o conjunto de citocinas produzido por cada tipo de linfócito T CD4, que são completamente diferentes entre si!

Se você pensa que esta história de classificar linfócitos T se resume apenas aos CDs e às citocinas, você está enganado(a)! Está mais enganado(a) ainda, se pensou que íamos dizer novamente que os monoclonais são como olhos que sempre nos revelam coisas! Nossos caríssimos anticorpos monoclonais nos desvendam muita coisa, mas não foram eles, desta vez, que nos revelaram mais uma subpopulação de linfócitos T, sobre a qual contaremos mais uma história.

Vale uma paradinha aqui para um comentário: os anticorpos monoclonais são ferramentas preciosas para os imunologistas e, por isso, foram ditos “nossos caríssimos”; de fato, eles são *literalmente* caros, porque custam uma fortuna aos cientistas que trabalham com eles!



Esta nova história diz respeito à descoberta de mais um tipo de receptor antigênico da célula T (TCR), que você viu na Aula 2 (veja a **Figura 2.1** daquela aula). O TCR é um heterodímero composto por duas cadeias polipeptídicas. Até meados dos anos 80, era conhecido apenas o heterodímero alfa-beta (TCR $\alpha\beta$), cujos genes já haviam sido clonados também já existiam anticorpos monoclonais que reconheciam aquele heterodímero. Naquela época, diferentes grupos de cientistas, estudando os genes que codificam para o TCR, descobriram dois genes que provavelmente codificavam para mais duas cadeias ainda não descritas, que seriam as cadeias gama e delta ($\gamma\delta$). Estas comporiam um novo tipo de TCR, ainda não descrito até então. O primeiro trabalho que sugeriu esta possibilidade foi publicado em julho de 1986 na revista *Nature*. As pesquisas se intensificaram na busca de um possível recém-descoberto tipo de TCR e, ao final de 1987, seis trabalhos ao todo haviam sido publicados na mesma revista (a *Nature* é um dos veículos de divulgação científica mais importantes em todo o mundo) sobre este assunto. Estava então definitivamente comprovada a existência de um outro tipo de TCR, diferente do já conhecido, composto pelo heterodímero alfa-beta. O heterodímero que compunha o recém- descoberto TCR foi chamado gama-delta, isto é, manteve o mesmo nome dos genes que os codificam. Assim, em dezembro de 1987 “nascia” (para o nosso conhecimento, é claro) mais uma subpopulação de linfócitos T, isto é, os linfócitos $T\gamma\delta$. Viu só? Neste caso, foram ferramentas da Biologia Molecular que nos possibilitaram descobrir esta subpopulação de linfócitos T. Se você quiser saber mais sobre esta história, leia a revisão publicada em 1995 por Weintraub e Hedrick. Veja na lista de referências desta aula.

Vamos olhar a **Tabela 3.2**. Ela nos mostra as subpopulações de linfócitos que podem ser identificadas através de seu fenótipo, ou seja, através de moléculas que eles expressam na sua superfície, as quais são reveladas por anticorpos monoclonais, específicos contra estas moléculas. Chamamos estas moléculas marcadores fenotípicos. Estes marcadores fenotípicos podem ser um determinado CD ou algum outro tipo de molécula como o TCR, por exemplo, conforme vimos na história

dos heterodímeros alfa, beta, gama e delta. Observe que utilizamos os sinais + e – para designar, respectivamente, presença e ausência de um determinado marcador. Observe ainda que todos os linfócitos T, independentemente à qual subpopulação pertençam, expressam o CD3, que é o marcador exclusivo dos linfócitos T. O CD3 não é expresso pelos linfócitos B nem pelas células NK. Olhe bem para a **Tabela 3.2**. Onde estão os linfócitos Th-1 e Th-2? Eles não estão lá! Por quê? Simplesmente porque essas duas subpopulações de linfócitos T *helper* são reconhecidas pelas suas características funcionais (pelas citocinas que secretam), e não pelas características fenotípicas – marcação fenotípica. Assim, podemos dizer apenas que são células T *helper*, pois expressam o CD3, o CD4 e não expressam o CD8. Para saber se são Th-1 ou Th-2, teríamos que investigar quais as citocinas que elas secretam.

Tabela 3.2: Classe e função dos linfócitos

Classe	Função	Marcador fenotípico
Linfócitos T $\gamma\delta$	Provável reconhecimento de antígenos presentes em mucosas e epitélios que fazem barreira com o meio externo.	CD3 ⁺ , TCR do tipo $\gamma\delta$
Linfócitos T <i>helper</i>	Estimula a proliferação e diferenciação de células B (imunidade humoral). Ativam macrófagos, pelas citocinas secretadas, a aumentarem sua atividade microbicida (imunidade mediada por células).	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁻
Linfócito T citolítico	Elimina células infectadas por vírus, células tumorais; participa da rejeição de transplantes (imunidade mediada por células).	CD3 ⁺ , CD4 ⁻ e CD8 ⁺
Linfócitos B	Produção de anticorpos (imunidade humoral).	CD19, CD21, receptor de Fc ^a
Células NK	Elimina células infectadas com vírus, células tumorais e têm citotoxicidade celular dependente de anticorpo ^b .	CD3 ⁻ , CD2 ⁺ , CD16 ⁺

a Os linfócitos B têm um receptor específico para imunoglobulina na sua superfície, chamado receptor de Fc, sobre o qual falaremos na Aula 15.

b Tipo de morte celular induzida por células NK que são mediadas por anticorpos, que veremos em aula futura.

ATIVIDADE



1. Sabemos que os linfócitos são divididos em duas populações, linfócitos B e T, que apresentam os marcadores CD19 e CD3, respectivamente. Com base no que você já aprendeu, proponha um método imunológico capaz de identificar os linfócitos B e T de um preparado que contenha uma mistura de linfócitos. Se você tiver dificuldades, reveja a Aula 6 e o exemplo 3 do item Preparando a amostra da Aula 5 do Módulo 1 do curso de Biologia Celular I.

RESPOSTA COMENTADA

Esta atividade permite algumas respostas; assim, esperamos que você tenha respondido algo similar ao que vamos comentar. Caso isso não tenha acontecido, e você tiver alguma dúvida, não deixe de procurar o seu tutor no pólo.

*Uma possibilidade é a utilização de anticorpos monoclonais antiCD19 e antiCD3 marcados com rodamina (vermelho) e fluoresceína (verde), respectivamente. Após a incubação dos anticorpos com a mistura de linfócitos e o preparo adequado do material, as amostras podem ser visualizadas ao microscópio óptico de fluorescência, onde você vai visualizar células emitindo fluorescência vermelha (linfócitos B) ou fluorescência verde (linfócitos T). Uma outra possibilidade é a utilização do FACS (da sigla, em inglês, Fluorescent activated cell sorting), também conhecido como citômetro de fluxo, aparelho capaz de separar e quantificar células de acordo com os marcadores fluorescentes ligados à superfície celular. As amostras são preparadas de forma similar com os dois anticorpos, porém são mantidas em meio líquido adequado. Conforme você viu na Aula 5 do curso de Biologia Celular I, este aparelho pode ser utilizado para separar as células marcadas. Entretanto, um outro recurso que este aparelho oferece é a quantificação de células marcadas com um ou mais anticorpos acoplados a fluorocromos diferentes. As células, ao passarem pela câmara onde incide o laser, irão emitir ou não fluorescência vermelha ou verde, que serão capturadas pelo fotodetector. O aparelho irá converter este sinal luminoso em dados numéricos e apresentá-los na forma de gráficos. Veja na **Figura 3.3** um esquema simplificado deste processo. Na verdade, você pode propor qualquer método imunológico que permita a visualização da ligação dos anticorpos aos seus respectivos alvos, as moléculas CD19 e CD3 na superfície das células B e T. Entretanto, a citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos é a técnica mais usada para analisar e quantificar populações celulares; é amplamente utilizada, tanto na pesquisa básica como na clínica, como, por exemplo, na classificação de tipos de leucemia, no acompanhamento clínico de indivíduos portadores de HIV etc. Nestes últimos, avalia-se a quantidade de células que expressam a molécula CD4 (principalmente os linfócitos T, embora os monócitos circulantes também expressem o CD4). A razão entre os percentuais de células T CD4 e os percentuais de células T CD8, isto é, o resultado da razão CD4/CD8 em indivíduos normais, deve ser acima de 1. Quando o resultado da razão CD4/CD8 é menor que 1 (ao que chamamos inversão CD4/CD8), deve-se investigar o porquê, pois pode ser que o paciente esteja com algum tipo de imunodeficiência.*

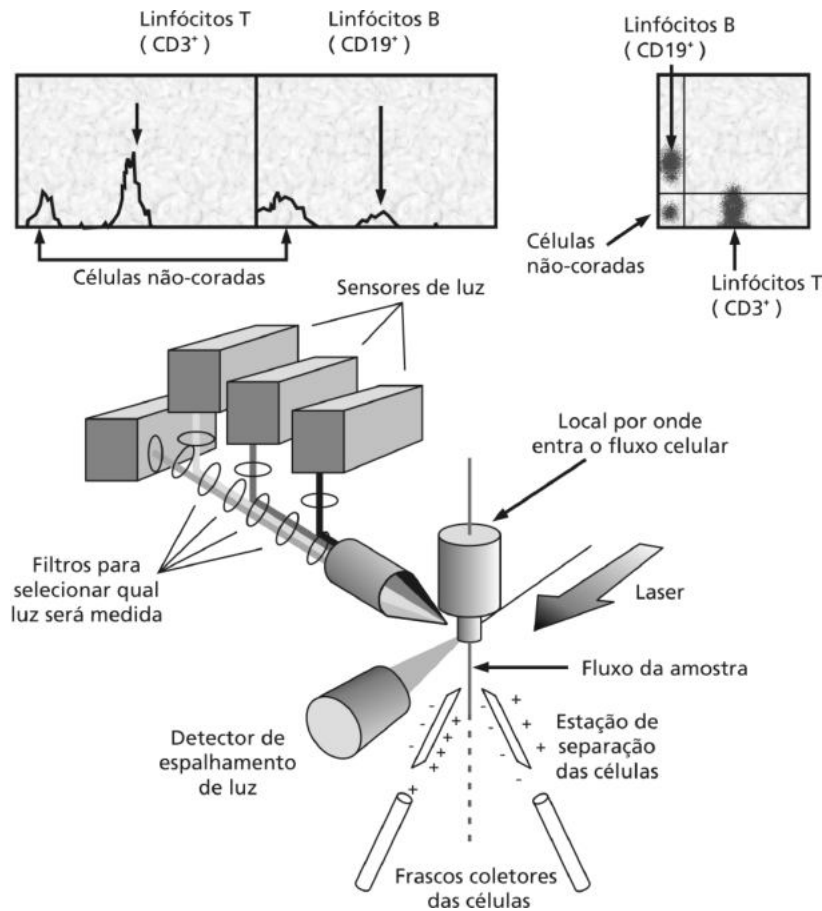


Figura 3.3: Figura esquemática de um citômetro de fluxo.

Monócitos e macrófagos

Os *pró-monócitos* (células precursoras de monócitos e macrófagos) deixam a medula óssea logo após a hematopoiese e ganham o sangue, onde se diferenciam em monócitos. Nos tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos. Chamamos *sistema mononuclear fagocítico* o conjunto de monócitos no sangue e macrófagos nos diferentes tecidos do corpo. Os macrófagos assumem nos tecidos modificação anatômica e fisiológica, tornando-se até dez vezes maiores que o seu tamanho no sangue, conforme pode ser visto na **Figura 3.2.b**. Nos tecidos, eles aumentam sua capacidade fagocítica em comparação com os monócitos do sangue, pois são ativados por uma série de situações a que são expostos, como a presença de antígenos bacterianos e a ativação ocasionada por citocinas.

Granulócitos

Os granulócitos compreendem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Podem ser distinguidos pelas diferentes propriedades de se corarem com corantes ácidos e/ou básicos. Assim, os neutrófilos (também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares) apresentam núcleo multilobulado e seu citoplasma se cora tanto por corantes ácidos quanto por corantes básicos. Já os eosinófilos apresentam núcleo bilobular e seu citoplasma se cora com o corante ácido (eosina), daí o nome destas células. Os basófilos, que apresentam núcleo também lobular, têm seu citoplasma corado por corantes básicos. Tanto os neutrófilos (que representam 57 – 70% das células brancas) quanto os eosinófilos (que respondem por apenas 1 – 3% dos leucócitos) são fagócitos. Os basófilos representam um percentual muito baixo dos leucócitos circulantes (< de 1%). Veja a **Figura 3.2.c**; ela mostra o desenho esquemático destas células.

Os mastócitos

Os mastócitos deixam a medula após a hematopoiese e ganham o sangue, de onde alcançam os tecidos e só aí se diferenciam. Estas células podem ser observadas em muitos tipos de tecido – a pele é um deles. A **Figura 3.2.d** traz um desenho esquemático de um mastócito. Nos tecidos, eles liberam substâncias que estão pré-formadas no interior de seus grânulos. Estas substâncias participam como mediadores da inflamação e das alergias, conforme veremos em aulas futuras.

As células dendríticas

Estas células assim são chamadas porque suas prolongações citoplasmáticas, anatomicamente, lembram os dendritos de células nervosas. Elas têm papel crítico no desenvolvimento da imunidade adquirida, conforme veremos ao longo do nosso curso. Admite-se que todas as células dendríticas surjam a partir de um precursor mielóide na medula óssea. As células dendríticas capturam antígenos dos tecidos e os levam até o *linfonodo* (órgão linfóide) mais próximo do tecido onde estavam localizadas. Voltaremos a falar sobre estas células quando estivermos estudando a apresentação de antígenos e a cooperação de linfócitos, em uma outra aula. Veja a **Figura 3.2.e**.

As células foliculares dendríticas

As células foliculares dendríticas não têm relação com as células dendríticas de origem mielóide, que acabamos de descrever. As células foliculares dendríticas apresentam projeções de membrana e situam-se nos centros germinais de folículos linfóides nos linfonodos, baço e tecido linfóide associado à mucosa, conforme você verá a seguir.

ÓRGÃOS LINFÓIDES: ANATOMIA E FUNÇÃO

Agora que você já conhece as várias células do sangue que compõem o sistema imunológico, vamos ver como estas células estão organizadas para desempenhar as suas funções. Para otimizar as interações celulares que resultem em uma resposta imune efetiva, as células do sistema imune estão organizadas em tecidos e órgãos anatomicamente e funcionalmente bem definidos. Os órgãos linfóides são classificados, quanto à sua função, em órgãos linfóides primários e secundários.

Os órgãos linfóides primários ou centrais, que compreendem o timo, a medula óssea e a bolsa de Fabricius das aves são responsáveis pela geração e maturação das células do sistema imune, as quais, por sua vez, vão povoar os órgãos linfóides secundários, que correspondem ao baço, aos linfonodos, aos tecidos linfóides associados às mucosas do trato digestivo, do trato respiratório e agregados de linfócitos que são encontrados em todos os órgãos, exceto no sistema nervoso central. Veja, na **Figura 3.4**, a localização anatômica dos principais órgãos linfóides do corpo humano. Os antígenos que penetram no organismo animal são fagocitados pelas células dendríticas ou pelos macrófagos, ou mesmo os antígenos livres (não fagocitados), são todos carregados pelos vasos linfáticos até os órgãos linfóides secundários, onde ocorre a ativação dos linfócitos, ou seja, a imunidade adaptativa.

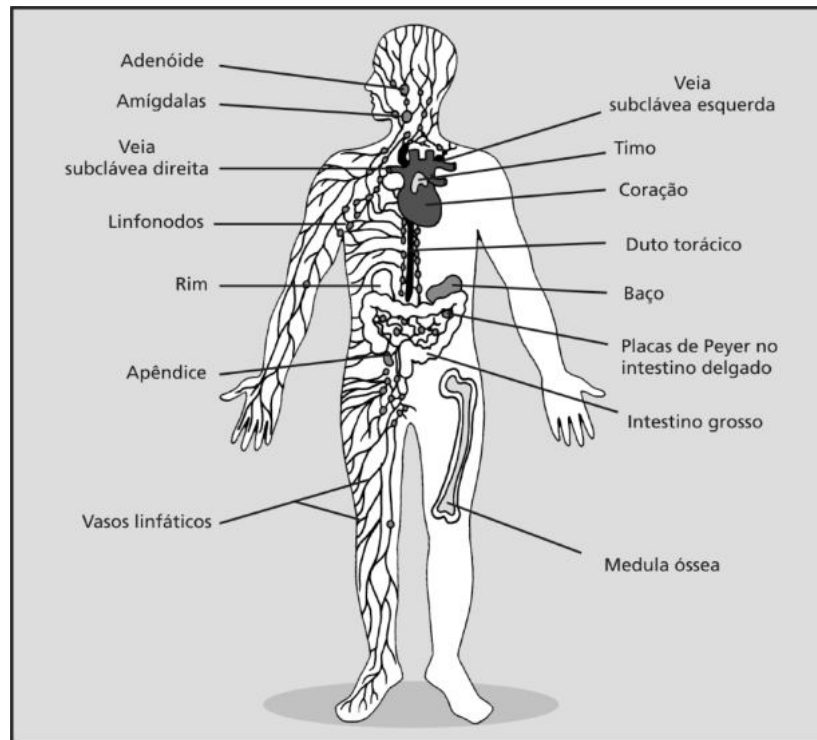


Figura 3.4: Figura esquemática mostrando a localização anatômica dos principais órgãos linfóides do corpo humano. Observe a localização do timo, baço, a distribuição dos linfonodos, vasos linfáticos e placas de Peyer.

Órgãos linfóides primários

Medula óssea

No adulto, a medula óssea é o local de geração de todas as células circulantes no sangue, incluindo as células do sistema imune. Ela é constituída por células reticulares e fibras reticulares que, juntas, dão o aspecto esponjoso da medula óssea, onde estão ancorados os macrófagos e diversas células em desenvolvimento. Das células em desenvolvimento na medula óssea, 30% correspondem a linfócitos. Os linfócitos T são originados na medula óssea e migram para o timo, onde sofrem o processo de maturação. Em humanos e camundongos, a produção e maturação de linfócitos B acontecem na medula óssea, enquanto nas aves os linfócitos B são produzidos na medula óssea e migram para a Bursa de Fabrício para sofrerem maturação.

Timo

O timo é o órgão onde se processa a maturação de linfócitos T que, então, se distribuem para os outros órgãos (secundários). O timo cresce até a puberdade, quando começa um processo de involução gradativa, de forma que, num indivíduo idoso, observa-se somente vestígio do timo. Veja a sua localização na **Figura 3.4** e a sua forma com dois lobos. Agora, na **Figura 3.5**, observe que o timo é revestido por uma cápsula fibrosa que emite projeções no parênquima tímico, estas projeções, denominadas trabéculas, dividem cada lobo em vários lóbulos. Entretanto, esta divisão não é completa, de modo que os lóbulos tímicos são contínuos. Em cada lóbulo pode-se verificar uma área cortical (periférica) e uma medular (central). Na área cortical do timo observa-se uma densa coleção de linfócitos T imaturos (timócitos), mostrada na área mais escura indicada na **Figura 3.5**, em contraste com a área medular em que se encontra uma concentração menor de linfócitos, área mais clara. As células reticulares epiteliais, células de sustentação do timo, estão dispersas pelo órgão; juntamente com macrófagos e células dendríticas, elas participam do processo de maturação dos timócitos. A maturação das células T ocorre no sentido da região cortical para a medular, sendo que neste processo mais de 90% dos linfócitos T sofrem morte celular por **APOPTOSE**.

Você deve estar se perguntando: Mas para que este desperdício tão grande de energia? Bem, isto tem uma justificativa: os linfócitos T precisam ser “selecionados” no timo antes de “saírem” maduros para a circulação sanguínea. Neste processo de “seleção”, muitos não passam no teste e morrem por apoptose! São “deixados morrer”, na verdade. Veremos esta história em detalhes na Aula 12, mas só para não deixá-lo muito curioso(a), vamos falar superficialmente sobre este assunto. Para poder circular no sangue, os linfócitos T devem ser “testados” (no timo) quanto ao seu risco de reconhecerem estruturas do nosso próprio organismo. Isto acontece porque os TCRs (receptores antigênicos das células T) são originados pelo mesmo processo de recombinação somática que origina os anticorpos, como vimos na Aula 2 (**Figura 2.5**). Mas os TCRs não reconhecem antígenos da mesma maneira que os anticorpos. Os TCRs, para reconhecerem antígenos, dependem de uma outra classe de moléculas (chamadas antígenos principais de histocompatibilidade), sobre as quais falaremos na Aula 11. Mas vamos parar por aqui, até porque, senão, não teremos assunto para a Aula 11.

APOPTOSE

Processo de morte celular caracterizado pela clivagem do DNA, condensação e fragmentação nuclear e formação de bolhas na membrana que induz a fagocitose da célula sem provocar resposta inflamatória, ao contrário da morte por necrose, que induz uma reação inflamatória devido à liberação de conteúdo tóxico da célula e conseqüentes danos às células vizinhas.

As doenças auto-imunes são ocasionadas pela presença de clones de linfócitos T e/ou B que reconhecem auto-antígenos; veja alguns exemplos: diabetes tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite de Hashimoto etc. Esta foi a maneira que a evolução encontrou para garantir a geração de diversidade com economia de genes (recombinação somática) e, ao mesmo tempo, garantir a preservação do próprio. Isto não é fantástico?!

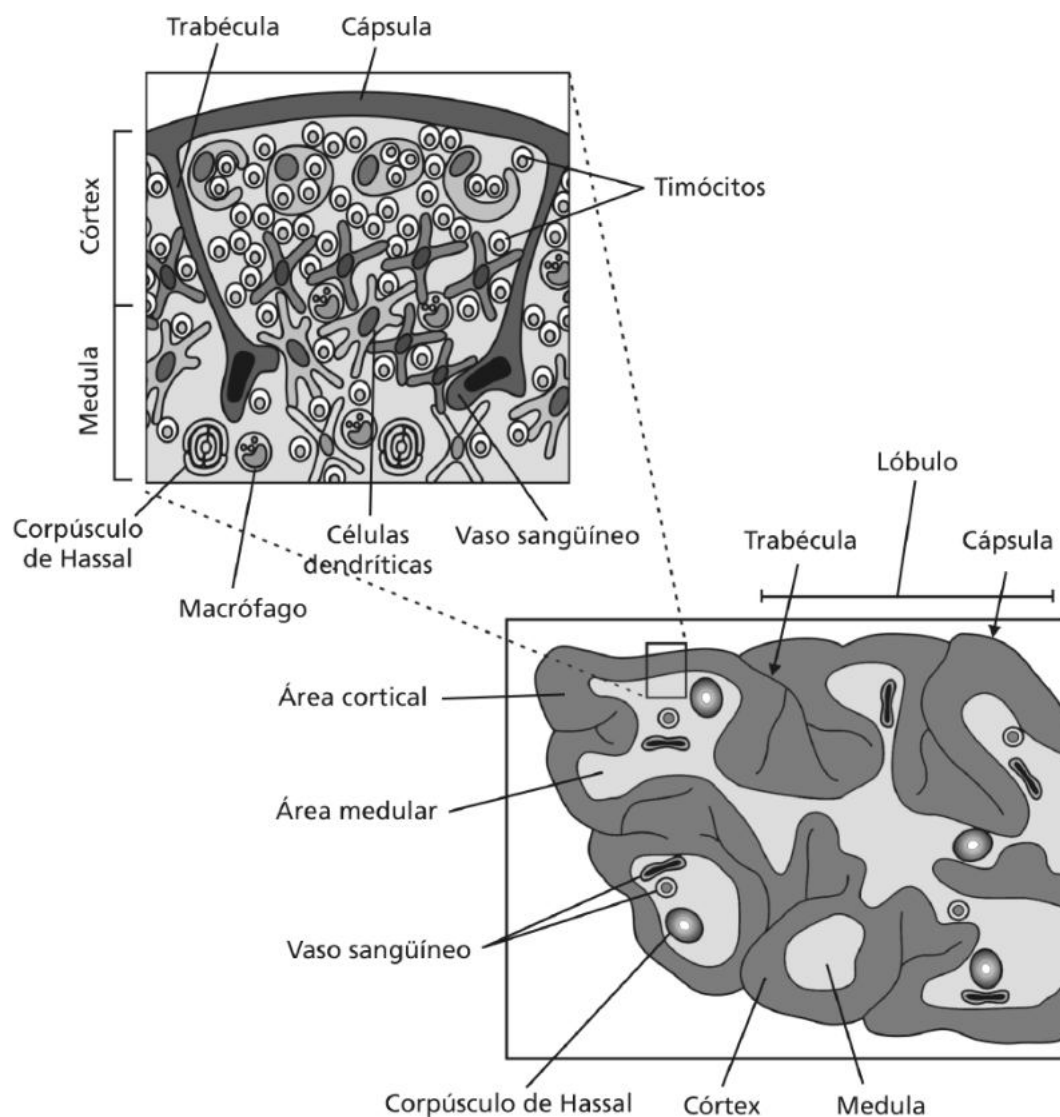


Figura 3.5: Diagrama ilustrando as estruturas do timo. Observe as áreas corticais e medulares que se coram com maior e menor intensidade, respectivamente as trabéculas, que dividem parcialmente o órgão e lóbulos e o Corpúsculo de Hassal.

Na região medular do timo podem ser observadas estruturas denominadas Corpúsculo de Hassal, que são células reticulares epiteliais queratinizadas dispostas concentricamente e sem função conhecida.

A vascularização do timo, chamada barreira sangue-timo, apresenta algumas características especiais. Esta barreira impede a entrada de moléculas protéicas ou de partículas no córtex do órgão, extremamente importantes no processo de seleção do repertório de células T, conforme veremos na aula de ontogenia de células T. Os linfócitos imaturos possivelmente entram no timo pelos capilares ramificados da região cortical e os maduros deixam o órgão pelos vasos linfáticos eferentes e pelas vênulas da região medular.



ATIVIDADE

2. Com relação aos órgãos linfóides primários, assinale a alternativa correta.

- a.() A resposta imune se processa nos órgãos linfóides primários.
- b.() O timo é o órgão onde se processa a maturação de linfócitos B.
- c.() Os órgãos linfóides primários são responsáveis pela geração e maturação das células do sistema imune.
- d.() A bolsa de Fabricius é onde se processa a maturação de linfócitos T nas aves.

RESPOSTA COMENTADA

A resposta correta é a alternativa c. Se você acertou, parabéns! Se você errou, vamos ver por quê? A alternativa a está errada porque a resposta imune se processa nos órgãos linfóides secundários; a alternativa b não está correta porque quem sofre maturação no timo são os linfócitos T; na alternativa d o erro está no fato de que quem matura na bolsa de Fabricius das aves são os linfócitos B. Entendemos que, neste início, é difícil não confundir linfócitos T com B e as suas respectivas funções. Procure não confundi-los; entretanto, vamos falar tanto nessas duas células no decorrer desta disciplina que você não terá dificuldades de entendê-los.

Órgãos linfóides secundários

Sistema linfático e linfonodos

Os linfonodos, também conhecidos como gânglios linfáticos ou nódulos linfáticos, têm aspecto riniforme e estão localizados ao longo dos vasos linfáticos. Veja na **Figura 3.4** a localização dos principais linfonodos e vasos linfáticos do corpo humano. Observe que os gânglios linfáticos estão localizados em pontos estratégicos, para onde convergem os vasos linfáticos que drenam a linfa originada de determinadas regiões do corpo humano. A linfa, fluido originado dos espaços intersticiais, serve de veículo para transporte de macromoléculas e células, principalmente as células dendríticas e linfócitos dos tecidos, para os linfonodos. O fluxo da linfa parte sempre dos tecidos em direção aos gânglios linfáticos e, destes, para outros linfonodos, interligados por vasos linfáticos progressivamente de maior calibre, formando uma rede de vasos e linfonodos que convergem para o ducto torácico que, por sua vez, desemboca na veia subclávea esquerda, próxima do coração. Vamos ver um exemplo prático, para ficar bem clara a importância do **SISTEMA LINFÁTICO**?

SISTEMA LINFÁTICO

Rede de vasos dispersos pelo corpo, que drenam a linfa, um tecido fluido derivado dos espaços intercelulares. Os vasos linfáticos periféricos convergem para vasos centrais de maior calibre até chegarem aos ductos torácicos, por onde desembocam no sangue. É importante ressaltar que os linfonodos estão distribuídos ao longo dos vasos linfáticos, cuja função é filtrar a linfa drenada dos tecidos.

Você certamente já teve ou já ouviu alguém reclamar que está com íngua, não é verdade? Aquele caroço dolorido, geralmente localizado na região axilar, inguinal ou cervical. A íngua, como é popularmente conhecida, é o resultado da hipertrofia de um ou mais gânglios linfáticos que acontecem em decorrência de uma infecção, em geral a partir de uma lesão preexistente que foi contaminada. Esse microrganismo foi fagocitado pelas células dendríticas e carreado pela linfa através dos vasos linfáticos até o nódulo linfático que drena a região. Assim, ao desencadear uma resposta imune, com a proliferação de linfócitos, o linfonodo aumenta de volume e causa dor.

Lembra-se da Atividade 2 da Aula 2? O seu amigo reclamou de íngua na virilha, do mesmo lado em que cortou o pé. Agora, o motivo da dor na virilha (íngua) já pode ser compreendido, ou seja, a dor foi ocasionada pelo aumento de volume do linfonodo na região da virilha (região inguinal). Daí a origem da palavra íngua, que tem como sinônimo popular *bubão*. Os linfonodos de seu amigo aumentaram de tamanho porque alguns linfócitos migraram para lá e estão proliferando, isto é, estão sofrendo expansão clonal, conforme você viu na Aula 2. A expansão clonal, via de regra, só acontece em órgãos linfóides primários

ou secundários. Nos próximos parágrafos você entenderá melhor por que os linfócitos do seu amigo migraram para o linfonodo e por que o linfonodo aumentou de tamanho.

Com este exemplo, podemos ver claramente a importância do sistema linfático no desencadeamento da resposta imune específica, ou seja, ele é responsável pela condução dos antígenos capturados pelas células dendríticas (ou na forma livre) para os linfonodos, onde será iniciada a resposta imune adaptativa.

Os linfonodos, ou gânglios linfáticos, são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo por onde atravessam os vasos linfáticos e sangüíneos. A linfa chega aos linfonodos através dos vasos aferentes, pelo lado convexo do órgão, caindo no espaço abaixo da cápsula (seio subcapsular). A linfa, então, atravessa o estroma e as células do linfonodo, emergindo pelos vasos linfáticos eferentes localizados na face côncava ou no hilo do linfonodo, conforme pode ser visto na **Figura 3.6**. O arcabouço ou estroma é formado de fibras reticulares de origem conjuntiva; a polpa é dividida em três regiões: cortical, paracortical e medular. Nestas regiões, predominam linfócitos B, T e **PLASMÓCITOS**, respectivamente.

PLASMÓCITO

Célula B diferenciada e terminal, capaz de sintetizar e secretar uma grande quantidade de anticorpos. Reveja a **Figura 2.5** da Aula 2.

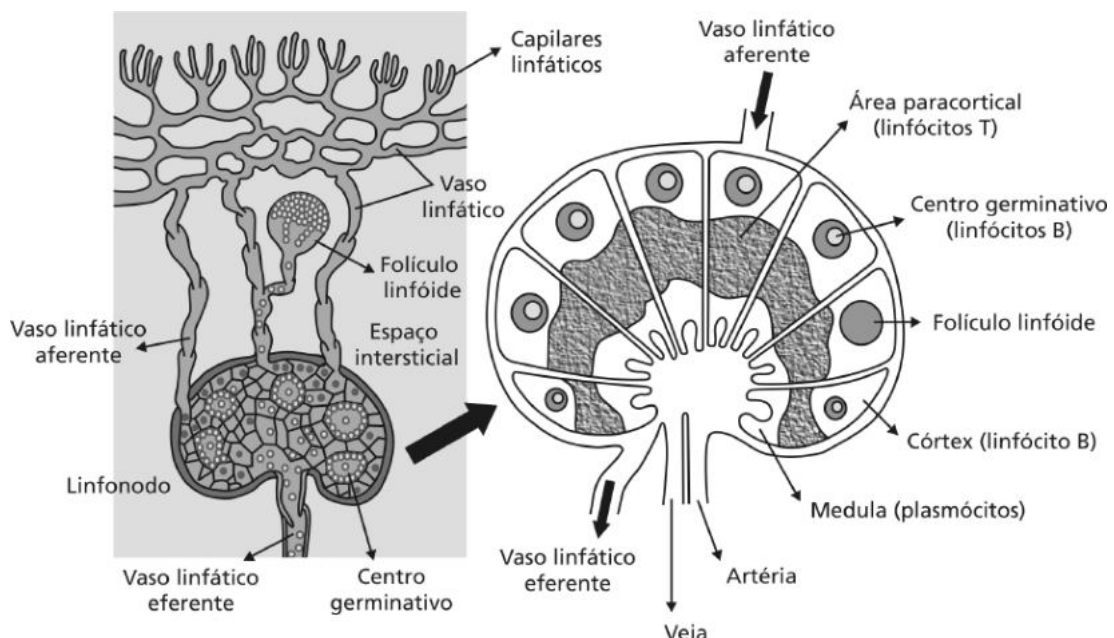


Figura 3.6: Componentes estruturais de um linfonodo. Observe a disposição dos vasos linfáticos eferente e aferente, as regiões em que predominam os linfócitos T (paracortical) e B (cortical), centro germinativo.

Como podemos ver na **Figura 3.6**, na região abaixo da cápsula (cortical) predominam os linfócitos B, que se encontram densamente agrupados em estruturas aproximadamente esféricas denominadas folículos linfóides. No interior destes folículos, encontram-se também macrófagos e as células foliculares dendríticas, que têm a capacidade de reter antígenos por longos períodos de tempo; não os confunda com células dendríticas! Chamamos sua atenção para o fato de haver células com nomes semelhantes, mas com origem e função diferentes! Quando os linfócitos são ativados, aumentam de tamanho e proliferam, formando os centros germinativos que correspondem à área mais clara no interior dos folículos. As células B ativadas nos centros germinativos migram para a região medular e se organizam em forma de cordões. Na região paracortical, estão os linfócitos T entremeados de células dendríticas e macrófagos.

Como já vimos, os linfonodos são os órgãos para onde é drenada a maior parte dos antígenos que entram no organismo pelas superfícies mucosas e pelas superfícies externas. Assim, para que haja maior possibilidade de encontro entre os linfócitos e os antígenos, é extremamente importante que os linfócitos circulem por todo o organismo. A otimização da circulação linfocitária pelos inúmeros linfonodos ocorre pela existência de capilares especializados que facilitam a passagem dos linfócitos da circulação para o interior dos linfonodos. Estes capilares são denominados vênulas de endotélio alto (HEV, do inglês, *high endothelium venule*). Os linfócitos recém-emigrados podem ficar retidos nos linfonodos, saírem pelo vaso linfático aferente ou reentrar nos capilares venosos. Dessa forma, os linfócitos entram novamente na circulação sanguínea, indo passar por outros órgãos linfóides secundários.

Os linfócitos apresentam um ritmo de recirculação impressionante, movendo-se continuamente entre o sangue a linfa e entre os vários órgãos linfóides. No breve espaço de tempo de 30 minutos, cerca de 45% de todos os linfócitos são carregados do sangue para o baço onde permanecem por cerca de cinco horas. Cerca de 42% dos linfócitos do sangue saem deste para os vários órgãos linfóides onde ficam por cerca de 12 horas. O intenso ritmo de recirculação de linfócitos compensa o pequeno percentual de linfócitos comprometidos com um dado antígeno. Vamos ilustrar este fato com números. Cerca de apenas 1 em

cada 100.000 linfócitos reconhece um dado antígeno. Assim, mesmo havendo aparentemente uma pequena chance de tal linfócito encontrar o antígeno que reconhecerá, o intenso ritmo de recirculação destas células aumenta grandemente as chances de seu encontro com tal antígeno.

Baço

O baço se localiza na região abdominal esquerda superior. Veja na **Figura 3.4**. Este órgão participa da eliminação de células sangüíneas lesadas ou senescentes (envelhecidas), principalmente hemácias e plaquetas. Além desta função, o baço também é importante no controle de infecções sistêmicas nas quais os antígenos estão presentes por meio da circulação sangüínea. Antígenos que alcançam a circulação sangüínea são capturados pelo baço, onde se desenvolve uma vigorosa resposta imunológica. Da mesma maneira que o linfonodo filtra a linfa, o baço filtra o sangue. O baço não é essencial à sobrevivência do indivíduo, mas aqueles que foram esplenectomizados (retirada cirúrgica do baço) tornam-se menos resistentes a infecções bacterianas sistêmicas e podem vir a falecer em decorrência delas.

Na região do hilo esplênico, encontram-se a veia e a artéria esplênica. A cápsula do órgão é formada por tecido conjuntivo fibroso, que emite projeções para o interior do parênquima esplênico (trabéculas), formando compartimentos contendo polpa vermelha e polpa branca, conforme podemos ver na **Figura 3.7**. A polpa vermelha consiste em redes de capilares sinusóides, macrófagos e, principalmente, hemácias; esta é a região onde os eritrócitos velhos ou defeituosos são retirados da circulação e destruídos. Na polpa branca, encontra-se o tecido linfóide formando nódulos ou envolvendo as arteríolas como se fossem bainhas, ambos contendo uma grande quantidade de linfócitos densamente agregados. Os nódulos linfóides correspondem aos folículos linfóides e são áreas ricas em linfócitos B, enquanto a bainha linfocitária que envolve as arteríolas, denominada bainha perioarteriolar, são regiões ricas em linfócitos T; perifericamente à bainha periarteriolar, a zona marginal é uma região que contém linfócitos e macrófagos. Da mesma forma que nos linfonodos, os linfócitos também recirculam pelo baço. Entretanto, devido à parede descontínua dos sinusóides esplênicos, não

há no baço a necessidade de estruturas seletivas, como as vênulas do endotélio alto dos linfonodos, para promover a entrada ou a saída de linfócitos do órgão.

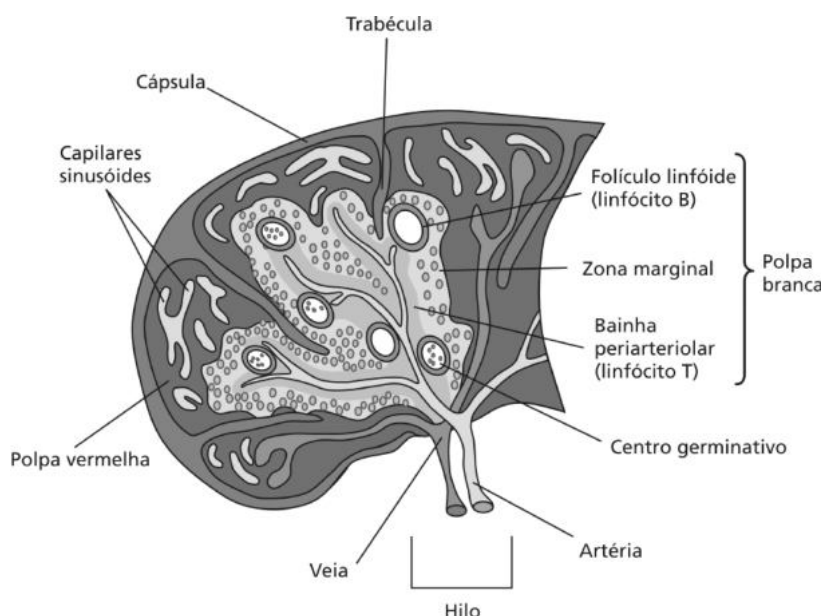


Figura 3.7: Figura esquemática do baço.

Tecido linfóide associado às mucosas

Você sabia que a área das mucosas gastrointestinal, respiratória e urogenital corresponde a aproximadamente 400m², o equivalente a uma quadra de basquete? Devido a essa extensão e à vulnerabilidade do epitélio que reveste as mucosas, elas se constituem nas principais portas de entrada de patógenos. Entretanto, esta vulnerabilidade das mucosas é protegida pelos componentes da imunidade inata (que vimos na Aula 2) e por um grupo de tecidos linfóides especializados genericamente, chamados tecidos linfóides associados às mucosas MALT (do inglês *mucosal associated lymphoid tissue*). Estruturalmente, o MALT corresponde desde as células do sistema imune dispersas na mucosa, coleções de tecidos linfóides dispersos na **LÂMINA PRÓPRIA** dos epitélios até tecidos linfóides organizados, tais como tonsilas, adenóides, apêndice e placas de Peyer. Veja a localização destes tecidos linfóides na Figura 3.4.

LÂMINA PRÓPRIA

Também chamada córion ou cório, está localizada imediatamente abaixo do epitélio e da lâmina basal. Veja Figura 3.8. É composta de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas e tecido linfóide.

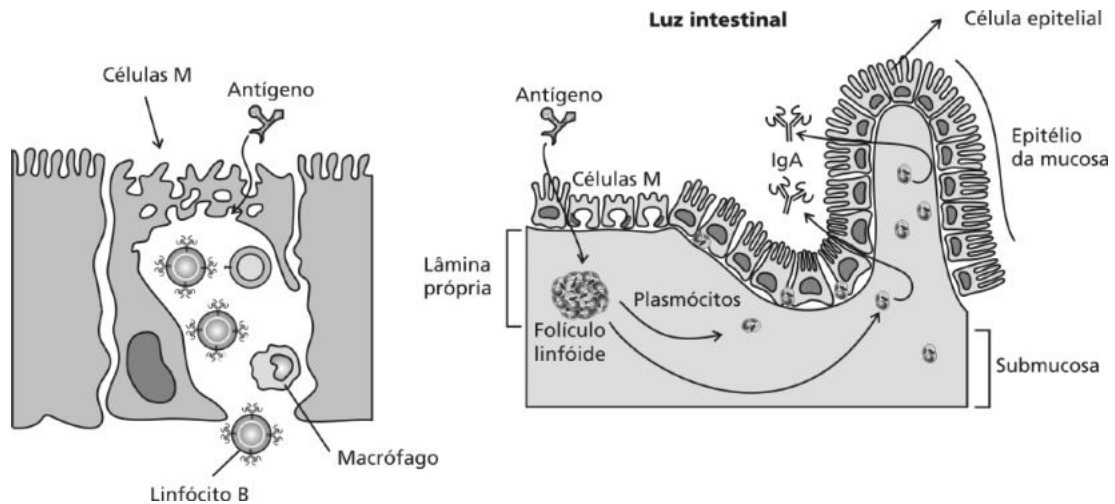


Figura 3.8: Desenho esquemático da mucosa do trato gastrointestinal. Observe a distribuição dos linfócitos intra-epiteliais, plasmócitos e folículo linfóide na lâmina própria e, no epitélio, a presença de células M que recobrem o folículo linfóide.

Na mucosa do trato gastrointestinal, os linfócitos são encontrados dispersos na camada epitelial e são chamados linfócitos intra-epiteliais. Na lâmina própria e submucosa, encontramos uma grande quantidade de plasmócitos, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, eosinófilos e mastócitos. Além disso, nesta mesma região são encontrados tecidos linfóides organizados, denominados folículos linfóides. Veja na **Figura 3.8**. Já no íleo (terceiro segmento do intestino delgado), esses folículos podem estar agrupados (30-40 folículos) e são chamados placas de Peyer. A maioria dos linfócitos intra-epiteliais são do tipo T e, em humanos, a maioria deles são células T CD8; já em camundongos, em torno de 50% dos linfócitos intra-epiteliais expressam o receptor de células T (TCR) do tipo $\gamma\delta$ (gama-delta). Nas mucosas, tanto as células T com TCR do tipo $\alpha\beta$ (alfa-beta) ou $\gamma\delta$ apresentam uma diversidade limitada, diferentemente do que se observa no restante do organismo, sugerindo que estas células estejam envolvidas no reconhecimento de antígenos comumente encontrados no lúmen intestinal. De um modo geral, os TCRs do tipo $\gamma\delta$ apresentam menor diversidade que os TCRs do tipo $\alpha\beta$, conforme veremos na Aula 9.

Vamos parar um pouquinho para dar uma “especuladazinha” evolutiva. Considerando que os TCRs dos linfócitos $\gamma\delta$ possuem menor diversidade dos que os TCRs $\alpha\beta$, não lhe parece que o primeiro seja um tipo

de receptor que ilustra o “estágio intermediário” entre aqueles que detêm o “supra-sumo” da especificidade refinada, isto é, os TCR $\alpha\beta$ exibidos pelos linfócitos T, os anticorpos produzidos pelos linfócitos B do sangue circulante, e os PRRs (*pattern recognition receptors*) presentes nos fagócitos, que vimos na Aula 2? Você concorda? Estamos apenas especulando!!!!

As placas de Peyer são constituídas principalmente de linfócitos B organizados em folículos primários e secundários. Tal como em outros órgãos linfóides que já vimos, os folículos primários, ao serem estimulados, transformam-se em folículos secundários com centro germinativo que contém linfócitos B ativados em proliferação. Um pequeno número de linfócitos T CD4 também é encontrado nas placas de Peyer, principalmente na região interfolicular. Dentre as células epiteliais que recobrem as placas de Peyer, estão umas células especializadas denominadas M (membranosa). As células M, conforme podemos ver na **Figura 3.8**, não apresentam microvilosidade, presentes nas células epiteliais, e têm alta capacidade de transportar antígenos do lúmen intestinal para os tecidos subepiteliais. Supõe-se que a função principal dessas células seja carrear antígenos da luz intestinal para as placas de Peyer e folículos linfóides. É importante ressaltar que estas células não têm a função de processar e apresentar antígenos. Folículos linfóides são abundantes no apêndice, sendo também encontrados, em menor número, no restante do trato gastrointestinal, trato respiratório e outras mucosas. As tonsilas (amígdalas) e adenóides são também folículos linfóides similares às placas de Peyer.

A resposta imune contra os antígenos orais difere, em alguns aspectos fundamentais, dos antígenos administrados em outros sítios. Duas características marcantes são a produção de anticorpos IgA, associada às mucosas, e a imunização oral com antígenos protéicos que tendem a induzir a tolerância das células T, ao invés de ativá-los. Não se preocupe! Estes temas serão adequadamente abordados em uma das próximas aulas.

Tecido linfóide associado à pele

A pele é uma barreira importante entre o organismo e o ambiente externo, possuindo um sistema imune especializado. Muitos antígenos penetram no corpo através da pele. Conseqüentemente, muitas vezes a resposta imune é iniciada neste tecido.

A epiderme, camada externa da pele, é constituída principalmente de queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células T intra-epiteliais. As células de Langerhans são as células dendríticas da pele, mas em estágio imaturo, pois ainda não apresentam todo o seu potencial para atuarem como críticas no desenvolvimento de imunidade adquirida como vimos há pouco, ao falarmos sobre elas. Cobrem quase 25% da superfície, devido às suas longas projeções dendríticas e orientação horizontal. De fato, elas formam uma rede quase contínua que as capacitam a capturar os antígenos que entram através de pele. Ao serem ativadas, estas células retraem suas projeções, perdem a adesão às células da epiderme e migram para a derme. Subseqüentemente, migram para os linfonodos regionais, via vasos linfáticos, nos quais se processa a ativação da resposta imune adaptativa.

Futuramente, veremos como as células se integram e se ativam em função de um determinado estímulo que pode ser patogênico ou não. Portanto, tenha estes conceitos bem claros na sua mente. Caso tenha alguma dúvida, não deixe de tirá-la com seu tutor, pois estes conceitos serão fundamentais para as próximas aulas.

ATIVIDADE FINAL

Em relação a células e órgãos do sistema imune, assinale (V) para as afirmações verdadeiras e (F) para as falsas.

- a. () Morfologicamente, os linfócitos não podem ser diferenciados, porém, do ponto de vista funcional e de marcadores na superfície celular, eles podem ser divididos em linfócitos B e T, sendo que as células T CD3 podem ser subdivididos em T CD4 e T CD8.
- b. () Nos órgãos linfóides periféricos, os folículos linfóides correspondem à área predominantemente de células T que, ao serem especificamente estimulados, evoluem para folículo linfóide secundário com centro germinativo.
- c. () Os linfócitos B estão localizados nos linfonodos, principalmente na região cortical, enquanto os linfócitos T estão presentes principalmente na região paracortical.
- d. () Antígenos que penetram através da pele ou mucosas são carregados para os respectivos linfonodos regionais, enquanto que os antígenos que caem na corrente sangüínea são carregados para o baço. Nestes órgãos, são ativadas as células responsáveis pela imunidade adaptativa.

RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu V, F, V e V, parabéns! Se você errou, vamos ver por quê? A alternativa a está correta, porque os linfócitos, conforme descrevemos na **Tabela 3.2**, não podem ser diferenciados pela sua morfologia; porém, funcionalmente, um linfócito T desempenha um papel completamente diferente do linfócito B, inclusive no que diz respeito aos marcadores na superfície celular. Reveja a Atividade 1, se você ainda tiver dúvidas. A alternativa b está errada, porque o enunciado corresponde a células B, e não T. As alternativas c e d estão corretas, porque correspondem exatamente ao que já descrevemos anteriormente.

RESUMO

O sistema imune dos vertebrados superiores é constituído por células altamente especializadas (linfócitos T e B) em diferenciar o próprio do não-próprio; apresenta-se compartimentalizado em órgãos e em tecidos linfóides estrategicamente espalhados pelo organismo. Os linfócitos têm um ritmo de circulação e recirculação impressionantes, o que compensa a pequena proporção em que se observa um dado linfócito que reconheça a mesma estrutura antigênica. Alguns tecidos não-linfóides são imunologicamente ativos, como a pele e os epitélios dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenitário; este fato ilustra a estratégia de preservação do próprio, pois são locais de interface com o meio externo, passíveis de invasão ou contaminação.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, estudaremos a inflamação e os mecanismos moleculares que os leucócitos utilizam para migrar pelo sangue, pela linfa, pelos tecidos linfóides e pelos tecidos do nosso corpo, em geral.

Sistemas experimentais em Imunologia

AULA

4

Meta da aula

Apresentar os principais sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro* utilizados em Imunologia.

objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Propor experimentos *in vitro* ou *in vivo* para solucionar problemas em Imunologia.
- Interpretar alguns experimentos básicos em Imunologia.

Pré-requisitos

Para que você possa acompanhar melhor esta aula, é importante que reveja os conceitos das Aulas 4, 5 (preparando a amostra) e 6 (itens relacionados a anticorpos) do Módulo 1 de Biologia Celular I e alguns conceitos básicos da disciplina de Biologia Molecular e Genética Básica.

INTRODUÇÃO

Na primeira aula, fizemos um breve relato da história da Imunologia. Você viu que a construção do conhecimento na Imunologia se deu através da observação e interpretação de alguns fatos da história da humanidade como, por exemplo, a praga de Atenas e os surtos de varíola que assolaram algumas regiões. Você viu também que alguns experimentos relativamente simples, analisados por cientistas de diferentes áreas da Ciência, geraram conceitos básicos de Imunologia que são aplicados até hoje. Relembramos o fato de que a Imunologia é uma ciência basicamente experimental que congrega várias áreas do conhecimento.

Nesta aula, vamos descrever os principais sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro* utilizados para se entender como funciona o sistema imune. Você vai ver também a importância de outras disciplinas no estabelecimento desses sistemas. Esta é uma aula à qual nos referiremos muito nesta disciplina. Portanto, não hesite em consultá-la sempre que tiver dúvidas.

SISTEMAS EXPERIMENTAIS

Os sistemas experimentais podem ser do tipo *in vivo* ou *in vitro*. Os sistemas *in vivo* envolvem os animais e podem dar ao pesquisador uma idéia global do efeito de um determinado tratamento no organismo animal. Entretanto, as várias inter-relações moleculares e celulares que compõem os sistemas *in vivo* podem dificultar a interpretação dos resultados, embora tenham a vantagem de nos mostrar a repercussão dos experimentos em questão no sistema imune do animal. Por outro lado, os sistemas *in vitro* se baseiam na utilização de elementos do sistema imune (moléculas e ou células) mantidos sob condições controladas, o que se constitui em vantagem quando se deseja estudar especificamente as interações moleculares e/ou populações celulares em determinadas situações.

MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

Ao longo da história da Imunologia, alguns cientistas como, por exemplo, Edward Jenner, no final do século XVIII, utilizaram seres humanos para realizar suas experiências. Obviamente, por razões éticas, esta é uma prática inconcebível nos dias de hoje, quando realizadas nos moldes daquela época. Entretanto, você já deve ter percebido que as

pesquisas realizadas em todas as áreas da Ciência visam, de maneira direta ou indireta, à promoção da saúde ou à melhoria da qualidade da vida humana. Assim, para que um produto seja liberado para utilização humana (como, por exemplo, vacinas e drogas), ele deve passar por rigorosos testes que vão de ensaios *in vitro* a testes *in vivo*, que utilizam desde pequenos roedores a primatas não-humanos (macacos), até serem liberados para testes em um pequeno grupo de voluntários humanos. Portanto, para desenvolver as suas pesquisas, os cientistas modernos desenvolveram vários modelos *in vivo* e *in vitro* para realizarem os seus experimentos. Os modelos *in vivo* podem ser constituídos por animais normais (não geneticamente modificados), animais que foram geneticamente modificados a partir de animais normais ou animais portadores de deficiências naturais (deficiências congênitas).

Na Imunologia, os animais são amplamente usados pelos pesquisadores com diversas finalidades, tais como a produção de anticorpos, que podem ser utilizados como imunoterápicos ou ferramentas para pesquisa (veja a Aula 6 de Biologia Celular I); desenvolvimento de vacinas ou drogas; estudo das interações parasita/hospedeiro ou mesmo para entender o funcionamento do sistema imune.

Você pode estar se perguntando: apesar de todo o progresso da Ciência nas últimas décadas, ainda há muito por ser descoberto sobre a maneira como opera o sistema imune? Sim, existem várias interações celulares e moleculares que ainda não foram totalmente esclarecidas, e o entendimento destes pontos poderá fornecer subsídios para intervenções terapêuticas mais adequadas no tratamento de várias doenças.

O estudo do sistema imune nos vertebrados depende da escolha do modelo animal mais adequado, de acordo com os respectivos objetivos. Vejamos estes exemplos. Se o estudo necessita de uma grande quantidade de soro, os animais adequados podem ser coelhos, ovinos, caprinos ou eqüinos. No caso de uma vacina contra uma doença infecciosa, por exemplo, o animal a ser escolhido deve ser susceptível ao agente etiológico, para que se possa analisar a eficácia da vacina. Se o agente infeccioso infecta seletivamente humanos e primatas, os ensaios *in vivo* podem se restringir aos macacos, chimpanzés e babuínos, o que dificulta bastante o seu estudo, principalmente pela elevação dos custos dos experimentos. Um exemplo desta última situação é o vírus da AIDS, o HIV.



Todos os estudos que envolvem animais devem seguir os princípios éticos da experimentação animal e obedecer à legislação específica para o seu uso. Isso mesmo! Os animais devem ser tratados com respeito e dignidade. Caso você queira saber um pouco mais sobre este assunto, visite o *site*: <http://www.cobea.org.br>.

Os camundongos são os animais experimentais mais utilizados nas pesquisas básicas realizadas em Imunologia e em outras áreas biomédicas, porque eles são fáceis de manipular, têm ciclo reprodutivo curto e são geneticamente bem caracterizados; o seu genoma já foi totalmente seqüenciado, o que facilita as manipulações genéticas nestes animais.



Você sabia que o seqüenciamento do genoma do camundongo foi realizado por um consórcio público que envolveu 27 centros de pesquisas de seis países e o resultado deste trabalho publicado em 5 de dezembro de 2002 pela revista *Nature*.

LINHAGENS DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS

Para controlar as variações experimentais devidas à variabilidade genética dos animais, os imunologistas geralmente trabalham com linhagens de camundongos isogênicos, porque estes animais são geneticamente idênticos e, dessa forma, a resposta imune nesses animais pode ser estudada sem as variações causadas pela diversidade genética observada entre os indivíduos de uma população. O uso desses animais permitiu grandes avanços na Imunologia. A partir deles é que se pôde realizar a transferência de células de um animal para outro sem que houvesse rejeição e, assim, esclarecer o papel de cada célula do sistema imune. Entender os mecanismos imunológicos que governam a rejeição, ou não, de um tecido ou órgão transplantado, entre outros assuntos, é o que iremos tratar nesta disciplina.



Isogênico ou singênico – refere-se a animais geneticamente idênticos. Estes animais são obtidos por cruzamento entre irmãos. Dessa forma, a heterozigose encontrada nos genes alelos, normalmente existente nos cruzamentos ao acaso, é substituída pela homozigose em todos os *loci*. Geralmente, o cruzamento entre irmãos, por 20 gerações, resulta em linhagens de animais isogênicos com progênes que são homozigóticas em mais de 98% de todos os *loci*. Além dos camundongos, os cientistas podem contar com linhagens isogênicas de ratos, cobaias, hamsters, coelhos e aves domésticas. Veja na **Figura 4.1** fotos de camundongos isogênicos.

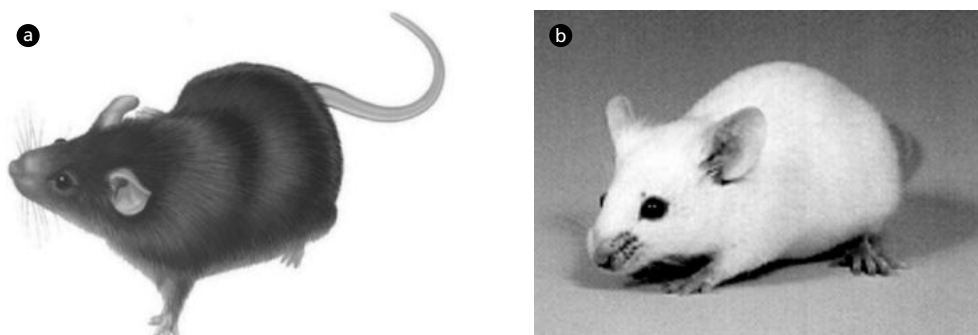


Figura 4.1: Fotos ilustrativas de linhagens de camundongos isogênicos. (a) Linhagem C57BL/6 e (b) linhagem BALB/c.

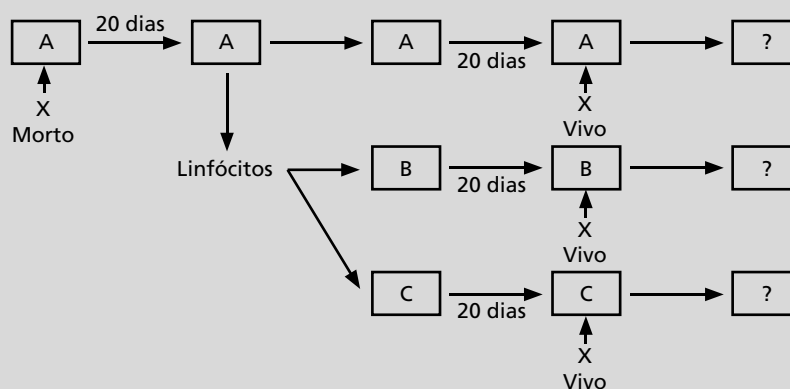
Vamos fazer uma atividade para ver um exemplo prático desse assunto?

ATIVIDADE



1. Veja o esquema a seguir e considere a situação hipotética. Os camundongos A e B são de uma mesma linhagem isogênica e C pertence a uma outra linhagem. X é um microrganismo patogênico para os camundongos. O animal A foi imunizado com X inativado e 20 dias depois os linfócitos de A foram colhidos e transferidos para os animais B e C. Vinte dias após esta transferência de linfócitos, os camundongos A, B e C foram desafiados com o microrganismo X, desta vez vivo. O que você acha que aconteceu com cada um dos animais? Eles adoeceram ou não?

Dica: transplantes de células ou tecidos entre linhagens diferentes são rejeitados (destruídos).



RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu que os camundongos A e B não adoeceram e C adoeceu, você acertou. Parabéns! Mas se você não acertou, vamos resolver juntos. Os animais A e B não adoeceram. O animal A, porque foi imunizado. O animal B, porque recebeu os linfócitos do animal A que lhe conferiram proteção contra o agente etiológico X. O camundongo C, apesar de ter recebido linfócitos do camundongo A, que havia sido imunizado contra X, adoeceu porque rejeitou os linfócitos transfundidos, pois C pertence a uma linhagem isogênica diferente de A e B.

Este é um ensaio que demonstra claramente a importância da imunidade celular. Além disso, demonstra que transplantes entre animais geneticamente diferentes são rejeitados. Esses assuntos serão discutidos em detalhes em outras aulas, quando ficará claro para você que um experimento aparentemente simples como esse pode servir de base para explicar vários conceitos importantes da Imunologia (função de células T e B etc.), ressaltando, assim, a importância dos modelos experimentais animais para a geração de conhecimentos nesta área.

Atualmente, existem mais de 150 linhagens de camundongos isogênicos, sendo que cada linhagem apresenta uma característica específica, e são identificados com uma série de letras e/ou números. Veja o **Quadro 4.1**, onde temos alguns exemplos de linhagens murinas (isto é, de camundongos).

Quadro 4.1: Algumas linhagens murinas comumente usadas em Imunologia

Linhagens	Sublinhagens	Características
BALB/c	BALB/cj	Sensibilidade a raios-X
	BALB/cj AnN	Utilizado na produção de hibridomas ^a
	BALB/cBy	Muitas linhagens de mielomas ^b foram geradas nestes camundongos
CBA	CBA/J	Gene (<i>rd</i>) causando degeneração da retina
	CBA/N	Gene (<i>xid</i>) causando imunodeficiência ligada ao X ^c
C3H	C3H/He	Gene (<i>rd</i>) causando degeneração da retina
	C3H/HeJ	Alta incidência de tumor mamário
C57BL/6	C57BL/6J	Alta incidência de hepatoma ^d , depois de irradiados
	C57BL/6By	Alta atividade do sistema complemento ^e
C57BL/10	C57BL/10J	Muito similar ao C57BL/6, mas apresenta diferenças em, pelo menos, dois <i>loci</i>
C57BL/10	C57BL/10N	Freqüentemente utilizado para produção de camundongo congênico ^f
C58	C58J	Alta incidência de leucemia
DBA/2	DBA/2J	Baixa resposta imune para alguns antígenos
DBA/2	DBA/2N	Baixa resposta imune ao lipopolissacarídeo ^g tipo III

^a Hibridoma – linhagem celular obtida a partir da fusão do mieloma com um linfócito normal. Exemplo: o hibridoma de um linfócito B produz anticorpos monoclonais.

^b Mieloma – termo utilizado para denominar câncer de células B. Genericamente, é também utilizado para as linhagens celulares derivadas de linfócitos.

^c Imunodeficiência ligada ao cromossomo X.

^d Hepatoma – câncer de fígado.

^e Sistema complemento – conjunto de proteínas presentes no soro e na superfície celular que participam de uma cascata enzimática que resulta em várias funções imunológicas importantes, tais como, lise da célula-alvo, inflamação etc.

^f Congênico – linhagens de camundongos isogênicos idênticos em todos os *loci* genéticos, exceto no loco no qual ele foi selecionado para diferir.

^g Lipopolissacarídeo (LPS) – componente da parede celular de bactérias gram-negativas, compostas por lipídeos e carboidratos. Estimulam a resposta imune inata; alguns funcionam como superantígenos.

MODELO DE TRANSFERÊNCIA ADOTIVA

Você já deve ter ouvido falar que radiações ionizantes provenientes de raios-X ou raios γ são capazes de destruir tecidos como, por exemplo, células cancerosas. Este é um procedimento denominado radioterapia, com que as pessoas portadoras de alguns tipos de câncer são tratadas. Em camundongos, doses subletais de raios-X (650 – 750 rads) podem matar até 99,99% dos linfócitos de um animal. Veja que interessante! Um camundongo submetido a esta dose subletal de radiação pode servir de receptor de uma população ou de uma determinada subpopulação de linfócitos de um outro camundongo da mesma linhagem, sendo que o animal doador pode ter sido imunizado ou submetido a um tratamento

qualquer. Assim, no camundongo receptor, é possível estudar as interações celulares realizadas pelos linfócitos transferidos ou mesmo a sua migração para os tecidos ou órgãos, sem a interferência dos linfócitos do receptor.

Foi utilizando esta técnica que o pesquisador James Gowans, em meados do século XX, provou a importância dos linfócitos na resposta imune. Ele demonstrou que a imunidade poderia ser transferida para receptores irradiados por linfócitos obtidos de doadores imunizados. Esta técnica pode ser ainda refinada, transferindo-se ao receptor subpopulações de linfócitos, tais como células B, T CD4 e outras.

CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

Antes do advento dos projetos genoma, muitos genes foram identificados a partir da observação do fenótipo distinto produzido por um gene que sofria mutação espontânea. Dessa mesma forma, foram identificados dois genes murinos, mutantes naturais, (*nu*) e (*scid*) que originaram os camundongos nude e SCID, respectivamente, que foram marcos importantes da ciência experimental na Imunologia.

A ocorrência homozigótica do gene autossômico recessivo (*nu*), relatada em 1966, resultou num camundongo deficiente de timo; conseqüentemente, estes animais não têm células T funcionais e foram denominados nude. Essa imunodeficiência impede que estes animais tenham algumas funções imunológicas importantes, tais como produção de anticorpos contra antígenos timo dependente; resposta imune mediada por células T CD4 e/ou T CD8; reações de hipersensibilidade tardia que dependem de linfócitos T CD4; morte de células infectadas por vírus ou células tumorais que requerem células T CD8; rejeição de enxertos que dependem de ambas as células T CD4 e T CD8. Não se assuste! Todos estes temas serão adequadamente abordados em outras aulas. No momento, é importante que fique bem claro que essa imunodeficiência faz com que estes camundongos sejam bons modelos experimentais para transplantes, reprodução de tumores humanos e para se estudar a biologia de células T murinas de mesma linhagem isogênica. Uma outra característica marcante desses animais é ausência de pêlos, que deu origem à sua denominação nude (**Figura 4.2**). Atualmente, existem várias linhagens isogênicas com essa imunodeficiência, tais como BALB/c e C57BL/6.



Figura 4.2: Camundongo imunodeficiente nude. Observe a ausência de pêlos.

O camundongo portador da imunodeficiência severa combinada, denominado SCID, determinado pela presença homozigótica do gene (*scid*), descrita em 1983, se caracteriza pela ausência de células B e T. Da mesma forma que o camundongo nude, o camundongo SCID também apresenta imunodeficiência, porém num grau muito mais severo do que o nude, porque este animal não tem apenas os linfócitos T, enquanto que o camundongo SCID não apresenta linfócitos T e B. Essa imunodeficiência severa combinada não permite que estes animais sejam criados em **BIOTÉRIOS** convencionais. Eles são criados dentro de isoladores, num ambiente livre de patógenos.



Você se lembra de um filme intitulado *O rapaz da bolha de plástico*, da década de 1970? Este filme retrata a imunodeficiência severa combinada em humanos, no qual o rapaz, protagonizado por John Travolta, vive num ambiente estéril, dentro de uma bolha de plástico, em alusão a uma situação real que ocorreu, na época, nos Estados Unidos. Este rapaz morreu com 12 anos de idade em 1984, sem nunca ter entrado em contato com o meio externo nem ter tocado diretamente uma outra pessoa.

Como no camundongo nude, mas com grau menor de rejeição, o SCID aceita transplantes de células e tecidos humanos, inclusive tecidos tumorais, o que faz deles bons modelos para estudos de transplantes, testes de novas terapias antitumorais etc. Entretanto, este animal não permite o transplante de linfócitos humanos para funcionar como um modelo de estudo da biologia destas células. Neste caso, ocorre a rejeição do lado oposto, ou seja, os linfócitos transplantados é que rejeitam o hospedeiro e podem levá-lo à morte. Este fenômeno é conhecido como doença do enxerto *versus* hospedeiro do inglês *graft versus host disease*. Estranho, não é mesmo? Mas nesta situação é isso mesmo o que acontece, porque os linfócitos maduros transplantados reconhecem o hospedeiro como estranho e tentam eliminá-lo. Em humanos, isto também pode acontecer nos transplantes. Ocorre com mais frequência nos transplantes de medula óssea e dependem, principalmente, do grau de **HISTOCOMPATIBILIDADE** entre doador e receptor.

BIOTÉRIO

Unidade destinada à criação e manutenção de animais de laboratório em condições sanitárias dentro dos padrões técnicos e éticos, para serem utilizados na pesquisa científica.

HISTOCOMPATIBILIDADE

Grau de semelhança genética de um conjunto de moléculas entre o doador e o receptor que determina a aceitação ou a rejeição de transplantes. As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) são as principais responsáveis por este fenômeno. Este assunto será tratado com mais detalhes em uma outra aula.



ATIVIDADE

2. Um pesquisador, ao estudar o microrganismo Y, que pode causar uma doença letal em camundongos, descobriu que os linfócitos T são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta protetora contra esse microrganismo. Com base no que já vimos, você seria capaz de sugerir o experimento que ele realizou para fazer esta descoberta? Dica: lembre-se de que camundongos nude são deficientes de linfócitos T.

RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu que o pesquisador poderia ter injetado o microrganismo Y em camundongos BALB/c normal e camundongo BALB/c nude e, como resultado, observado que os nudes morreram e os BALB/c normais sobreviveram, você acertou. Parabéns! Este experimento sugere a importância dos linfócitos T na resposta protetora contra este microrganismo. Entretanto, este experimento pode ser complementado com um ensaio de transferência adotiva de linfócitos T, da seguinte forma: os linfócitos T dos camundongos sobreviventes podem ser isolados e transferidos a um outro grupo de camundongos BALB/c nude e posteriormente desafiados com o microrganismo Y. Desta vez, os camundongos nudes não morrerão, porque os linfócitos transfundidos irão protegê-los. Esses experimentos poderiam ter sido feitos também com qualquer outra linhagem isogênica que tenha esta imunodeficiência. Se você errou, não se preocupe, vamos propor mais atividades para que você possa treinar este tipo de raciocínio.

SISTEMAS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

A complexidade das interações celulares *in vivo* que envolvem a geração de uma resposta imunológica tem servido de grande estímulo aos imunologistas no desenvolvimento de vários tipos de sistemas experimentais *in vitro*, que vão desde o cultivo de células primárias a células geneticamente manipuladas. Se você tiver dúvidas, não hesite em rever os conceitos sobre cultivo celular (Aulas 4 e 5 da disciplina de Biologia Celular I).

Cultivo de leucócitos

Cultivos primários de linfócitos podem ser obtidos por isolamento destas células diretamente do sangue, da linfa ou de órgãos linfóides. O procedimento mais utilizado para o isolamento destas células é a centrifugação do sangue sobre uma solução de **FICOLL** com densidade de 1,077 g/mL. A solução de ficoll permite que as hemácias agregadas e os granulócitos passem através dele e, na interface entre o ficoll e o plasma, fiquem as células mononucleadas do sangue, que compreendem os linfócitos e monócitos que também são conhecidas como PBMC (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Veja na **Figura 4.3** uma ilustração deste processo. Estas células isoladas podem ser cultivadas em meio de cultura apropriada. Dessa forma, podem ser estudados o estado de ativação destas células ou mesmo a produção de substâncias mediadoras liberadas por elas. Assim, o PBMC é um instrumento importante que pode fornecer ao pesquisador o “*status*” imunológico do indivíduo, que pode ser saudável, doente ou submetido a um determinado tratamento.

FICOLL

Solução contendo polímero de sacarose de alto peso molecular e metrizoato de sódio, comercialmente conhecido como ficoll, largamente utilizado para separação de células ou organelas pelo princípio da densidade, através de centrifugação.

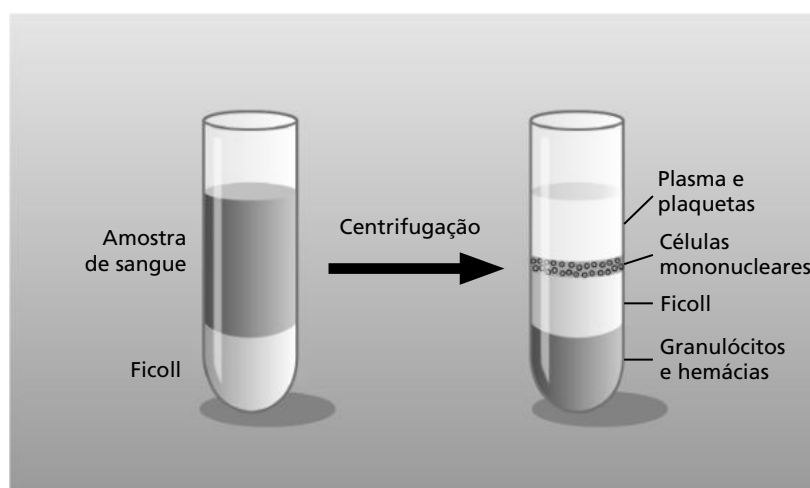


Figura 4.3: Separação de PBMC em colchão de ficoll. O sangue colhido é depositado sobre um volume de ficoll e submetido a centrifugação. Após a centrifugação, podemos observar várias bandas no tubo, que correspondem aos elementos indicados.

Os linfócitos e monócitos obtidos dessa forma podem ser separados utilizando-se uma propriedade inerente aos monócitos e macrófagos, que é sua capacidade de aderir a superfícies plásticas ou de vidro, como você viu na Aula 4 de Biologia Celular I. Nas Aulas 5 e 6 dessa mesma disciplina, você aprendeu que anticorpos – principalmente os monoclonais, marcados com fluorocromos –, podem ser utilizados em conjunto com o aparelho citômetro de fluxo para separar populações de células marcadas ou não com os anticorpos fluorescentes. Este recurso pode ser utilizado para separar também os monócitos dos linfócitos e as populações de linfócitos como, por exemplo, os linfócitos B de linfócitos T. Um outro recurso muito mais utilizado, que este aparelho (citômetro de fluxo) oferece, é a quantificação de células com determinados receptores na sua superfície. Vamos ver um exemplo prático sobre esse assunto, para ficar mais claro? Em indivíduos acometidos pelo vírus HIV, a contagem de linfócitos T (de fenótipo CD4 e T CD8) é extremamente importante para o seu acompanhamento clínico. Para fazer esta contagem, o sangue do paciente é incubado com um anticorpo monoclonal antilinfócito T CD4 e um outro antilinfócito T CD8, ambos anticorpos marcados com fluorocromos. Ao final da preparação, as células são analisadas no citômetro de fluxo que dará o percentual de cada uma destas células na população de linfócitos T, de onde é tirada a relação T CD4 / T CD8. Se você ainda tiver dúvida quanto a essa técnica, reveja a Aula 3.

Linhagens celulares

Normalmente, as células de cultivo primário de origem animal têm o número de subcultivo limitado, isto é, depois de um certo número de multiplicações, as células param de se dividir. Por outro lado, as linhagens celulares de cultura contínua, como o próprio nome diz, oferecem um número ilimitado de subcultivos. Estas últimas podem ser obtidas de várias formas, dentre elas a transformação espontânea, a induzida por carcinógenos químicos ou vírus indutores de tumor e a fusão de células normais com linhagens de células tumorais, que é o princípio da produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais, conforme você já aprendeu em Biologia Celular I, Aula 6.

A primeira linhagem celular, descrita em 1940, foi a célula L, de origem fibroblástica murina, que foi transformada com carcinógeno químico. Em 1950, uma outra linhagem foi descrita a partir de células

obtidas de um câncer de cérvix humano; foi denominada célula HeLa. A partir deste período, várias linhagens celulares foram estabelecidas, originadas de diversos tecidos (animal ou vegetal), apresentando as mais variadas características de acordo com a sua origem. No **Quadro 4.2**, você tem alguns exemplos de linhagens celulares utilizadas em Imunologia.

A origem da linhagem celular Hela tem uma história interessante. O nome deriva das iniciais do nome da doadora das células Henrietta Lacks. O diagnóstico de adenocarcinoma foi feito em 1951, no hospital Johns Hopkins (USA), e uma biopsia do tumor foi feita. A paciente faleceu meses depois, mas as células retiradas se adaptaram muito bem em cultivo *in vitro*. Foi a primeira linhagem de origem tumoral humana a ser adaptada para cultivo em laboratório. Esta célula se transformou rapidamente no principal modelo experimental *in vitro* para o estudo do câncer e de outras pesquisas: entre elas, o desenvolvimento da vacina antipoliomielite. O fato é que esta célula se distribuiu rapidamente pelo mundo todo. Entretanto, nenhuma autorização para a utilização das células tinha sido solicitada à doadora ou à sua família, que nem sabia da existência dessa linhagem celular. Somente em 1975, quase 25 anos após a morte de Henrietta Lacks, a família soube que as células da sua progenitora estavam vivas e distribuídas por laboratórios do mundo inteiro! Parece ficção, não é mesmo? Mas esta história já serviu de base para muitas discussões acerca da ética na utilização de células humanas nas pesquisas científicas.

Quadro 4.2: Linhagens celulares comumente utilizadas em Imunologia

Linhagem celular	Descrição
NSO	Mieloma não-secretante murino, geralmente utilizado na produção de anticorpos monoclonais
MPC 11	Mieloma de camundongo secretor de IgG2b
CTLL-2	Linhagem murina de célula T dependente de interleucina 2, geralmente utilizada para avaliar a produção de interleucina 2
WEHI 265.1	Linhagem de monócito de camundongo
COS-1	Células de rim de macaco verde africano transformada por vírus símio-40, normalmente utilizadas em ensaios de transfecção de DNA
THP-1	Linhagem monocítica humana de origem leucêmica
Jurkat	Linhagem de origem leucêmica humana de linfócito T
Molt-4	Células T linfoblastóide humana; produz tumor em camundongos nude
L-929	Fibroblasto de origem murina, geralmente utilizada para bioensaio de fator de necrose tumoral

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética compreende um conjunto de técnicas originadas de várias áreas do conhecimento, tais como Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Genética Microbiana, que permitiram que cientistas pudessem clonar genes (isolar fragmentos de DNA) de um organismo e combiná-los com genes de um segundo organismo. Assim, um organismo relativamente simples, como uma bactéria ou uma levedura, ou mais complexos, como células de mamífero em cultura ou animais (bovinos, caprinos, ovinos, murinos etc.), podem ser induzidos a produzir grandes quantidades de proteínas de interesse. As proteínas originadas a partir desta tecnologia chamamos genericamente proteína recombinante ou de interesse. Podemos citar alguns exemplos, como a insulina humana recombinante, o hormônio de crescimento, uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas etc. Os microrganismos também podem ser utilizados para produzir proteínas de agentes infecciosos, como o antígeno do vírus da hepatite HBsAg, que é produzido em levedura e utilizado como vacina. Um outro aspecto da aplicação desta tecnologia é a terapia gênica, que você já deve ter ouvido falar na mídia; consiste na substituição do gene defeituoso ou ausente por um gene normal. Esta modalidade terapêutica está sendo estudada para várias doenças, entre elas a hemofilia e a diabetes, existindo ainda um longo percurso para que esta técnica possa vir a ser aplicada normalmente em seres humanos.

ENZIMA DE RESTRIÇÃO OU ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO

É uma enzima que reconhece o DNA de dupla-fita numa sequência específica chamada sítio de restrição. Atualmente existe um número muito grande de enzimas de restrição que reconhecem, respectivamente, diferentes sítios de restrição.

Estas enzimas são amplamente utilizadas em laboratórios de Biologia Molecular para cortar moléculas de DNA em locais específicos. Para saber um pouco mais, visite este *site* na Internet: <http://www.biologianaweb.com/Livro2/C11/enzres.html>

A tecnologia de manipulação do DNA e a criação de novas combinações gênicas nessa molécula dependeram, fundamentalmente, das **ENDONUCLEASES**, as **ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**, que reconhecem e clivam sítios específicos da molécula de tal forma que moléculas de origens diferentes podem, após a clivagem, ser ligadas a outra molécula.

Na década de 1970, este conjunto de técnicas abriu um leque de aplicações biotecnológicas com potencial aparentemente inesgotável. Além daqueles que já vimos, podemos citar mais alguns exemplos da sua aplicação. Essas técnicas servem para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica; determinar a sequência de um gene e, conseqüentemente, a proteína codificada por ele; para a criação de organismos com características desejáveis, tais como plantas que não dependam de fertilizantes ou de animais que exibam alta taxa de crescimento. A técnica central da tecnologia do DNA recombinante é

a **clonagem molecular**, que consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas (Figura 4.4). Se você quiser saber um pouco mais sobre a tecnologia do DNA recombinante e assuntos correlatos, consulte os seguintes *sites* na internet:

<http://www.biologianaweb.com/Livro2/C11/l2c11.html>

http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/dna/parte1.htm

<http://www.odnavaiaescola.com/topicos.htm>

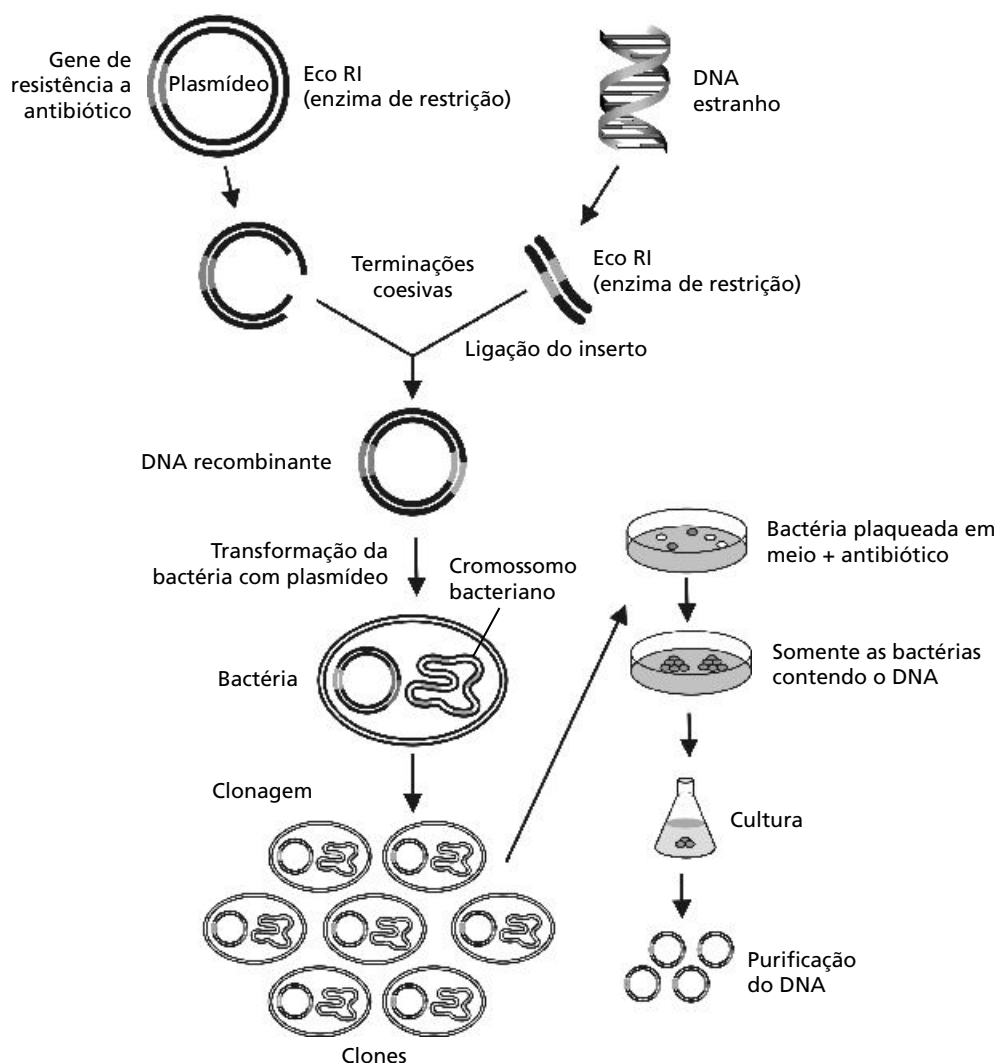


Figura 4.4: Clonagem do DNA. O DNA obtido de uma célula e o vetor de clonagem são tratados com a mesma enzima de restrição para criar extremidades coesivas. O fragmento de DNA é então ligado ao vetor, formando o que chamamos de DNA recombinante. Este DNA recombinante é inserido em uma célula hospedeira apropriada, que pode ser a bactéria *Escherichia coli*, que agora passa a ser chamada de célula transformada. Esta célula transformada pode ser multiplicada, dando origem a milhares de cópias do DNA recombinante.

A clonagem molecular compreende, pelo menos, dois estágios importantes: primeiro, o fragmento do DNA de interesse chamado inserto é identificado e isolado; então, este gene é ligado a uma outra molécula de DNA chamada vetor de clonagem, que pode ser um plasmídeo, para formar o que chamamos DNA recombinante. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é, então, chamada transformante ou célula transformada.

Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante. A palavra clone vem do grego “Klon”, que significa broto. Clonagem é um processo de reprodução assexuada, a partir de uma célula-mãe ou de uma ou mais células geneticamente idênticas entre si e à original, que são os clones.

Uma vez que o gene de interesse tenha sido identificado e clonado, este clone pode ser explorado sob vários aspectos. Assim, pode ser sequenciado e comparado com outras seqüências já descritas; ser utilizado no estudo da expressão gênica do(s) gene(s) contido(s) no clone; ser alterado especificamente por mutagênese sítio dirigida ou ser usado para gerar um produto de interesse comercial. Para isto, quase sempre é necessário transferir o clone ou parte deste, para um vetor mais apropriado para atingir os objetivos desejados. A transferência de parte do DNA clonado para um novo vetor é conhecida como subclonagem. Descreveremos resumidamente, a seguir, alguns conceitos técnicos que serão importantes para o entendimento de algumas aulas desta disciplina.

TRANSFERÊNCIA DE GENES PARA CÉLULAS PROCARIÓTICAS OU EUCARIÓTICAS

Em Imunologia, a tecnologia do DNA recombinante trouxe grandes avanços nas últimas décadas. Dentre eles, permitiu que moléculas fossem expressas ou suprimidas, tanto em sistemas *in vitro* ou *in vivo*, possibilitando, assim, que suas respectivas funções fossem esclarecidas. Várias moléculas mutantes puderam ser expressas, para que suas funções biológicas fossem estudadas.

O gene clonado pode ser subclonado em vetores de expressão. O vetor de expressão permite que este gene possa ser transferido para células hospedeiras eucarióticas ou procarióticas e, assim, a proteína codificada pelo gene ser expressa. A essa proteína denominamos proteína recombinante. Veja, na **Figura 4.5**, um esquema simplificado deste processo.

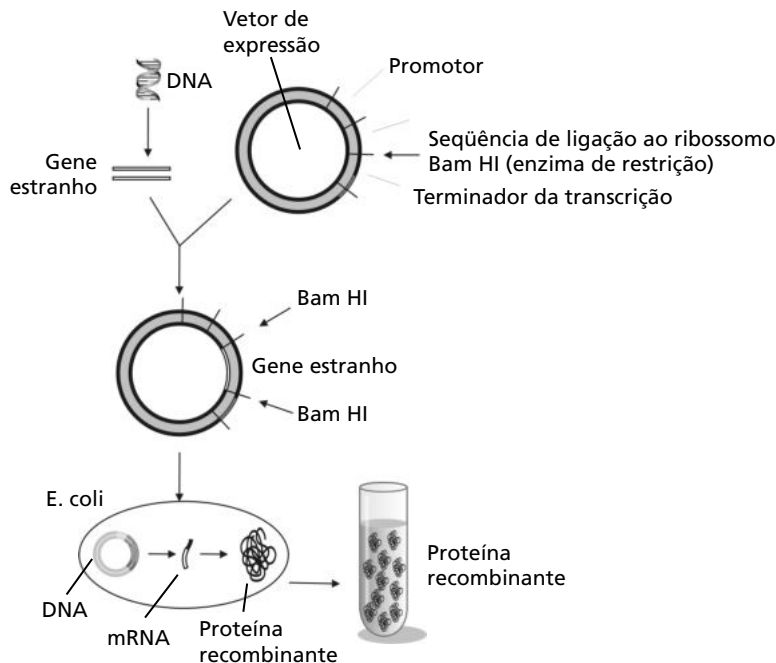


Figura 4.5: Expressão de proteína recombinante. O gene clonado é retirado do vetor de clonagem e inserido no vetor de expressão. O vetor de expressão é então utilizado para transformar células hospedeiras apropriadas, que podem ser leveduras ou mesmo a bactéria *E. coli*. As células transformadas são cultivadas, produzindo as proteínas recombinantes.

A bactéria *Escherichia coli* é uma das células hospedeiras mais utilizadas para clonagem de DNA e expressão de proteínas recombinantes, por ser uma bactéria de cultivo fácil, ser geneticamente bem conhecida e ter uma grande quantidade de “ferramentas” moleculares disponíveis comercialmente. O gene clonado em vetores adequados pode também ser transfectado (transferido) para uma célula animal, na qual podem ser estudadas a função da proteína codificada por ele ou a regulação da expressão deste gene, ou seja, os fatores de transcrição envolvidos, a via de sinalização e outros componentes celulares envolvidos na transcrição de um gene. Veremos, nas aulas seguintes, a importância destas técnicas na elucidação de vários receptores e moléculas importantes da resposta imune.

CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS E *KNOCKOUT* (NOCAUTE)

Certamente, você já ouviu falar de animais e plantas transgênicos, provavelmente na disciplina de Biologia Molecular ou mesmo na mídia. Este é um tema bastante polêmico, principalmente quando diz respeito a produtos para utilização humana como, por exemplo, alimentos. À parte o lado polêmico desta história, vamos falar um pouco desta técnica, que trouxe grandes avanços nas ciências biomédicas e agropecuárias nas últimas décadas. Na Imunologia, esta técnica é largamente aplicada ao estudo da regulação e função de genes, de receptores e moléculas que se ligam a eles (ligantes) e que participam da resposta imune. Esta técnica é também utilizada para produção de modelos animais, principalmente camundongos, para o estudo de várias doenças.

O termo transgênico refere-se a animais ou plantas nos quais um novo segmento de DNA tenha sido incorporado nas células germinativas. Com a tecnologia do DNA recombinante, pesquisadores puderam inserir genes estranhos (transgenes ou heterólogos) nas células embrionárias murinas, resultando, assim, na criação de camundongos transgênicos. Veja na **Figura 4.6** um esquema simplificado de uma metodologia utilizada para a produção de camundongos transgênicos.

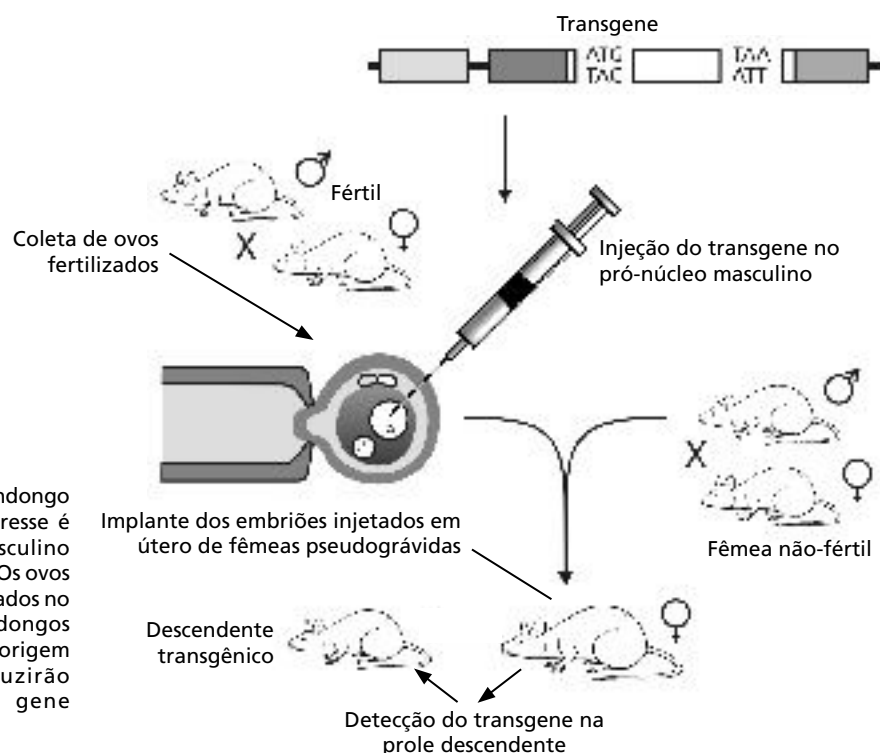


Figura 4.6: Produção de camundongo transgênico. O gene de interesse é injetado no pró-núcleo masculino de ovos murinos fertilizados. Os ovos injetados são, então, implantados no útero de fêmeas de camundongos pseudográvidas, que darão origem a descendentes que produzirão proteína codificada pelo gene heterólogo.

O gene de interesse (transgene) associado aos elementos necessários para a sua expressão é injetado no pró-núcleo masculino de ovos murinos fertilizados. Dentre estes elementos, o promotor que pode ser induzido, ou não, terá um papel importante na definição se o transgene for expresso em todo o organismo animal, ou venha a ter expressão específica em um determinado órgão. Por exemplo, se um transgene utiliza o promotor da insulina, ele será expresso somente no pâncreas, órgão onde é produzida a insulina. As células germinativas injetadas com o gene serão, então, transplantadas para camundongos fêmeas pseudográvidas, que irão gestar os embriões. O transgene que se integrar de maneira estável no material genético das células germinativas será passado para os animais descendentes, obedecendo às leis mendelianas de segregação gênica.

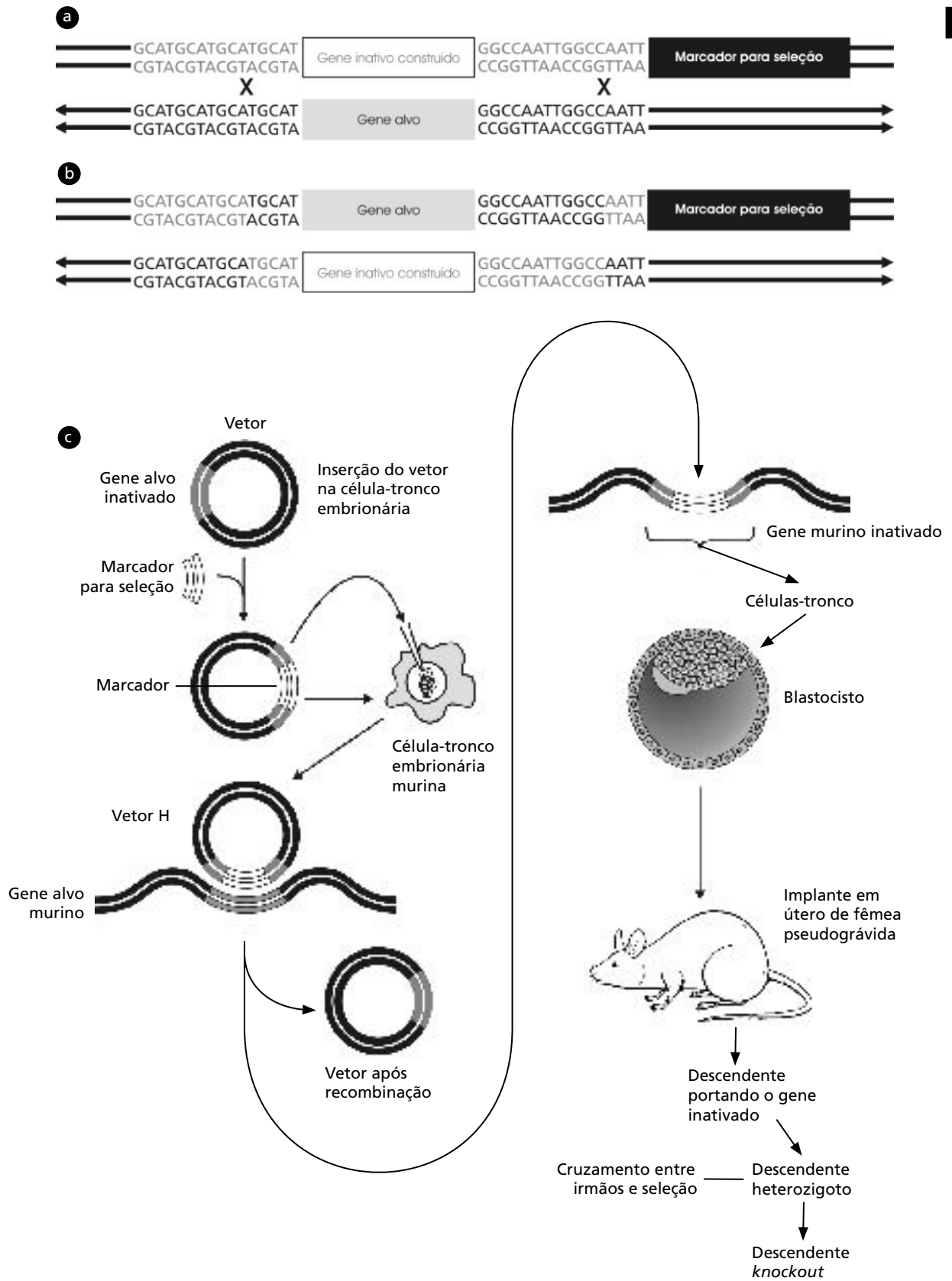
Ao contrário dos animais transgênicos em que um gene heterólogo é expresso, nos camundongos *knockouts* um gene endógeno é suprimido, ou seja, a expressão de um determinado gene é inibida. O termo *knockout* vem do inglês e significa nocaute. Obviamente, é impossível nocautear um gene, mas na Engenharia Genética esta palavra foi empregada no sentido de que um dado gene tenha sido alvejado ou silenciado. Neste caso, este modelo experimental é empregado principalmente para pesquisa da função e regulação de genes, receptores e ligantes, que participam da resposta imune. Porém, ao contrário dos transgênicos que têm a expressão do transgene aumentado, neste modelo a função dos genes é avaliada pela sua ausência, ou seja, o animal *knockout* não expressará o produto codificado pelo gene nocauteado.

Vamos descrever resumidamente a produção de um camundongo *knockout* pelo método da recombinação homóloga. Para iniciar o processo, o gene alvo deve ser clonado e a sua sequência já conhecida, conforme você pode ver na **Figura 4.7.a**. Na base da sequência do gene conhecido (cinza) é construído um outro gene (preto), porém de maneira que ele não seja funcional, isto é, não possa ser transcrito. Além disso, este gene inativo deve conter, nas duas extremidades, sequências idênticas às que margeiam o gene-alvo no seu loco, onde ocorrerá a recombinação homóloga (se você tiver alguma dúvida sobre este assunto, reveja a Aula 15 da disciplina Biologia Molecular). Veja na **Figura 4.7.b** como acontece a recombinação homóloga, mas atente para o fato de a recombinação homóloga só acontecer dentro da célula-tronco embrionária transfectada com o vetor contendo o gene inativado! Observe, na **Figura 4.7.c**, que

as células tronco-embrionárias são transfectadas com o vetor contendo o gene inativado. Veja agora, no interior da célula, como ocorre a substituição do gene normal da célula pelo gene defeutivo carregado pelo vetor (recombinação homóloga). As células que sofreram recombinação homóloga são selecionadas e injetadas no blastocisto que, por sua vez, é implantado no útero de fêmea pseudográvida. Esta fêmea irá gestar o embrião, dando origem a um descendente heterozigoto para o gene inativado. Este camundongo, ao ser acasalado com um animal da linhagem parental, irá produzir descendentes heterozigotos que, acasalados entre si, vão originar animais homozigotos para o gene nocauteado, ou seja, estes animais não expressarão no seu organismo a proteína codificada pelo gene nocauteado. Vamos ver um exemplo de como a função de uma molécula pode ser estudada com a sua ausência? No início da década de 1990, foi desenvolvido um camundongo *knockout* para a molécula CD4 pelo método da recombinação homóloga. Até esta época, a função da célula CD4 era inferida por métodos indiretos como, por exemplo, transferência adotiva. Esse camundongo deficiente da molécula CD4 demonstrou, inequivocamente que as células CD4 são fundamentais para a produção de anticorpos contra antígenos que dependem da função auxiliadora das células CD4, ou seja, eles não conseguiam produzir anticorpos em níveis elevados contra a maioria dos antígenos.

O *site* <http://www.bioscience.org/knockout/alphabet.htm> apresenta uma lista de genes e os respectivos camundongos nos quais eles foram nocauteados. Este *site* é em inglês, mas faça um esforço que você vai entender como a função de uma proteína codificada por um gene pode ser estudada pela sua ausência.

Você viu nesta aula que os métodos experimentais estão cada vez mais sofisticados e envolvem várias áreas do conhecimento. Apesar de direcionarmos a aplicação destas metodologias para a área de Imunologia, gostaríamos de esclarecer que estas técnicas são aplicadas em várias áreas da Ciência. Portanto, para que você possa acompanhar o desenvolvimento científico, esteja sempre conectado às novas tecnologias.



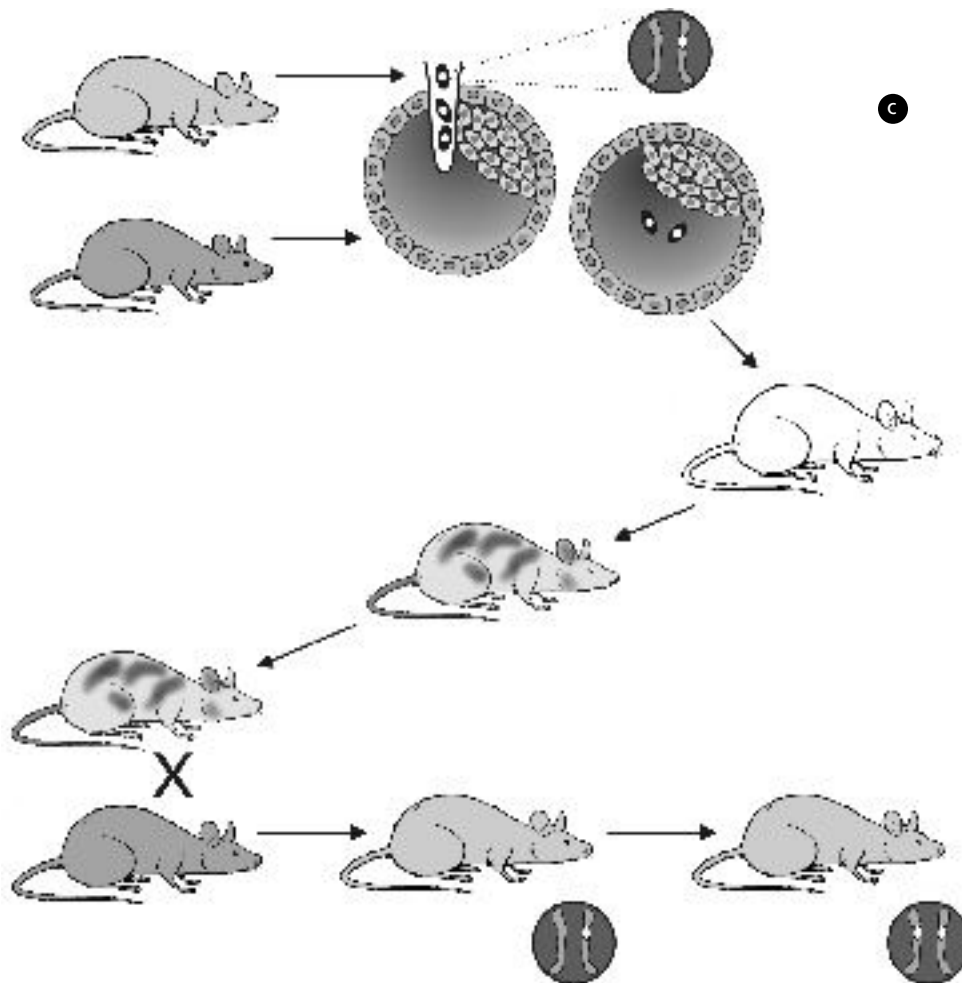


Figura 4.7: Esquema simplificado da produção de camundongo *knockout*. (a) Em preto, o gene normal; em cinza, o gene modificado para que não seja funcional; observe que as seqüências que margeiam os dois genes são idênticas. (b) Recombinação homóloga dos genes. Veja que o gene normal foi substituído pelo gene inativado. (c) O vetor contendo o gene inativado é transfectado para a célula-tronco embrionária, onde vai ocorrer a recombinação homóloga. As células que tiveram o seu gene normal substituído pelo gene inativado são injetadas no blastocisto e transferidas para o útero de fêmea pseudográvida. O camundongo descendente será portador heterozigoto do gene inativado. Este camundongo, ao ser acasalado com um animal da linhagem parental, vai dar origem a animais heterozigotos que, ao serem acasalados entre si, darão origem a animais homozigotos para o gene nocauteado.

ATIVIDADE FINAL

Um pesquisador, ao realizar experimentos com linfócitos de camundongos, isolou uma molécula protéica a partir do sobrenadante das culturas destas células e a denominou interleucina M. Embora sua função não possa ser claramente estabelecida, o pesquisador conseguiu clonar e seqüenciar o gene da interleucina M. Com base nesta aula, proponha um ensaio para esclarecer a função da interleucina M.

RESPOSTA COMENTADA

Você propôs que o pesquisador produzisse camundongos knockouts para a interleucina M, conforme já descrevemos, e imunizasse grupos de camundongos knockouts com diferentes antígenos e os comparasse com camundongos normais. Se percebeu que a diferença de resposta entre os camundongos deficientes de interleucina M e os normais é atribuída à função dessa molécula, você acertou! Parabéns! Entretanto, se você não respondeu dessa forma, não significa que você tenha errado, pois esta atividade tem várias respostas. Portanto, se tiver dúvidas, não deixe de falar com os tutores ou mandar um e-mail para nós com a sua resposta.

RESUMO

Os sistemas experimentais são de importância fundamental no desenvolvimento do conhecimento na área de Imunologia. Eles podem ser divididos em sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro*. Os sistemas *in vivo* são baseados em modelos animais, que dão uma idéia geral de como um determinado tratamento se comporta em um organismo animal.

Os animais experimentais mais utilizados são os camundongos, principalmente as linhagens isogênicas, e pode ser normal apresentarem defeitos congênitos ou serem geneticamente modificados.

Os sistemas experimentais *in vitro* se caracterizam principalmente pela manutenção de cultivos celulares em laboratórios. Estas culturas podem ser de células normais ou transformadas, que podem ser cultivadas por tempo indefinido.

A tecnologia do DNA recombinante trouxe grandes avanços aos sistemas experimentais, permitindo que genes fossem expressos ou silenciados tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, resultando em modelos experimentais bastante sofisticados que podem responder a vários questionamentos acerca de funções e regulação de genes ou moléculas que interferem no sistema imune.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, vamos falar sobre anticorpos, suas características físico-químicas e funções. Esta glicoproteína, que tem uma grande aplicação em pesquisas básica e aplicada é, também, bastante utilizada como terapia. Você já leu sobre esta molécula nas nossas aulas anteriores e também de outras disciplinas. Vamos, então, nos preparar para conhecer melhor o anticorpo? Até a próxima aula!

Inflamação e tráfego de leucócitos: princípios gerais

AULA 5

Meta da aula

Apresentar o princípio geral da inflamação e as propriedades gerais do tráfego de leucócitos.

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Listar os principais elementos celulares e moleculares (mediadores) envolvidos na inflamação e no tráfego de leucócitos.
- Distinguir entre os efeitos da inflamação localizada e sistêmica.
- Distinguir entre inflamação aguda e crônica.
- Exemplificar situações de inflamação, descrevendo a atuação dos elementos celulares e moleculares que medeiam a reação inflamatória.

Pré-requisitos

Para melhor acompanhar esta aula, você precisa ter estudado as Aulas 1, 2, e 3 de Imunologia, as Aulas 7 e 8 (Matriz Extracelular) da disciplina Biologia Celular II, e as Aulas 1 e 2 da disciplina Corpo Humano II.

INTRODUÇÃO

Quem de nós, mesmo não tendo estudado Imunologia, não sabe o que é inflamação? Com certeza, todos sabemos. Os sinais principais da inflamação foram reconhecidos e descritos por Cornelius Celsus que viveu há mais de dois mil anos (25a.C. – 40d.C.). Naquela época, ele descreveu os sinais cardinais (isto é, principais) da inflamação como sendo *tumor*, *rubor*, *calor* e *dolor*. Estas palavras em latim são muito próximas/idênticas ao português e dizem respeito ao que sentimos e vemos no local da inflamação, ou seja:

1. endurecimento/inchaço (*tumor*) que detectamos pela palpação;
2. vermelhidão (*rubor*) que observamos em torno da área inflamada;
3. sensação de aumento da temperatura (*calor*) que sentimos no local da inflamação;
4. dor (*dolor*) localizada que sentimos no tecido inflamado.

Estes sinais são também por nós reconhecidos como os principais para a identificação da inflamação (também chamada reação inflamatória) e a eles se soma mais um, que é a “perda de função”. A perda de função diz respeito ao fato de que o tecido inflamado não irá exercer suas funções normais até que cesse a inflamação. Em alguns casos, a inflamação pode resultar na perda irreversível da função de um tecido ou órgão. Como acontece, por exemplo, em casos de hepatites (inflamações do fígado) as quais podem ser de origem infecciosa ou não. Alguns tipos de hepatites infecciosas, como a hepatite B (causada pelo vírus HBV), por exemplo, podem danificar o fígado a ponto de ser necessário um transplante. A perda de função se dá em decorrência da infecção viral e da reação inflamatória em resposta a esta infecção. A hepatite B é uma doença com altas taxas de prevalência no mundo todo e estima-se que cerca de 10% daqueles que a contraem poderão evoluir para um quadro clínico grave que demandará transplante.

Observe que Cornelius Celsus descreveu os sinais cardinais da inflamação muito anteriormente ao nascimento da Imunologia como Ciência conforme vimos na Aula 1. Isto ocorreu também antes do que William Harvey (por volta de 1616) descobrisse os princípios físicos que regem a circulação sanguínea e antes do descobrimento das células, o que ocorreu no século XVII, conforme você pode rever na Aula 1 do Volume 1 do livro de Biologia Celular I.



Se você quiser saber mais sobre aspectos epidemiológicos e de tratamento da hepatite B, acesse o site: http://www.aids.gov.br/assistencia/guia_trat_crianca.htm. Você pode visitar, também, o Portal da Saúde do Ministério da Saúde, www.saude.gov.br, para saber mais sobre as políticas de saúde em nosso país.

CONHECENDO COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E NO TRÁFEGO DE LEUCÓCITOS

A *inflamação*, ou *reação inflamatória*, ou ainda *resposta inflamatória* se constitui em um fenômeno biológico complexo (sofisticado) que envolve diferentes tipos de células e moléculas, conforme veremos a seguir. O estabelecimento da reação inflamatória é condição primordial para o estabelecimento da imunidade inata ou adaptativa. Lembra-se das Atividades 1 e 2 da segunda aula de Imunologia? Aquelas atividades ilustram o fato de que a reação inflamatória marca o início da resposta imune inata e da resposta adaptativa.

O propósito final da inflamação é de reparo do tecido danificado por trauma e/ou por infecção. O **TRÁFEGO DE LEUCÓCITOS**, e os mediadores plasmáticos envolvidos no processo de reparo tecidual são fundamentais na reação inflamatória, bem como outros mediadores, tais como:

- alguns tipos de citocinas (sobre as quais vimos um pouco na Aula 3), dentre elas as **QUIMIOCIAS**,
- os **NEUROPEPTÍDEOS**,
- os mediadores lipídicos de inflamação.

No entanto, é válido lembrar que “nem tudo são flores” e a reação inflamatória pode levar a prejuízos ao organismo ao invés de soluções. Mas, estes casos são a minoria num conjunto que, na maioria das vezes, dá certo! Se assim não fosse, você não estaria aqui agora estudando imunologia, pois certamente já experimentou alguma reação inflamatória, e com certeza “se viu livre” dela.

A reação inflamatória, por mais bem-sucedida que seja, causa um pouco de destruição tecidual, às vezes com a marca de uma cicatriz, mas nem sempre. O dano tecidual, mesmo que mínimo, é ocasionado pela liberação de compostos presentes em fagócitos (neutrófilos e macrófagos) que, durante a inflamação, são destruídos e liberam conteúdos intracitoplasmáticos como as enzimas lisossomais, radicais livres de oxigênio e óxido nítrico.

Vamos lá, esquite seus neurônios! Virão aí novos nomes e conceitos e algumas siglas, que serão cada vez mais comuns em nossas aulas. Após esta aula nunca mais você terá uma reação inflamatória sem deixar de pensar nas interações celulares e moleculares que lá estarão acontecendo, temos certeza! Aquele aaaaaaiiiiiii que você grita quando espeta o dedo nunca mais será uma exclamação “inocente”!

O TRÁFEGO DE LEUCÓCITOS

(linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) consiste no movimento destas células entre o sangue, a linfa e os diferentes tecidos nos quais os mesmos se interagem com componentes da *matriz extracelular*.

O tráfego de leucócitos é condição fundamental para o estabelecimento da reação inflamatória e a partir da mesma o estabelecimento da resposta imune inata e/ou adaptativa.

Os NEUROPEPTÍDEOS

são peptídeos liberados por neurônios e atuam naquelas células como mensageiros intracelulares. No entanto, muitos neuropeptídeos são também produzidos por outras células não nervosas que os secretam, e os mesmos atuam como hormônios. Um exemplo de neuropeptídeo, que também é um hormônio, é o glucagon. O glucagon é produzido no pâncreas sendo importante na regulação da concentração de glicose no sangue.

As **QUIMIOCINAS** são um tipo (classe) de citocinas que foram assim nomeadas pela contração dos termos “citocinas” e “quimiotaxia”. A *quimiotaxia* é o nome genérico que se dá ao movimento celular causado por moléculas que atuam sobre estas células. As quimiocinas formam uma família de citocinas estruturalmente homólogas. São pequenos polipeptídeos contendo cerca de 70 a 80 resíduos de aminoácidos, com quatro resíduos de cisteínas (C) conservados, formando duas alças internas com pontes dissulfeto. Duas grandes subfamílias existem em função da distância dos resíduos de cisteínas: a subfamília C-C, cujos resíduos de cisteína são contíguos e a subfamília CXC, cujos resíduos estão separados por um outro aminoácido qualquer representado como (X). As quimiocinas estimulam o movimento (quimiotaxia) dos leucócitos (os quais têm nas suas membranas receptores para estas moléculas). Essas moléculas participam da regulação e da migração dos leucócitos, os quais vão na direção do gradiente de concentração de quimiocinas. Os receptores das quimiocinas são também classificados em famílias. São do tipo serpentinóides (com sete voltas na membrana) e se acoplam à proteína G.

Mas antes vamos analisar a **Figura 5.1**. Esta figura representa, em (a), um leucócito (neutrófilo) que circula dentro de um vaso sanguíneo, mostrando os passos que ocorrem desde o momento em que o neutrófilo “rola” sobre o endotélio (etapa 1) passando pela etapa 2 em que o neutrófilo é ativado e, a partir desta ativação, evolui para a etapa 3 onde o neutrófilo adere ao endotélio, para então, na etapa 4, atravessar o endotélio e ganhar o tecido. Em (b) podemos observar em detalhes algumas das interações moleculares que se passam nas várias etapas. Não se preocupe agora, pois ao final desta aula você compreenderá completamente a parte (b) desta figura.

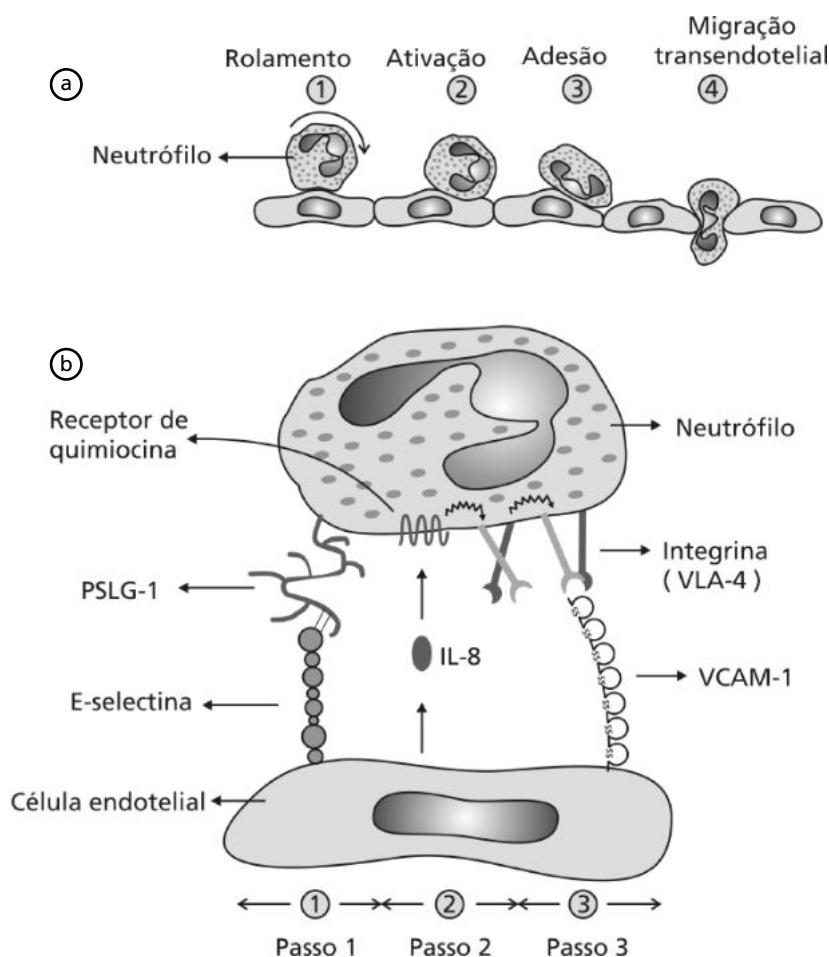


Figura 5.1: Etapas sequenciais do extravasamento de um leucócito (a) e moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio vascular (b).

Um grupo de moléculas chamadas coletivamente Moléculas de Adesão Celular (do inglês *Cell Adhesion Molecules* – CAMs) controlam o tráfego dos leucócitos. As CAMs são expressas na superfície de células sangüíneas bem como no endotélio dos vasos e nos tecidos. A maioria das CAMs pertence a três grupos de proteínas conforme você pode ver nos Quadros 5.1 e 5.2. Na passagem das células pelos vasos até os tecidos ocorrem interações entre moléculas na superfície destas células e dos vasos. Veja como isto acontece olhando novamente a Figura 5.1.



Durante a inflamação e no tráfego de leucócitos, as células interagem com componentes da Matriz Extracelular (MEC) de maneira dinâmica. Assim, as interações entre as moléculas de adesão (CAMs) na superfície das células, com as proteínas de adesão (laminina, fibronectina) e proteínas estruturais da MEC (por exemplo, vários tipos de colágenos) se dão através de aumento e diminuição da força de ligação, de modo a permitir o movimento dinâmico (o “caminhar”) das células sobre e em meio a matriz. Citocinas, neuropeptídeos, mediadores lipídicos e plasmáticos de inflamação podem influenciar aumentando e diminuindo a força de ligação entre as CAMs das células e os componentes da MEC.



Os mediadores lipídicos da inflamação são derivados de fosfolipídeos de membranas que se rompem durante os processos inflamatórios. Veremos, em maiores detalhes, ainda nesta aula.

Quadro 5.1: Características estruturais dos três principais grupos de moléculas de adesão (*Cell Adhesion Molecules* – CAMs) envolvidas na migração de leucócitos.

Categoria/grupo das moléculas de adesão (CAMs)	Características estruturais
Família das Selectinas	As selectinas são glicoproteínas, na sua estrutura têm um domínio distal que reconhece grupos específicos de carboidratos. Por esta razão este domínio distal é chamado domínio lectina-símile, isto é, similar às <i>lectinas</i> que são proteínas que reconhecem carboidratos. As estruturas glicosiladas reconhecidas em geral são ricas em <i>ácido siálico</i> (Figura 5.2).
Família das Integrinas	As integrinas são proteínas heterodiméricas que contêm duas subunidades, uma α e uma β . Uma determinada integrina é agrupada como pertencendo a uma dada categoria de acordo com o tipo de subunidades β que a mesma apresenta.
Superfamília das Imunoglobulinas	As moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas apresentam domínio(s) estrutural(is) composto(s) cada um por cerca de 110 resíduos de aminoácidos que se dobram independentemente em um “domínio globular”. Os anticorpos também pertencem a esta superfamília conforme você verá na próxima aula. Veja a Figura 5.3. Ela mostra o desenho esquemático de vários “domínios globulares” em diferentes proteínas desta superfamília. Ter um domínio globular é a condição primordial para que uma molécula pertença à superfamília das imunoglobulinas.



O termo ácido siálico designa a família de monossacarídeos (carboidratos) de 9 carbonos cuja estrutura geral está mostrada na **Figura 5.2**. Em humanos, o ácido N-X acetilneuramínico é a forma mais ocorrente deste tipo de carboidrato. Na superfície de nossas células, o ácido siálico aparece como o resíduo terminal de açúcar ligado a um outro carboidrato, por meio de ligação glicosídica, o qual pode ser a galactose ou N-acetil galactose.

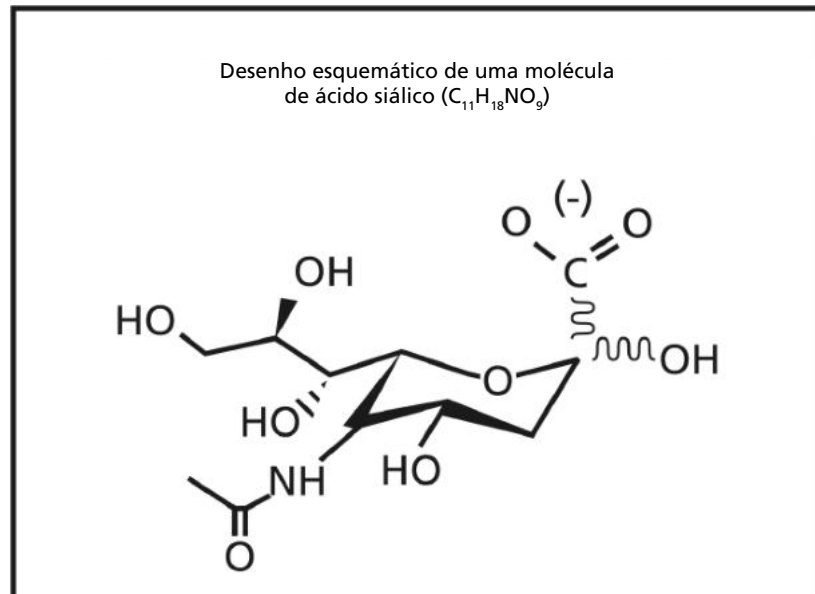


Figura 5.2: Estrutura de uma molécula de ácido siálico.

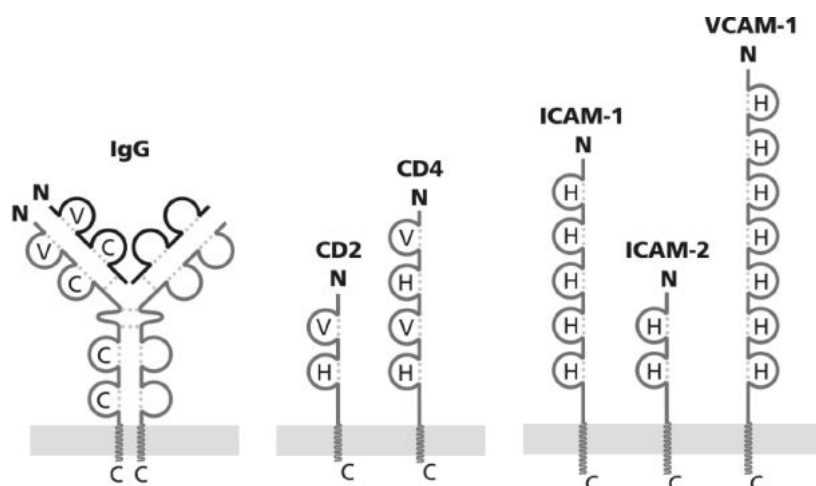


Figura 5.3: Exemplos de moléculas da superfamília das imunoglobulinas.

Quadro 5.2: Exemplos de interações entre CAMs envolvidas no extravasamento de leucócitos.

CAMs na superfície dos leucócitos	Tipo celular	CAMs no endotélio vascular ou em componentes de matriz extracelular	Tipo de interação molecular	Principal função
L-selectina alternativamente conhecida por CD62-(Família das Selectinas)	Presente na maioria dos leucócitos circulantes	CD34 presente no endotélio	Reconhecimento pela L-selectina de carboidratos conjugados ao ácido siálico presente em CD34	Interação envolvida na recirculação de linfócitos, através de vênulas de endotélio alto (HEV) e na migração dessas células para tecidos inflamados
PSGL-1 (<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>)	Presente em neutrófilos	E-Selectina (<i>Endothelial Selectin</i>) e P-selectina (<i>Platelet- Selectin</i>) alternativamente denominadas CD62-E e CD62-P, respectivamente. (Família das Selectinas)	Reconhecimento pelas E e P-selectinas de carboidratos conjugados ao ácido siálico em PSGL-1	Migração de neutrófilos para tecidos inflamados
VLA-4 (<i>Very Late activated Antigen-4</i>) constituída pelo heterodímero $\alpha 4\beta 1$. A cadeia $\alpha 4$ é o CD49d e a cadeia $\beta 1$ é o CD 29 na nomenclatura CD vista na Aula 2. (Família das Integrinas)	Presente em neutrófilos células T monócitos	VCAM-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>) (Superfamília das Imunoglobulinas) O componente da matriz extracelular fibronectina	Interações entre as cadeias alfa e beta da integrina (VLA-4) com domínios globulares da VCAM-1 Interação entre as cadeias alfa e beta da integrina (VLA-4) com a sequência de aminoácidos arginina, glicina e asparagina e serina conhecida como sequência RGDS), presente na fibronectina	Migração de leucócitos para tecidos inflamados

O Quadro 5.2 é ilustrativo e mostra, de maneira simplificada, exemplos de interações entre as famílias de moléculas de adesão (CAMs) do Quadro 5.1. Existem muitas moléculas de adesão que não estão aqui relatadas, mas que você pode encontrar nos livros-texto e em artigos científicos. Em geral, as moléculas da família das integrinas se ligam a moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, e/ou a componentes de matriz extracelular. As moléculas da família das selectinas se ligam a proteoglicanas e glicoproteínas contendo ácido siálico. Tanto as selectinas quanto as proteoglicanas e glicoproteínas são expressas nos leucócitos e no endotélio. No entanto, as integrinas são expressas apenas nos

leucócitos, e as moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas são expressas somente no endotélio.

Os mediadores envolvidos no processo de reparo tecidual são ativados durante qualquer reação inflamatória, seja ela de menor ou maior importância. Veja o **Quadro 5.3**. Ele resume a atuação dos quatro sistemas envolvidos no processo de reparo tecidual. Eles constituem-se em sistemas de “*cascatas proteolíticas*”, isto é, em uma seqüência de produtos (proteínas/peptídeos) formados a partir da ação de enzimas que preexistem no plasma como zimogênio (forma inativa de uma enzima) mas que são ativadas durante a inflamação.

! O plasma contém mediadores (moléculas) que estão envolvidos no processo de reparo tecidual. Estes mediadores, genericamente chamados *mediadores plasmáticos da inflamação*, são provenientes de quatro sistemas que se interconectam, sendo eles: o Sistema das Cininas-Caliceínas, o Sistema de Coagulação Sangüínea, o Sistema Fibrinolítico e o Sistema Complemento. Os três primeiros sistemas compartilham um mediador intermediário (comum aos três) conforme você pode ver na **Figura 5.4**.

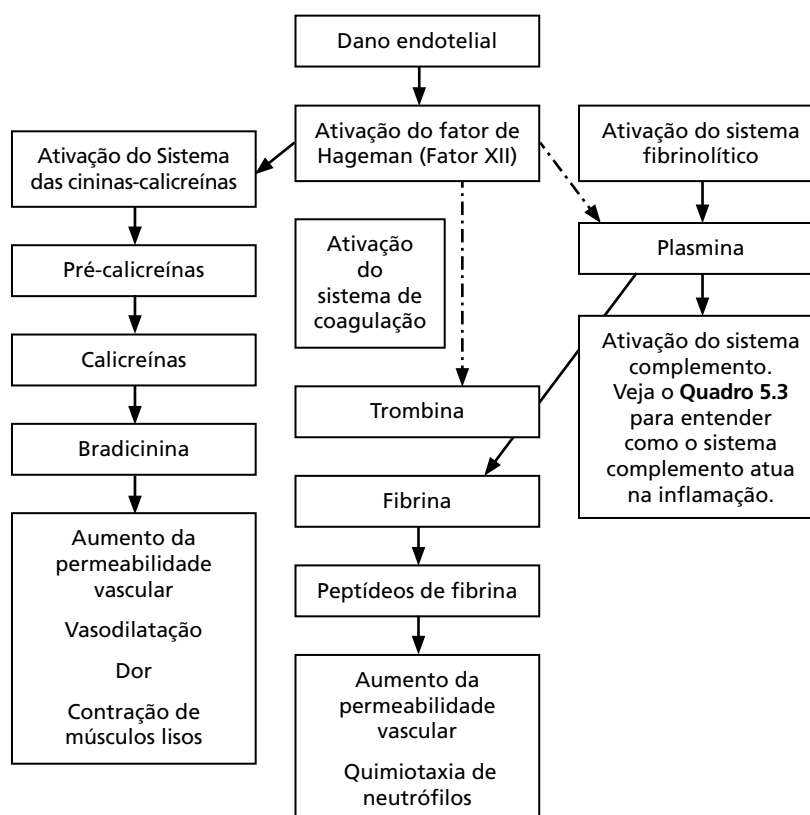


Figura 5.4: Esquema da geração de mediadores plasmáticos da inflamação.

Vamos lá. A **Figura 5.4** está aí para lhe ajudar a compreender como, na resposta inflamatória, os quatro sistemas plasmáticos de reparo tecidual interagem promovendo a inflamação. Veja, ao ocorrer dano endotelial (do endotélio dos vasos) por injúria infecciosa e/ou não infecciosa, o Fator de Hageman é ativado, como você verá na disciplina Corpo Humano. A partir de sua ativação, três sistemas, isto é, o das cininas-caliceínas, o da coagulação e o sistema fibrinolítico são ativados. A ativação dos três sistemas irá resultar na formação de bradicinina e de peptídeos de fibrina. Tanto a bradicinina, que é um *neuropeptídeo* (ver **Quadro 5.3**) quanto os peptídeos de fibrina atuarão diretamente promovendo a inflamação. Observe a **Figura 5.4** para que você compreenda como a bradicinina atua promovendo a inflamação. O sistema complemento também será ativado a partir do dano endotelial. Observando também a **Figura 5.4** você compreenderá como o sistema complemento se integra ao conjunto dos mediadores plasmáticos da inflamação. Veja que a plasmina atuará ativando o sistema complemento. O envolvimento do sistema complemento na resposta inflamatória você poderá entender lendo o **Quadro 5.3**. Confira!

Quadro 5.3: Ações dos sistemas plasmáticos de reparo tecidual e geração de mediadores plasmáticos da inflamação.

Sistema de coagulação	Este sistema consiste em uma cascata enzimática que é disparada quando ocorre dano (injúria) endotelial e/ou tecidual, levando à formação do Fator de Hageman (ou Fator XII). A partir do Fator de Hageman, uma sequência de reações culminará na formação da trombina, que é uma proteína que atuará sobre o fibrinogênio (proteína que é solúvel nos fluidos teciduais e no plasma), transformando-o em fibrina ou peptídeos de fibrina (ambos insolúveis) que constituirão o coágulo. O coágulo serve como barreira contra o extravasamento de sangue e contra o espalhamento de agentes infecciosos.
Sistema das caliceínas-cininas	Este sistema participa no controle da função renal e da pressão sangüínea. No processo de reparo tecidual, a cascata de reações envolvendo o sistema das caliceínas-cininas se inicia quando o Fator de Hageman é formado e passa a atuar sobre as pré-caliceínas (presentes no plasma e fluidos teciduais) formando as caliceínas, que são enzimas que atuarão sobre cininogênios (peptídeos presentes nos fluidos corporais) para formar a <i>bradicinina</i> que é um neuropeptídeo de 9 aminoácidos (nonapeptídeo), envolvido na regulação da pressão sangüínea e da estimulação de receptores de dor. A bradicinina atua como mediador inflamatório aumentando a permeabilidade vascular e a contração de músculos lisos. As caliceínas atuam sobre uma das proteínas do Sistema Complemento, a C5, gerando um mediador inflamatório denominado C5a (veja a seguir neste quadro e no boxe de atenção).

Sistema fibrinolítico	O sistema fibrinolítico consiste em uma cascata enzimática que vai atuar na remoção de fibrina do tecido injuriado. O produto final da cascata enzimática é a enzima plasmina (fibrinolisin) que se forma a partir do plasminogênio presente no plasma. A plasmina irá atuar sobre a fibrina clivando-a em peptídeos de fibrina (fibrinopeptídeos). Atuam como mediadores inflamatórios, pois aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos e atraem neutrófilos para o local do tecido injuriado.
Sistema complemento	As proteínas e glicoproteínas que compõem o sistema complemento são numerosas (próximo de 30 proteínas) e estão solúveis no soro ou presentes na superfície de membranas celulares conforme veremos na Aula 7. O sistema complemento também consiste em uma cascata enzimática. Algumas proteínas do sistema estão enumeradas de C1 a C9 ("C" de complemento); algumas são zimogênios que, quando ativados, irão atuar como enzimas sobre uma série de outras proteínas do sistema, gerando mediadores inflamatórios como o C5a, por exemplo, que resulta da clivagem enzimática do C5. O C5a assim como outros produtos de clivagem enzimática denominados C3a, C3b, C3c, C4, C4a, C5b67, Bb (que veremos na Aula 7) participam como mediadores de inflamação. Alguns deles estão envolvidos em mecanismos que levam ao extravasamento e/ou tráfego de leucócitos para o local inflamado. Alguns atuam promovendo a liberação de conteúdos de grânulos (contendo também moléculas que atuam como mediadores inflamatórios) de mastócitos e basófilos e eosinófilos. A <i>histamina</i> é um destes mediadores que, liberada dos grânulos dos mastócitos, irá induzir a contração das células endoteliais causando aumento da permeabilidade vascular.



Algumas moléculas que atuam como mediadores inflamatórios foram descobertas por brasileiros no Brasil ou tiveram a participação de brasileiros trabalhando no exterior. A bradixinina foi descoberta por dois brasileiros, os cientistas Maurício Rocha e Silva e Wilson Teixeira Beraldo, trabalhando no Instituto Biológico, em SP, em 1949. Não deixe de ver esta interessante história acessando: <http://inventabrasilnet.t5.com.br/hiper.htm>. A descoberta do C5a teve a participação do brasileiro Professor Wilmar Dias da Silva, trabalhando em colaboração com o pesquisador americano Irwin H. Lepow em Cleveland, nos Estados Unidos, e está registrada em publicação com data de 1967.

Os **MEDIADORES LIPÍDICOS DE INFLAMAÇÃO** consistem em um grupo de moléculas que são formadas a partir da degradação de fosfolipídeos de membranas (em decorrência de destruição celular que ocorre nos processos inflamatórios) pela ação de enzimas do grupo das fosfolipases. Pela ação das fosfolipases sobre os fosfolipídeos, teremos a formação do ácido aracdônico (também chamado ácido eicosatetraenóico, que dará origem às *prostaglandinas* e *leucotrienos*) e de um fator chamado Lyso-PAF (que dará origem ao fator ativador de plaquetas PAF, do inglês *Platelet-Activating Factor*) conforme mostrado na **Figura 5.5**. Você poderá rever a composição lipídica das membranas plasmáticas na Aula 7 da disciplina Biologia Celular I.

Os **MEDIADORES LIPÍDICOS DA INFLAMAÇÃO** são formados durante a reação inflamatória em decorrência de destruição celular. Veja na **Figura 5.5**. Ela está aí para lhe ajudar e não para complicar seu entendimento. Vamos compreender esta figura. Veja, a partir de um tipo de substrato comum (fosfolipídeos de membranas), pela ação de uma classe de enzimas que os degradam (as fosfolipases), teremos a formação de dois tipos de precursores (ácido aracdônico e Lyso-PAF). A partir de ambos, teremos a formação dos mediadores lipídicos propriamente ditos que são as prostaglandinas, os leucotrienos e o PAF. As prostaglandinas, as tromboxanas e os leucotrienos estão no plural porque cada qual agrupa mais de uma molécula em seu grupo e com atividades similares mas não iguais, algumas sendo mesmo diferentes, mas que, agora, não vem ao caso detalhar. Seus nomes são designados por letras e números. Assim temos a tromboxana B₂, as prostaglandinas PGE₂, PGF₂, PGD₂, os leucotrienos LTC₄, LTD₄, LTE₄, LTB₄. Olhe para a última linha da **Figura 5.5**.

As ações resultantes da atuação das prostaglandinas tromboxanas, leucotrienos e PAF se somam promovendo a inflamação. Assim, todos, em conjunto, contribuem para a promoção da reação inflamatória! Não se preocupe em gravar os nomes que aparecem na figura indicando as reações intermediárias entre o ácido aracdônico e os mediadores lipídicos resultantes (prostaglandinas e leucotrienos). Eles estão na figura para que você possa entender como são formados. Retornaremos a eles quando estivermos falando de alergias em uma aula futura.

Talvez você esteja se perguntando de onde vem o nome Lyso-PAF! A razão é que o composto que originou a sua descoberta tem o nome: *Lysoethanolamine plasmologen*, daí o “Lyso” de Lyso-PAF! Se você é um estudante “ligado” em estruturas químicas poderá ter acesso livre ao primeiro artigo que descreveu o Lyso-PAF acessando o site: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6938950. Você vai ver que o PAF foi descoberto na década de 1970, enquanto o Lyso-PAF que, conforme você pode ver na Figura 5.5, dá origem ao PAF, foi descoberto na década de 1980, isto é, bem depois! Pois é, fatos como este são comuns em Imunologia que, como você já sabe, é investigada através da experimentação.

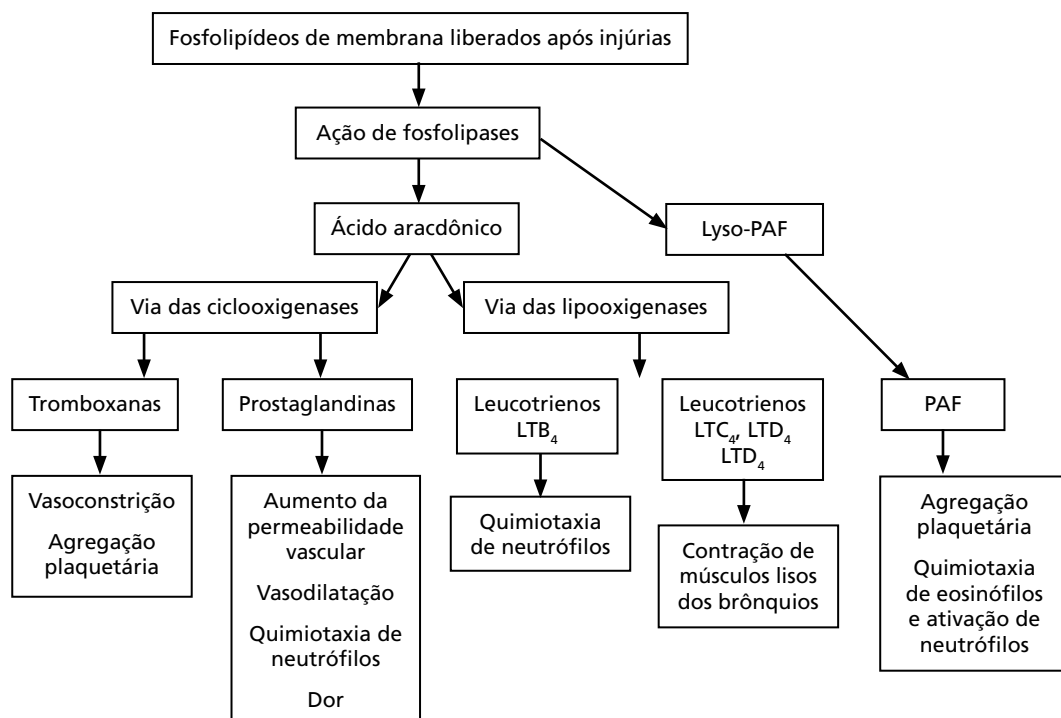


Figura 5.5: Esquema dos mediadores lipídicos da inflamação.

ATIVIDADE



1. Preencha todas as lacunas, do quadro a seguir, para melhor assimilar os novos conceitos apresentados.

Natureza química do mediador inflamatório	Característica e/ou ação do mediador inflamatório	Nome/Tipo/classe do mediador inflamatório
Polipeptídeos que possuem quatro resíduos de cisteína conservados		Quimiocinas
	Se ligam a moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, e/ou a componentes de matriz extracelular. São expressas apenas nos leucócitos	
Glicoproteínas, que na sua estrutura têm um domínio distal que reconhece grupos específicos de carboidratos	São expressas tanto nos leucócitos quanto no endotélio	
Moléculas de adesão da que apresentam domínio(s) estrutural(is) composto(s) cada um por cerca de 110 resíduos de aminoácidos que se dobram independentemente em um "domínio globular"	São expressas somente no endotélio	
Ácido graxo	Promove agregação plaquetária, quimotaxia de eosinófilos e ativação de neutrófilos	
Neuropeptídeo	Promove o aumento da permeabilidade vascular, a vasodilatação, estimula receptores de dor e a contração de músculos lisos	
		Prostaglandinas

Ácido graxo	Derivado do ácido aracdônico, pela via das lipoxigenases, promove a quimiotaxia de neutrófilos	
	Promove o aumento da permeabilidade vascular, estimula a quimiotaxia de neutrófilos. A atuação da plasmina sobre a fibrina gera estes mediadores	

RESPOSTA COMENTADA

A resposta correta segue a seguinte ordem na coluna da esquerda:

1) Proteínas heterodiméricas que contêm duas subunidades uma α e uma β ; 2) Ácido Graxo; 3) Peptídeos; na coluna do meio:

1) Fator quimiotático que atua atraindo leucócitos para o local da inflamação; 2) Promove aumento da permeabilidade vascular, a vasodilatação, a quimiotaxia de neutrófilos; na coluna da direita:

1) Integrinas; 2) Selectinas; 3) Superfamília das Imunoglobulinas; 4) PAF; 5) Bradicinina; 6) Leucotrienos B₄; 7) Peptídeos de fibrina.

Você acertou? Se você ainda está confuso, releia os conceitos e procure memorizá-los. Tente de novo até acertar tudo!

A RESPOSTA INFLAMATÓRIA: PRINCÍPIO E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Agora você já está familiarizado com as células e *algumas* das moléculas envolvidas na inflamação (isto mesmo, algumas!) Aqui, as descrevemos de forma simplificada. Entretanto, sem deixar de lhe informar conteúdos importantes, para que você aprimore seus conhecimentos sobre o assunto em livros-texto de Imunologia, podemos falar sobre o seu princípio geral e os eventos iniciais que se passam na reação inflamatória.

A inflamação é o processo fisiológico em resposta à injúria (infecciosa ou não infecciosa) e pode ter repercussões locais e ou sistêmicas dependendo da magnitude da infecção ou injúria. Por exemplo, uma infecção com grandes quantidades de microrganismos ou um corte de grande extensão que provoque perda significativa de sangue irão certamente provocar efeitos sistêmicos. Lembra-se das Atividades 1 e 2 da Aula 2? O corte que você e seu amigo tiveram no pé? Não é difícil perceber em qual dos dois casos houve envolvimento sistêmico, não é mesmo? No caso dele, é claro! Pois ele teve febre, ficou mal, e quase “não saiu daquela”. Você, ao contrário, quase não sentiu nada.

A resposta inflamatória inicia repercutindo na microcirculação pela alteração que provoca no calibre das arteríolas que são envolvidas por músculos lisos, os quais relaxam e contraem respondendo a mediadores inflamatórios (Figuras 5.4 e 5.5). A vasodilatação provoca maior aporte de sangue para o local causando *rubor* e *calor*. Às alterações das arteríolas seguem-se as alterações das vênulas, pela abertura das junções entre as células endoteliais, também promovida por mediadores inflamatórios.

De acordo com o tempo que duram as reações inflamatórias, elas são classificadas como agudas ou crônicas. Aquelas que evoluem para cura ou morte em espaço *curto* de tempo (que pode variar dependendo de fatores ligados ao organismo que sofre a inflamação, bem como de fatores ligados ao antígeno ou organismo que causa a inflamação) são ditas *agudas*. Aquelas que evoluem para cura ou morte em longo período de tempo (que também pode variar dependendo de fatores ligados ao organismo que sofre a inflamação, bem como de fatores ligados ao antígeno ou organismo que causa a inflamação) são classificadas como *crônicas*. Vamos exercitar este conceito com uma atividade.



ATIVIDADE

2. Seu amigo pegou um tremendo resfriado. Ficou mal, com febre, não queria comer, com muitas dores no corpo. Teimoso e incrédulo ele não ouviu os conselhos da própria mãe para se cuidar. Nem ligou! O resfriado melhorou, dentro de 10 dias, mas não completamente. Ele começou a perder peso e ficou com uma tosse “arrastada” e com catarro durante seis meses até que resolveu ir ao médico, quando então ele descobriu que estava com tuberculose! Finalmente ele se tratou e ficou curado. Perguntamos: quais são os aspectos deste caso que nos permitem classificar o resfriado do seu amigo como sendo composto por uma fase inflamatória aguda e uma crônica? Houve repercussão sistêmica?

RESPOSTA COMENTADA

Os aspectos que nos permitem assim classificar o resfriado são o tempo inicial que durou dez dias (fase aguda), seguido de melhora, porém ainda com sintomas no período de seis meses (fase crônica). Sim, houve repercussão sistêmica, pois todo o organismo dele sentiu os sintomas do resfriado (dores, febre, falta de apetite, perda de peso); além disso, o resfriado não ficou localizado com sintomas apenas nos pulmões.

O PRINCÍPIO GERAL DO TRÁFEGO (MIGRAÇÃO) DE LEUCÓCITOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A saída de leucócitos dos vasos para se acumularem no local onde está ocorrendo a inflamação (foco inflamatório) é o evento central na inflamação, quer seja ela de natureza infecciosa ou não infecciosa. Em condições normais (fisiológicas), durante a circulação sangüínea, os leucócitos se organizam nos vasos de modo a ficarem dispostos em uma coluna central, circundados pelas hemácias. Assim, as hemácias e não os leucócitos é que colidem com a superfície dos vasos na maior parte do tempo. As alterações no fluxo da microcirculação bem como na expressão de moléculas de adesão, tanto nos leucócitos quanto nos vasos no local da inflamação, são cruciais para permitir que aquelas células tenham chances de se colidirem e de aderirem aos vasos.

A chegada de leucócitos contribui para a eliminação do agente que está provocando a inflamação bem como para o reparo ou resolução da inflamação (cicatrização e regeneração dos tecidos). A migração transendotelial (vista na **Figura 5.1**) ocorre nas vênulas pós-capilares próximas ao foco inflamatório, e as células passam entre as junções das células endoteliais sem causar dano ao endotélio. Este processo de passagem da célula do sangue para o tecido através das junções do endotélio é conhecido como *diapedese* que nada mais é que a própria migração transendotelial.

As moléculas de adesão CAMs envolvidas na diapedese dos leucócitos pertencem às três famílias que listamos no **Quadro 5.1**. Como vimos também, as selectinas se expressam tanto em leucócitos quanto no endotélio. Nos leucócitos, as selectinas são constitutivas (ou seja, elas sempre estão sendo expressas) e se ligam a proteoglicanas expressas no endotélio (conforme mostrado no **Quadro 5.3**). As selectinas não estão expressas no endotélio de forma constitutiva. Por exemplo, as E-selectinas são induzidas por substâncias presentes no foco inflamatório (citocinas, C5a etc.). Já as P-selectinas estão pré-formadas e são rapidamente expressas nas células endoteliais após estimulação (também por citocinas no foco inflamatório, por exemplo).

Em geral, as integrinas são expressas constitutivamente em leucócitos e vão interagir com moléculas da superfamília das imunoglobulinas presentes no endotélio. Estas últimas são expressas constitutivamente no endotélio. Porém, sua concentração varia de acordo com o estímulo no foco inflamatório, podendo aumentar ou diminuir sua expressão.

Vamos voltar à parte b da **Figura 5.1**. Agora poderemos entendê-la completamente. Veja que no passo 1, o neutrófilo “rola” sobre o endotélio. Neste instante, estão em jogo as interações intermediadas pela E-selectina expressa no endotélio a qual se liga ao ácido siálico da PSLG-1. No passo 2, a quimiocina, denominada IL-8, produzida no foco inflamatório (ela pode ser produzida por muitas células ali presentes como as próprias células endoteliais mas também pelos neutrófilos, monócitos, linfócitos e fibroblastos) vai se ligar ao receptor da quimiocina IL-8 presente no neutrófilo. Este receptor, que é do tipo serpentinóide, que está acoplado à Proteína G e irá ativar um sinal intracelular que resultará na mudança da conformação na integrina (VLA-4) expressa no neutrófilo, de

modo que a mesma se ligue firmemente à VCAM-1 (da superfamília das imunoglobulinas) expressa no endotélio. Esta firme ligação vai permitir sua passagem do vaso para o tecido onde se encontra o foco inflamatório.

A **Figura 5.1** ilustra parcialmente a sofisticação que é o fenômeno biológico da inflamação. Tudo isto acontece, com certeza, quando você grita aaaaaaaaiiiiiiii, espetei meu dedo! Viu só? Nunca mais seu dedo espetado será para você um mero acidente dissociado de toda a sofisticação molecular da resposta inflamatória!

TODAS JUNTAS EM AÇÃO: AS CÉLULAS E AS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Vamos terminar nossa aula observando a **Figura 5.6** e o **Quadro 5.4**. A **Figura 5.6** ilustra como participam, na resposta inflamatória aguda local (ou localizada), os mediadores plasmáticos e os elementos celulares, todos presentes no tecido onde está ocorrendo a inflamação. Esta figura ilustra a situação que aconteceu com você na Atividade 1 da Aula 2. Você cortou o pé e houve contaminação por bactérias (*Escherichia coli*) mas seu sistema imune “deu conta do recado”!

Observe que o dano tecidual e endotelial causados pelo corte levou à ativação dos sistemas plasmáticos de reparo tecidual bem como à formação de componentes do complemento (ver **Quadro 5.3** e **Figuras 5.4** e **5.5**) e de agentes quimiotáticos. O dano endotelial ocasiona as mudanças na permeabilidade vascular local (mediados por bradicinina e peptídeos de fibrina). Os neutrófilos em geral são os primeiros leucócitos a chegarem (entre 4 e 6 horas se observa o pico destas células no tecido inflamado), seguidos pelos monócitos (entre 18 e 24 horas se observa o pico destas células no tecido inflamado), e estes pelos linfócitos. Os macrófagos (monócitos que se estabeleceram nos tecidos) são ativados pelas citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o *Tumor Necrosis Factor alfa*, (TNF- α) e por componentes do complemento (C3a e C5a). Eles passam a produzir mais citocinas, bem como a secretar mediadores inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos). Os macrófagos fagocitam bactérias que são opsonizadas (isto é, têm a sua fagocitose facilitada) por C3a e C5a, e, porque estão ativados, têm maior chances de destruí-las em seus lisossomos. Os mastócitos, normalmente presentes nos tecidos

conectivos, são ativados pelos componentes do complemento C3a e C5a (Quadro 5.3) pelo próprio trauma bem como pelo aumento local de temperatura. Eles liberam histamina que está contida nos seus grânulos. A histamina promove aumento da permeabilidade vascular (Quadro 5.3). Os mastócitos também secretam prostaglandinas e leucotrienos que atuam no endotélio vascular aumentando a sua permeabilidade.

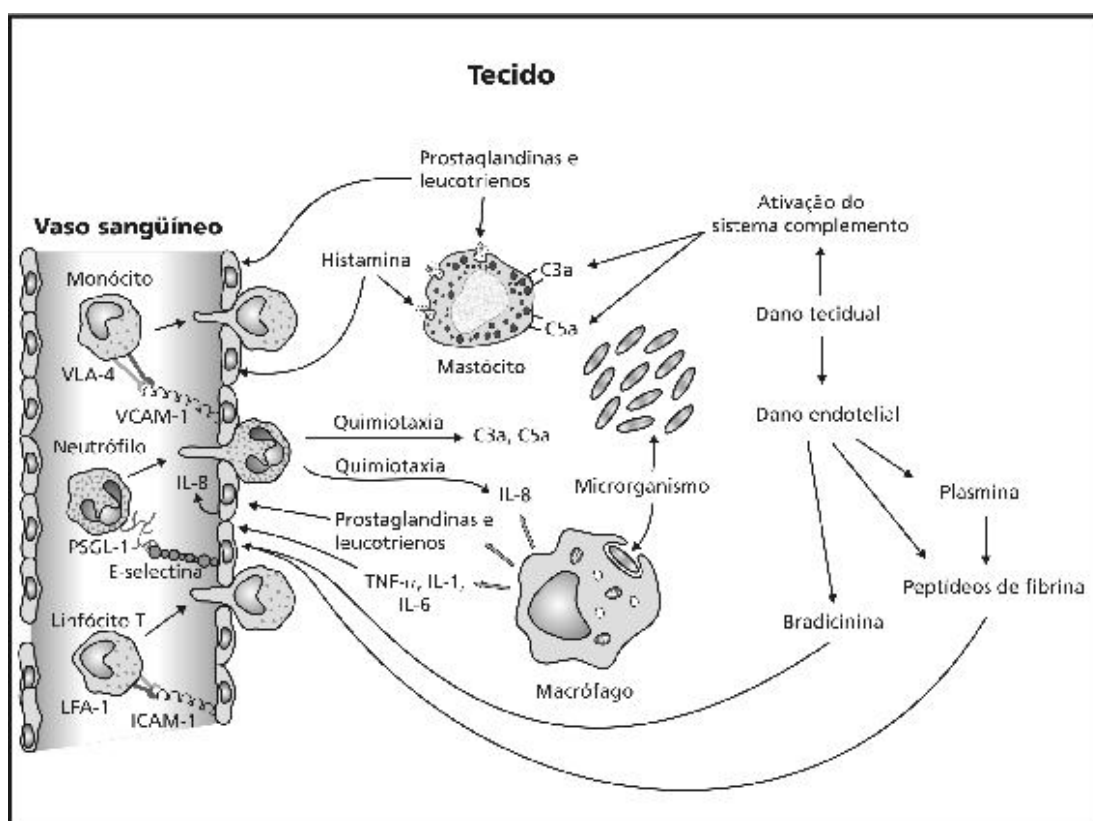


Figura 5.6: Elementos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória aguda localizada.

O Quadro 5.4 ilustra o alto grau de redundância da ação dos mediadores da inflamação. Esta redundância garante a preservação e a amplificação da resposta inflamatória. Assim, na falta de um ou outro componente, não ocorrem maiores prejuízos à resposta inflamatória como um todo. Veja no Quadro 5.4 que praticamente nenhuma parte da reação inflamatória é dependente exclusivamente de um único mediador.

Quadro 5.4: Resumo dos eventos mediados durante a inflamação aguda local.

Evento	Mediador
Dilatação de vasos	Bradicinina, prostaglandinas, Histamina
Aumento da permeabilidade vascular causando rubor e calor	Peptídeos de fibrina, histamina, bradicinina, C3a, C5a, leucotrienos (C4, D4, E4) PAF
Aumento da expressão de moléculas de adesão no local da inflamação	IL-1, TNF- α ,
Aumento do aporte de células para o local (quimiotaxia) causando endurecimento à palpação (tumor)	PAF, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanas, peptídeos de fibrina, C3a, C5a, quimiocinas
Ativação e aumento da atividade fagocítica de macrófagos no tecido inflamado	C3a, C5a, TNF- α
Dor	Bradicinina, prostaglandina (PGF2)
Dano tecidual causando a perda ou prejuízo de função do tecido ou órgão	Radicais livres de oxigênio, enzimas lisossomais, óxido nítrico

À medida que o tempo vai passando, o “cenário” inflamatório vai mudando de modo a evoluir para cura (resolução) ou cronificação. Por causa desta “mudança de cenário”, em função do tempo, um patologista poderá classificar um “*infiltrado leucocitário inflamatório*”, isto é, o conjunto de células que estão em determinado tecido em um dado corte histológico, como sendo proveniente de uma inflamação aguda ou crônica. Ele se baseará na composição de células ali presentes, e na maneira como o tecido está organizado (com maior ou menor grau de preservação). Os tecidos mais desorganizados em sua estrutura (destruídos) e com quantidades abundantes de linfócitos provavelmente abrigam inflamação crônica, pois estas células são as últimas a chegarem no local da inflamação. Nesta aula citamos apenas superficialmente alguns efeitos sistêmicos da inflamação aguda. Também não vimos em detalhes os efeitos da inflamação crônica bem como não mencionamos sobre o controle da resposta inflamatória. Mas não se preocupe, veremos estes assuntos em outras aulas do nosso curso.

CONCLUSÃO

Você viu que a inflamação é um fenômeno biológico de grande importância e complexidade. Mencionamos nesta aula, várias vezes, que a resposta inflamatória pode ser de origem infecciosa e não infecciosa. Talvez você deva estar tentando identificar uma situação em que a resposta inflamatória possa causar danos graves e até a morte sem que haja a presença de um agente infeccioso. Vamos lhe dar um exemplo de uma destas situações. Talvez você já tenha ouvido falar na doença pulmonar que trabalhadores de minas (jazidas) estão propensos a desenvolver por causa do pó de sílica a que são expostos. Esta doença provoca fibrose pulmonar e os trabalhadores morrem por causa da fibrose. Mas o que o Sistema Imune e a resposta inflamatória têm a ver com isto? Muita coisa! A sílica tem efeito citotóxico direto sobre os alvéolos. Porém, tem sido demonstrado que a reação inflamatória mediada principalmente pelos macrófagos alveolares (macrófagos presentes no tecido pulmonar) secretam citocinas como o $\text{TNF-}\alpha$, a IL-1, as quais, se secretadas por longos períodos de tempo, promovem inflamação. Esta resposta inflamatória se dá em resposta ao pó de sílica que se deposita no pulmão dos trabalhadores das minas. Também, ao morrerem, os macrófagos eliminam radicais livres de oxigênio, enzimas lisossomais, óxido nítrico os quais promovem injúria tecidual e esta, como sabemos, estimula ainda mais a inflamação. A fibrose resulta de ambos, morte de células (alvéolos) por efeito tóxico da sílica bem como pela reação inflamatória prolongada que se estabelece no pulmão. Outras situações semelhantes a esta (fibrose pulmonar) podem ocorrer como resultado de resposta inflamatória sistêmica prolongada em que mais uma vez as citocinas (principalmente o $\text{TNF-}\alpha$) secretadas em altas concentrações terão papel crucial para o desenvolvimento do quadro de fibrose pulmonar. O nosso primeiro presidente civil da República, após o término do regime militar, Tancredo Neves, faleceu em decorrência de fibrose pulmonar por resposta inflamatória sistêmica prolongada e não por infecção bacteriana conforme divulgado na época de seu falecimento. Voltaremos a falar neste assunto em maiores detalhes em outra aula.

ATIVIDADE FINAL

Considere o que vimos nos Quadros 5.3 e 5.4 e nas Figuras 5.5 e 5.6 para desenvolver esta atividade. Vamos considerar a Figura 5.1 que mostra os primórdios de uma reação inflamatória. Imaginemos que esta seja uma situação resultante da espetada no dedo que levou sua costureira quando você tocou a campainha da casa dela e a mesma se assustou ao se dar conta de que estava atrasada para lhe entregar a roupa encomendada. Perguntamos *quais* outros mediadores poderão estar presentes na “história ilustrada” na Figura 5.1 mas que lá não aparecem? Dicas: para responder a esta pergunta considere que a Figura 5.1 mostra a reação inflamatória após cerca de 5 horas da “bela espetada” que a costureira levou no dedo que ainda está doendo e inchado, mas que já parou de sangrar!

RESPOSTA COMENTADA

Primeiramente é preciso que fique claro que não é possível dizer com absoluta exatidão quais mediadores precisamente estarão lá, pois a intensidade da reação inflamatória pode variar de pessoa para pessoa, além de ser dinâmica no tempo (isto é, ela muda seus componentes à medida que o tempo vai passando) mas vamos listar alguns: o PAF, pois já parou de sangrar! Lembre-se, o PAF agrega plaquetas que atuam ativamente na coagulação; os peptídeos de fibrina (veja, eles atraem neutrófilos!). A bradicinina também estará com certeza pois a coitada reclama de dor. As prostaglandinas (que aumentam a permeabilidade vascular) estão lá, o dedo está inchado! Elas também atraem neutrófilos, e eles estão lá! Também estão os leucotrienos B4 (LTB4) que igualmente atraem neutrófilos! Ufa! Quantas moléculas para uma simples espetada de dedo!.

RESUMO

A reação inflamatória é um fenômeno biológico de alta complexidade (sofisticação). Ela integra sistemas plasmáticos e celulares, com o propósito de reparo tecidual, os quais atuam de forma a promovê-la bem como regulá-la. Moléculas expressas na superfície dos leucócitos, na superfície do endotélio dos vasos, e nos tecidos (principalmente na matriz extracelular) são as peças-chave na resposta inflamatória pois medeiam a movimentação das células do sangue para os tecidos. A reação inflamatória pode ter repercussões locais e sistêmicas bem como poderá se resolver em curto espaço de tempo (inflamação aguda) ou se “arrastar” no tempo (inflamação crônica). Tanto na inflamação aguda quanto na inflamação crônica o organismo pode se curar ou sucumbir, independentemente se a inflamação é de origem infecciosa ou não.

INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula estudaremos, em detalhes, os anticorpos e os antígenos. Ambos já são seus conhecidos de aulas passadas, mas na próxima aula serão vedetes exclusivas de sua importante atenção!

Anticorpos

AULA

6

Meta da aula

Definir a estrutura e a função dos anticorpos.

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Reconhecer a estrutura básica de uma molécula de anticorpo.
- Definir classes e subclasses de anticorpos.
- Definir a função dos anticorpos.

Pré-requisitos

Para que você entenda melhor esta aula, é importante que você reveja os conceitos de estrutura das proteínas apresentados nas Aulas 11 a 14 da disciplina Bioquímica I. As informações contidas nas Aulas 1, 2 e 4 desta disciplina, Aula 6 de Biologia Celular I e a disciplina Grandes Temas em Biologia complementam esta aula.

INTRODUÇÃO



EMIL A. VON BEHRING (1854 – 1917)

Médico alemão de formação militar, nascido em 1854, foi um dos pioneiros da bacteriologia. Ganhador do primeiro prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1901. Desenvolveu a soroterapia para tétano e difteria juntamente com Shibasaburo Kitasato. Se você quiser saber um pouco mais sobre a vida desse pesquisador, visite o *site*: <http://nobelprize.org/medicine/articles/behning/>

Os anticorpos são também conhecidos como imunoglobulinas. A molécula de anticorpo é uma glicoproteína produzida pelos linfócitos B, a partir do reconhecimento do antígeno pelo BCR e tem a propriedade de interagir com o antígeno de maneira específica. Você já leu a respeito do anticorpo em algumas aulas anteriores: Aulas 1 e 4 desta disciplina, Aula 6 de Biologia Celular I e também na disciplina Grandes Temas em Biologia. Certamente você deve ter ficado curioso (a) para saber mais a respeito desta molécula, não é mesmo? Pois agora é a hora! Vamos aproveitar esta oportunidade?

Na virada do século XIX para o XX, **EMIL A. VON BEHRING** e **SHIBASABURO KITASATO** demonstraram experimentalmente a indução da imunidade humoral contra toxinas de origem bacteriana. No início do século XX, pessoas acometidas pela difteria e tétano já podiam ser tratadas com soro antitoxina. Porém, naquela época, os anticorpos eram conhecidos somente por algumas de suas propriedades: neutralizar toxinas, aglutinar hemácias, induzir a lise de bactérias. Somente por volta de 1930, a estrutura molecular dos anticorpos foi demonstrada como sendo uma glicoproteína. Coletivamente, os anticorpos formam uma família de proteínas plasmáticas, conhecidas como imunoglobulinas, cujo domínio constitutivo básico, o domínio imunoglobulina, é usado de várias formas em muitas moléculas do sistema imune e em outros sistemas biológicos.

A região da molécula do anticorpo que reconhece o antígeno tem uma grande variabilidade estrutural e é denominada região variável ou região V. Os anticorpos produzidos por um clone de células B se ligam especificamente (através de interações químicas não covalentes) aos antígenos. O repertório total de anticorpos, o qual reflete o total de clones de linfócitos B presentes em um indivíduo, é suficientemente grande para assegurar que qualquer estrutura possa ser identificada. Por outro lado, a região da molécula de anticorpo que participa das suas funções efetoras não varia do mesmo modo e é conhecida como região constante ou região C. Estas regiões compreendem cinco classes principais e são denominadas isotipos, que diferem entre as



SHIBASABURO KITASATO (1852 – 1931)

Médico e bacteriologista japonês, nascido em 1852. Um dos descobridores do agente etiológico da peste bubônica. Demonstrou experimentalmente com Emil von Behring a importância da imunidade passiva na prevenção e tratamento do tétano e difteria. A vida de Shibasaburo Kitasato pode ser conhecida com mais detalhes nos *sites*: <http://www.historiadelamedicina.org/kitasato.html> e <http://nobelprize.org/medicine/articles/behning/>

espécies animais, e são especializadas na ativação de diferentes mecanismos efetores da imunidade.

Nesta aula, vamos descrever as principais características funcionais e moleculares do anticorpo e as suas várias isoformas. Então, vamos conhecer com mais detalhes esta molécula que é a principal componente da imunidade humoral? Além disso, esta molécula se constitui em um dos principais instrumentos de pesquisa básica e aplicada.



Você sabia que num indivíduo adulto com aproximadamente 70kg são produzidas em torno de 3g de anticorpos diariamente? E que dois terços destes anticorpos correspondem aos anticorpos da classe IgA, que é produzida por linfócitos B presentes na parede dos tratos gastrointestinal e respiratório? Esta quantidade de IgA reflete a grande superfície destes órgãos.

ESTRUTURA BÁSICA DO ANTICORPO

A molécula de anticorpo de todas as classes é representada por um modelo básico constituído de duas cadeias polipeptídicas leves (cadeia L do inglês *light*) de peso molecular (PM) aproximado de 23 kDa e duas cadeias pesadas (cadeia H do inglês *heavy*) com PM variáveis entre 50 e 75 kDa, dependendo da classe do anticorpo, conforme podemos ver na **Figura 6.1.a**. Na **Figura 6.1.b**, observe que as cadeias pesadas e leves possuem região variável VH (variável pesada) e VL (variável leve). Essa denominação (VH e VL) se deve ao fato de que estas regiões apresentam uma grande variabilidade polipeptídica, ou seja, uma grande variação na sequência de aminoácidos, o que resulta num espantoso repertório de anticorpos (da ordem de $10^7 - 10^9$ possibilidades). Isto significa dizer que para cada estrutura molecular presente na Natureza haverá possibilidade de reconhecimento (interação química não covalente) por parte dos anticorpos. É importante informar a vocês que os anticorpos não reconhecem apenas estruturas de natureza protéica, mas também outros tipos de moléculas como carboidratos, ácidos nucleicos (DNA e RNA), vitaminas etc. Isto acontece em consequência do enorme repertório dos linfócitos B, que será apresentado com mais detalhes na Aula 9 desta disciplina, e porque do ponto de vista estrutural os anticorpos reconhecem os antígenos na sua região variável, conforme veremos a seguir, a qual é espacialmente definida como uma fenda onde várias

estruturas podem se encaixar com maior ou menor grau de afinidade, bem como com maior ou menor grau de encaixe (uma espécie de ajuste tridimensional). As regiões variáveis correspondem à parte da molécula que se liga ao antígeno e estão localizadas na porção amino-terminal do anticorpo. O restante da molécula corresponde à região mais constante e é denominada constante pesada (CH) e constante leve (CL) e inclui a porção carboxi-terminal da molécula. Na mesma **Figura 6.1.a**, repare que as cadeias leves se unem às cadeias pesadas por pontes dissulfeto, e a união entre as duas cadeias pesadas também é feita por pontes dissulfeto. Além das pontes intercadeias, as moléculas de anticorpo têm também as pontes intracadeias que ligam dois aminoácidos distantes da cadeia polipeptídica da estrutura primária da proteína, formando domínios globulares que caracterizam esta família de proteínas. Na molécula de anticorpo, cada domínio globular corresponde a uma alça centrada pela presença de uma ponte dissulfeto intracadeia, conforme pode ser visto na **Figura 6.1.c**. Assim, na cadeia leve, temos os domínios VL e CL (variável e constante leve, respectivamente); na cadeia pesada, observamos os domínios VH (variável pesada) e CH1, CH2, CH3 (constante pesada, com os domínios 1, 2 e 3).

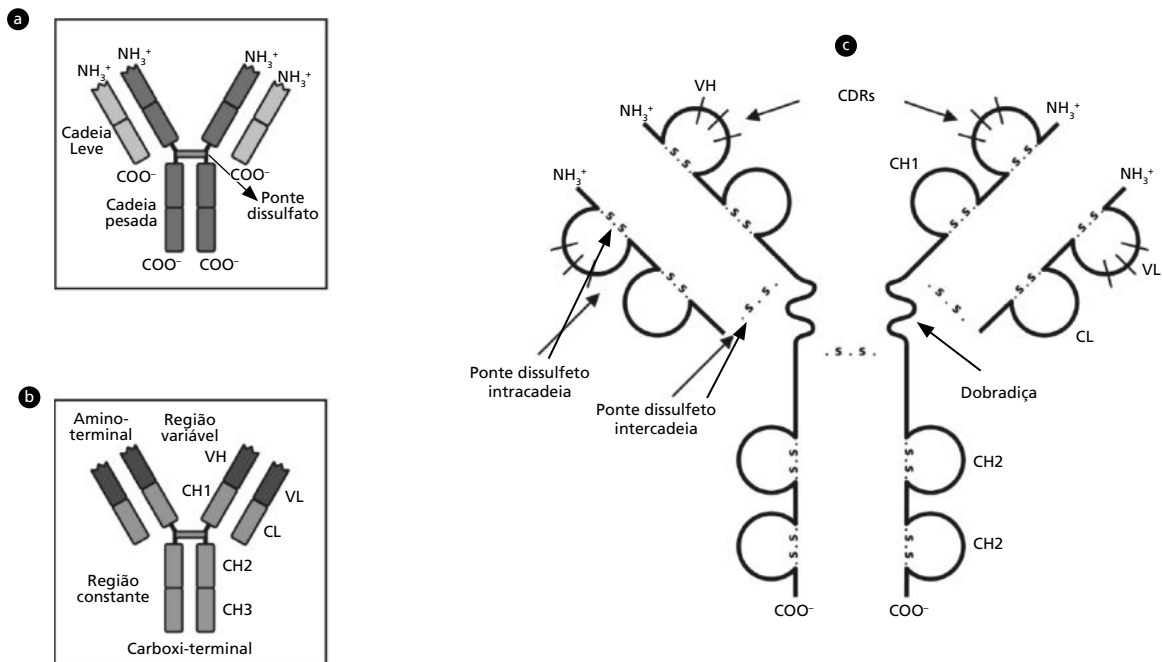


Figura 6.1: Estrutura básica de uma molécula de anticorpo. (a) Veja as cadeias leves e pesadas e as regiões amino e carboxi-terminal; (b) observe as regiões variáveis e constantes das cadeias leve e pesada; (c) veja as pontes dissulfeto intra e intercadeia.



ATIVIDADE

1. Para fixar o conceito de anticorpo, descreva sucintamente a estrutura básica de uma imunoglobulina.

RESPOSTA COMENTADA

Se você descreveu que: a) uma molécula de anticorpo é constituída basicamente de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves interligadas por pontes dissulfeto; b) a região variável da cadeia pesada corresponde ao domínio VH, e os domínios CH1-3 correspondem à fração constante da molécula; c) na cadeia leve, o domínio VL representa o domínio variável e CL, o domínio constante. Você acertou! Parabéns! Se você teve dificuldade para responder a esta questão, procure rever estes conceitos, eles são importantes para você acompanhar esta e outras aulas desta disciplina.

Na região V, a variabilidade das seqüências de aminoácidos não é uniformemente distribuída ao longo dela. Muitos aminoácidos são conservados, ou seja, não variam entre as moléculas de anticorpo, especialmente aqueles que são importantes na manutenção da estrutura do domínio V. Podemos ver, na **Figura 6.2.a**, a localização dos aminoácidos que apresentam maior variabilidade: estão distribuídos ao longo da cadeia pesada, mais precisamente na região VH, representada no histograma. Observe que existem três regiões que apresentam maior variabilidade e estão identificadas como CDR1, CDR2 e CDR3. Essa sigla significa regiões determinantes da complementariedade (do inglês *complementarity-determining regions*). Importante notar que estes três CDRs estão presentes também na cadeia leve, formando uma região concêntrica de interação com o antígeno entre as duas cadeias do anticorpo, como mostra a **Figura 6.2.b**.

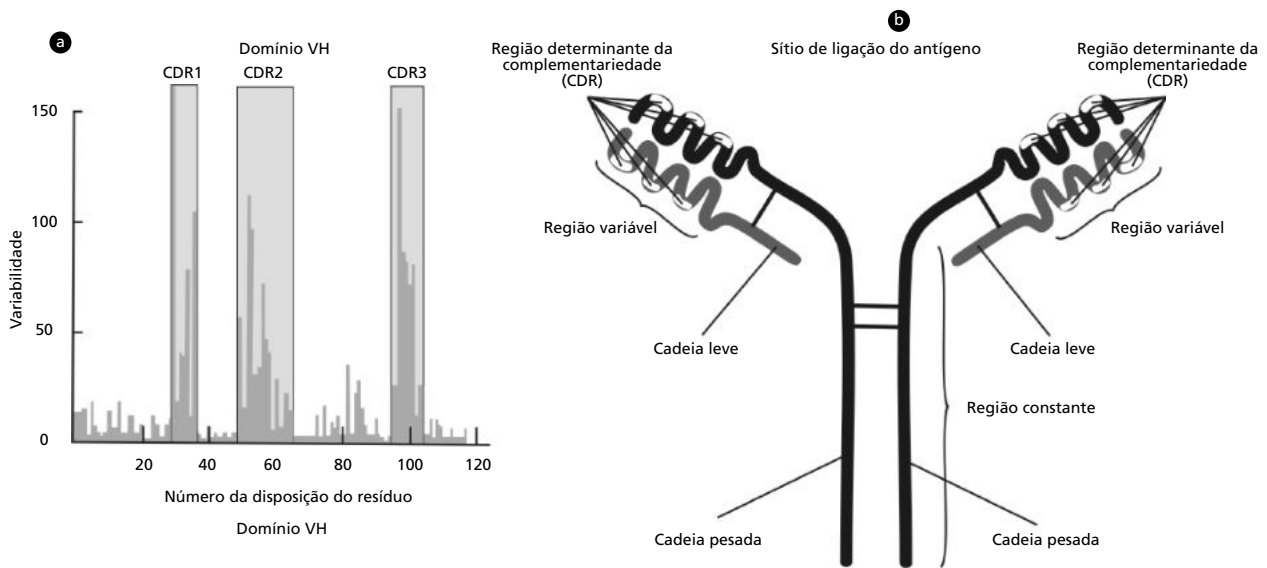


Figura 6.2: Organização estrutural das regiões variáveis do anticorpo. (a) Diagrama de variabilidade de aminoácidos ao longo da região variável da cadeia pesadas; (b) diagrama esquemático da disposição dos CDRs nas cadeias leves e pesadas de uma molécula de imunoglobulina.

Ligação do anticorpo ao antígeno

Vamos começar este tópico definindo o termo antígeno como toda substância capaz de ligar-se a um anticorpo ou a um receptor de célula T. Frequentemente, o termo antígeno também é utilizado como sinônimo de imunógeno. Em geral, os antígenos são macromoléculas capazes de ativar os linfócitos B a produzirem anticorpos. Uma exceção são os haptenos, moléculas de baixo peso molecular, que podem se ligar ao anticorpo, porém, são incapazes de ativar os linfócitos B. Para que o hapteno seja imunogênico é necessário acoplá-lo quimicamente a uma molécula maior chamada carreador (proteína). Assim, este complexo hapteno-carreador é capaz de desencadear uma resposta imunológica específica contra o hapteno. Você deve estar se perguntando: Onde posso encontrar um exemplo de hapteno na Natureza? Um bom exemplo são as toxinas de origem fúngicas entre as quais podemos citar as **AFLATOXINAS**. Os haptenos, devido ao seu tamanho reduzido, geralmente têm apenas um sítio de ligação com o anticorpo. A este sítio denominamos epitopo ou determinante antigênico. Ao contrário dos haptenos, os antígenos macromoleculares apresentam vários epitopos em uma mesma molécula.

AFLATOXINA

Grupo de substâncias produzidas por fungos (bolores) do gênero *Aspergillus*. No homem, tem efeito cumulativo e causam câncer hepático. Nos animais, podem causar intoxicações graves. Este fungo está presente nos cereais armazenados de forma inadequada, principalmente os amendoins.

Nos antígenos protéicos, dependendo do seu tamanho, eles podem conter vários epitopos, conforme você já viu na Aula 2. Cada epitopo pode ser reconhecido especificamente por anticorpos produzidos por um clone de célula B. Os epitopos podem ser do tipo contínuo, também denominado linear, ou do tipo descontínuo que são chamados também conformacionais. Os determinantes antigênicos lineares, como o próprio nome diz, correspondem a uma seqüência linear contínua na estrutura primária do antígeno que é reconhecido pelo anticorpo, como pode ser visto na **Figura 6.3.b**. Agora na **Figura 6.3.a**, podemos ver que o anticorpo ao reconhecer um epitopo conformacional, ele reconhece uma estrutura resultante da dobradura da estrutura primária do antígeno, ou seja, essa estrutura conformacional é formada por seqüências de aminoácidos localizados em dois ou mais pontos diferentes na estrutura primária da proteína. Observe ainda na **Figura 6.3.a** que esse antígeno, ao serem desnaturados os aminoácidos que compõem o epitopo conformacional, estará localizado em pontos diferentes na estrutura primária dessa proteína.

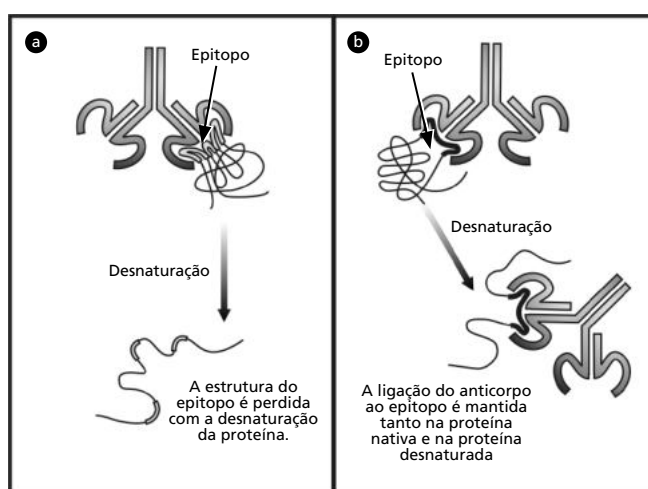


Figura 6.3: Diagrama esquemático de um antígeno demonstrando os tipos de epitopos. (a) Epitopo descontínuo ou conformacional; (b) Epitopo contínuo ou linear.

Os anticorpos são moléculas flexíveis

A molécula de imunoglobulina compreende três porções de globulares de tamanho similar, unidas por uma fração flexível da cadeia polipeptídica, conhecida como região de articulação ou dobradiça e está localizada entre os domínios CH1 e CH2, conforme pode ser visto na **Figura 6.1.c**. Entretanto, somente em algumas classes de imunoglobulinas

(IgG, IgD e IgA, falaremos sobre as classes de imunoglobulinas a seguir) esta região é dotada de mobilidade, devido à maior concentração dos aminoácidos prolina e cisteína neste local. Estes aminoácidos estão envolvidos na formação de pontes dissulfeto intercadeias que unem as duas cadeias pesadas do anticorpo. Além disso, permitem que os dois “braços” do anticorpo tenham movimentos de abertura e fechamento. Essa mobilidade da molécula é fundamental para que ela possa se ligar a determinantes antigênicos distantes, não acessíveis, caso a molécula não seja flexível. Importante ressaltar, ainda, que cada molécula de anticorpo é bivalente, ou seja, ela é capaz de se ligar a dois determinantes antigênicos que podem estar em uma mesma molécula de antígeno ou em moléculas distintas.

Fragmentos funcionais da imunoglobulina

A região da dobradiça dos anticorpos é também alvo das enzimas proteolíticas, papaína e pepsina, que geram fragmentos funcionais desta molécula.

A clivagem do anticorpo com a enzima papaína gera três fragmentos da molécula, sendo dois fragmentos idênticos e que contêm a atividade de ligação ao antígeno. Estes dois fragmentos foram, então, denominados Fab' (fragmento de ligação ao antígeno, do inglês – *fragment antigen binding*) e correspondem aos dois braços do anticorpo, que contêm a cadeia leve completa pareada aos domínios VH e CH1 das cadeias pesadas. Veja estes detalhes na **Figura 6.4**. O terceiro fragmento não interage com o antígeno. Entretanto, cristaliza-se facilmente. Por essa razão foi chamado fragmento Fc (fragmento cristalizável, do inglês – *fragment crystallizable*). O fragmento Fc corresponde aos domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada e é responsável pela interação com células e moléculas efetoras da resposta imune. Estas propriedades serão vistas em uma outra aula desta disciplina.



Por que será que o fragmento Fc é facilmente cristalizável? Lembre-se de qual é o requisito para que uma proteína se cristalice? Estar pura em solução, não é mesmo? Naquela época, meados do século XX, os cientistas já conseguiam purificar imunoglobulinas a partir do soro humano. Entretanto, somente quando o anticorpo era digerido, e após isso, apenas o Fc se cristalizava. Você sabe por quê? Veja bem, para estar pura em uma solução, uma dada proteína deve ser o único tipo presente em tal solução. Ok, você pode dizer: “Mas você não acabou de dizer que os anticorpos podiam ser purificados?” Sim, podiam e estavam puros enquanto entidades moleculares (isto é, havia apenas anticorpos naquela preparação), porém, os anticorpos apresentam uma diversidade imensa na sua porção variável. Assim, embora pura, uma solução de anticorpos preparada a partir do soro não se apresenta como o único tipo, por causa da sua porção variável. Então, ao ser digerida e novamente purificada de modo a ter o mesmo tipo de fragmentos em soluções diferentes, a porção Fc, que é constante, passava a ser o único tipo em solução e por isso se cristalizava.

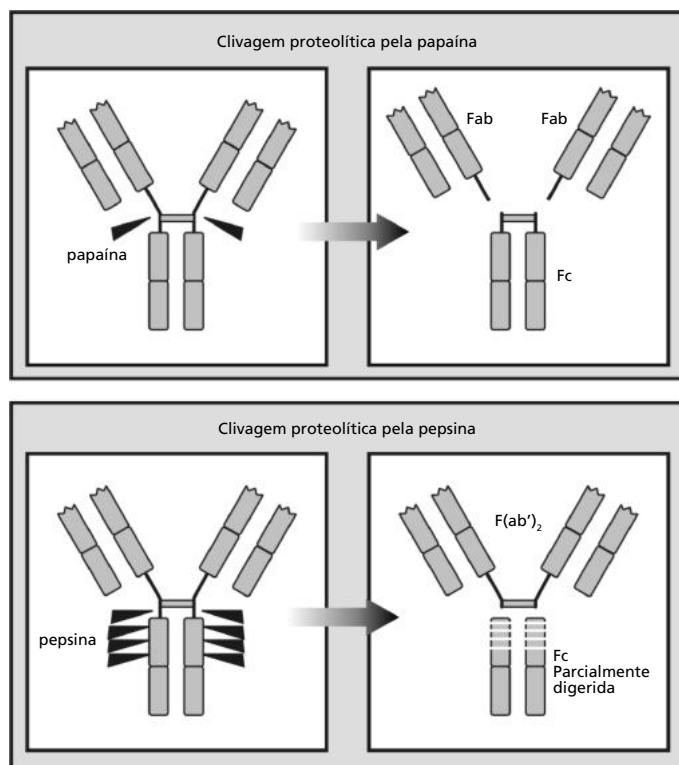


Figura 6.4: Figura demonstrando uma molécula de anticorpo digerida por papaína ou pepsina.

Uma outra enzima também utilizada é a pepsina. Essa enzima cliva o anticorpo na mesma região que a papaína, porém, no lado carboxi-terminal das ligações dissulfeto. Veja na **Figura 6.4**. Observe que esta enzima gera um fragmento com os dois braços do anticorpo unidos. Assim, este fragmento foi denominado F(ab')₂ e mantém a atividade de ligação ao antígeno. Por outro lado, o fragmento Fc é parcialmente digerido pela pepsina.



Os fragmentos de anticorpos gerados pela ação enzimática têm grande potencial na aplicação terapêutica de anticorpos. Você quer ver um exemplo prático desta aplicação? Os soros antiofídicos produzidos em cavalos são submetidos a tratamentos enzimáticos para a retirada da fração Fc, com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais da soroterapia e possivelmente aumentar a difusão do anticorpo nos tecidos.

Atualmente, pelas técnicas da engenharia genética, é possível construir moléculas recombinantes constituídas somente dos domínios variáveis da cadeia pesada e da leve unidas por pequeno fragmento peptídico. Essa construção é denominada fragmento variável de cadeia única ScFv (do inglês – *single chain variable fragment*) e tem um grande potencial de aplicação terapêutica nas patologias em que os anticorpos têm um papel fundamental.

POLIMORFISMO DOS DOMÍNIOS CONSTANTES DAS IMUNOGLOBULINAS

Cada anticorpo tem a estrutura de suas porções variáveis das cadeias L e H relacionadas a sua especificidade. Cada especificidade possui certa configuração espacial, que nada mais é que o reflexo das diferentes seqüências de aminoácidos da estrutura primária das regiões variáveis, determinado pela recombinação genética dos vários genes que codificam esta região do anticorpo, conforme veremos em uma aula mais à frente. Assim, você pode imaginar tantas configurações quanto são, teoricamente possíveis, os determinantes antigênicos potencialmente imunogênicos presentes nos antígenos. Agora, vamos entender as variações existentes nas regiões constantes das cadeias H e L que determinam a divisão dos anticorpos em classes e subclasses que conferem aos anticorpos as suas propriedades funcionais.

Classes ou isotipos de anticorpos

Em humanos são conhecidos cinco isotipos de imunoglobulinas (abreviadas como Ig) que são IgM, IgD, IgG, IgE e IgA baseados na constituição da fração constante da cadeia pesada e que são identificadas pelas letras gregas μ (mi), δ (delta), γ (gama), ϵ (épsilon) e α (alfa), respectivamente. As IgGs são ainda divididas em subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , respectivamente). As IgAs também apresentam duas subclasses IgA1 e IgA2 (α_1 , α_2 , respectivamente). Em camundongos, as IgGs são subdivididas em IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Com relação a cadeias leves, existem somente dois isotipos κ (káppa) e λ (lambda). Veja na **Tabela 6.1** algumas características moleculares e funcionais dos anticorpos.

Tabela 6.1: Propriedades dos isotipos das imunoglobulinas humanas

	Imunoglobulina								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Cadeia pesada	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Peso molecular	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Concentração no soro (adulto mg ml ⁻¹)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Meia vida no soro (dias)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Fixação do complemento pela via clássica	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-
Passagem através da placenta	+++	+	++	-+	-	-	-	-	-
Ligação na superfície de fagócitos	+	-	+	-+	-	+	+	-	-
Ligação em mastócitos e basófilos	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Reação com a proteína A estafilocócica	+	+	-+	+	-	-	-	-	-



ATIVIDADE

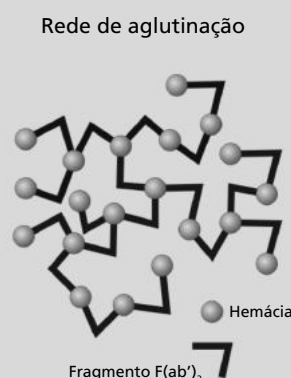
2. Um pesquisador produziu um anticorpo da classe IgG contra hemácias de carneiro. Utilizando-se de técnicas imunoquímicas, ele purificou as IgGs e submeteu a dois tratamentos enzimáticos distintos: 1 – tratamento com a enzima papaína e 2 – tratamento enzimático com pepsina. Os anticorpos resultantes dos dois tratamentos foram incubados com hemácias de carneiro. Ele observou que os anticorpos tratados com a pepsina eram capazes de aglutinar hemácias, enquanto os anticorpos que foram tratados com a papaína não apresentavam esta propriedade. Explique por quê.

Dica: a aglutinação acontece quando uma molécula de anticorpo, pela sua característica bivalente, se liga a duas moléculas de antígeno (uma molécula de antígeno em cada braço); uma segunda molécula de anticorpo se liga a um dos antígenos; uma terceira molécula do antígeno se liga ao braço livre da segunda molécula de anticorpo e assim, sucessivamente, formando uma rede de aglutinação.

[illegible]

RESPOSTA COMENTADA

Você acertou se respondeu que o anticorpo tratado com a pepsina aglutinou as hemácias porque este tratamento preserva os dois braços do anticorpo unidos $F(ab')^2$, permitindo que esta molécula faça a rede de aglutinação. Veja o esquema ao lado, enquanto que o anticorpo tratado com a papaína resulta em três fragmentos, sendo dois fragmentos Fab e um fragmento Fc que não permitem que estas moléculas façam aglutinação. Se você errou, reveja esses conceitos e veja também a **Figura 6.4**, ela ilustra claramente a ação dessas duas enzimas sobre o anticorpo.



PROPRIEDADES GERAIS DAS IMUNOGLOBULINAS

Imunoglobulina G (IgG)

A IgG é produzida e secretada pelas células B diferenciadas (plasmócito) encontradas, principalmente, no baço, linfonodos e medula óssea. Por ser uma molécula monomérica, a sua estrutura corresponde basicamente à estrutura do anticorpo que descrevemos até agora, **Figura 6.5.a**. A IgG é a classe de imunoglobulina encontrada em maior concentração no sangue e, por essa razão, é o isotipo principal envolvido nos mecanismos de defesa mediado por anticorpo. Além disso, é a única classe de imunoglobulina a atravessar a barreira placentária em humanos. Assim, por exemplo, quando a mãe toma a vacina antitetânica durante a gravidez, ela estará imunizando o feto e protegendo-o de desenvolver tétano na cicatriz umbilical. Essa propriedade está relacionada à composição química dos fragmentos Fc e não ao tamanho da molécula, pois a IgA, com o mesmo PM, não atravessa a placenta. A molécula de IgG, apresenta ainda, outras propriedades funcionais que serão comentadas nas próximas aulas à medida que elas forem descritas.

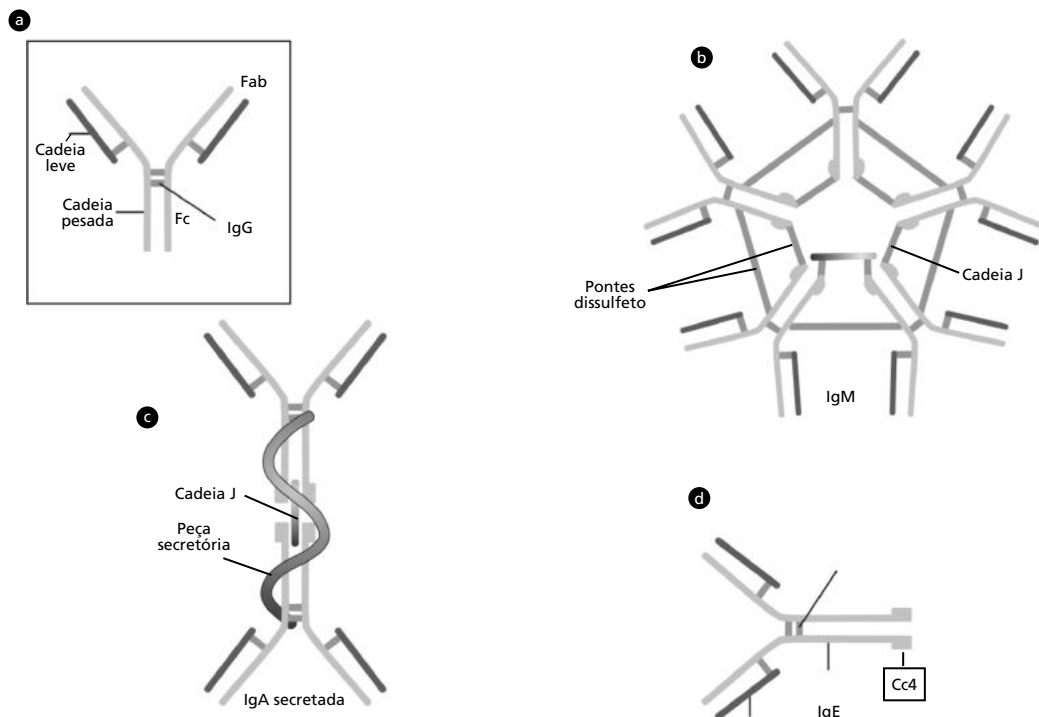


Figura 6.5: Figura esquemática das várias classes de imunoglobulinas. (a) Imunoglobulina G; (b) Imunoglobulina M; (c) Imunoglobulina A; (d) Imunoglobulina E.

Imunoglobulina M (IgM)

A IgM é também produzida e secretada pelos plasmócitos, principalmente no baço, linfonodo e medula óssea. Depois da IgG, é a segunda maior concentração de imunoglobulina encontrada no soro de mamíferos. Os anticorpos da classe IgM podem apresentar-se na forma de monômeros ou pentâmeros. A forma monomérica se expressa ligada à membrana plasmática de linfócitos B e, assim, se constitui como receptor de células B (BCR). A molécula de IgM apresenta, de uma forma geral, a mesma estrutura de anticorpo que já descrevemos, acrescida de um quarto domínio na cadeia pesada denominado CH4 e são destituídas da região da dobradiça. Já a forma secretada de IgM se apresenta na forma de pentâmeros, ou seja, esta forma é constituída de cinco unidades monomérica de IgM (veja na **Figura 6.5.b**). As subunidades monoméricas são interligadas por pontes dissulfetos nos domínios CH3 e CH4, arranjadas de forma concêntrica pela região Fc, deixando a região Fab voltada para o exterior, conforme o esquema da **Figura 6.5.b**. Ainda nesta figura, observe a presença da cadeia J, um peptídeo de 15 kDa que faz a junção das cinco subunidades.

O primeiro anticorpo a ser produzido frente a um estímulo antigênico específico é a IgM que caracteriza resposta primária e, em geral, está associada à infecção aguda, isto é, o indivíduo teve uma infecção recente ou ela ainda está em curso. Esta molécula tem grande capacidade de fixação do complemento pela via clássica (comentaremos mais a respeito na próxima aula, na qual falaremos sobre o sistema complemento) e alta eficiência em aglutinar antígenos. A aglutinação se deve à forma pentamérica da molécula que congrega cinco unidades monomérica de IgM, sendo capaz de se ligar em até dez epitopos. Assim, fica fácil de imaginar que a IgM pode se ligar simultaneamente a várias partículas de antígeno formando uma rede. A esta rede denominamos aglutinação, conforme já vimos na Atividade 2 desta aula.

Imunoglobulina A (IgA)

A IgA é o anticorpo que predomina nas secreções mucosas, e existem duas subclasses conhecidas: a IgA1 e a IgA2. Ela é secretada por plasmócitos presentes nas paredes dos tratos intestinal, respiratório, geniturinário, pele e glândulas mamárias. No soro, ela está presente em concentrações baixas e na forma de monômeros. Já nas secreções mucosas,

ela está presente em alta concentração e geralmente na forma de dímero, porém, pode também se apresentar na forma de trímeros e tetrâmeros.

A forma dimérica é a forma predominante das imunoglobulinas A nas secreções e é denominada IgA secretora (SIgA). É secretada pelos plasmócitos na forma de dois monômeros de IgA ligadas por pontes dissulfeto e pela cadeia polipeptídica J, a mesma cadeia que une as subunidades da IgM pentamérica (veja na **Figura 6.5.c**). A IgA polimérica é secretada pelos plasmócitos subepiteliais e se liga fortemente ao receptor poli-Ig (receptor de imunoglobulina polimérica). Observe na **Figura 6.6**, que a IgA secretada se liga ao receptor poli-Ig na face interna do epitélio da mucosa. A seguir, o anticorpo associado ao receptor é endocitado, formando uma vesícula, em que a molécula de IgA é transportada através da célula epitelial até a face externa do epitélio quando o receptor poli-Ig é clivado enzimaticamente, liberando a SIgA juntamente com parte do receptor, que passa a ser denominado peça secretora. A peça secretora na SIgA tem o papel de proteger a molécula de IgA das enzimas proteolíticas presentes nas diversas secreções mucosas. A principal função da SIgA nas mucosas é se ligar aos patógenos, impedindo que estes se liguem à superfície das mucosas estabelecendo uma infecção.

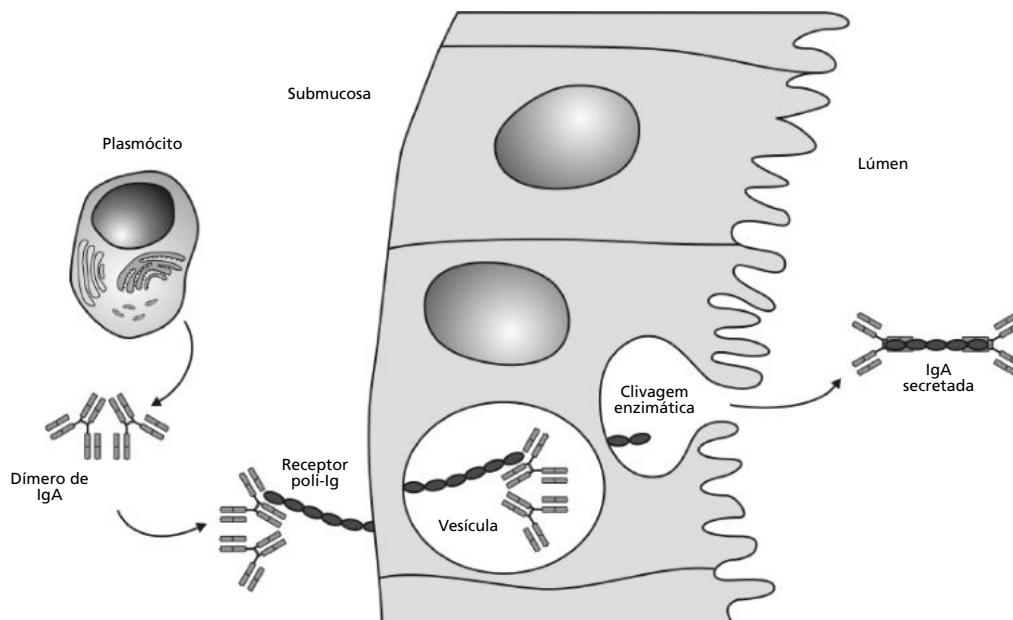


Figura 6.6: Figura esquemática do transporte da SIgA para a face externa das mucosas.

Imunoglobulina E (IgE)

A IgE é produzida por plasmócitos localizados, principalmente, abaixo das superfícies corpóreas como pele e mucosas. Ela se apresenta na forma de monômero e tem também um domínio CH4 adicional na cadeia pesada (veja a **Figura 6.5.d**). Essa imunoglobulina é encontrada em concentrações extremamente baixa na circulação. A IgE tem um tropismo pelos mastócitos, basófilos e eosinófilos, ou seja, liga-se com alta afinidade aos receptores de Fc presentes na superfícies destas células. Atenção, a ligação da IgE à superfície dessas células se dá pela fração Fc, sendo que a fração Fab, que se liga ao antígeno, fica voltada para o meio externo. A função da IgE está relacionada à indução da inflamação e à resposta imune efetora contra helmintos. Entretanto, a IgE é conhecida, principalmente, pelos seus efeitos patológicos que são as reações alérgicas que iremos tratar na Aula 17 desta disciplina.

Imunoglobulina D (IgD)

A IgD é uma molécula monomérica constituída basicamente de duas cadeias pesadas do tipo δ (delta) e duas cadeias leves do tipo κ (káppa) ou λ (lambda). Está presente no soro, em concentrações muito reduzidas e são bastante instáveis. A IgD juntamente com a IgM monomérica estão presentes na superfície de células B e funcionam como receptores. A função efetora da IgD, se há, ainda não foi descrita.

Vimos, nesta aula, a organização molecular e estrutural dos anticorpos e sua divisão em classes e subclasses. Potencialmente, podemos desenvolver anticorpos contra todos os antígenos presentes na Natureza; essa variabilidade, na especificidade dos anticorpos, é definida pela recombinação dos vários genes que codificam as imunoglobulinas, que será apresentada na Aula 9 desta disciplina. Esta “versatilidade” da especificidade do anticorpo, associado a sua produção em grande quantidade, a partir do reconhecimento e estimulação do antígeno específico, faz dele a principal molécula da resposta imune humoral, que desencadeia vários mecanismos moleculares e celulares que resultam na proteção. Esses mecanismos serão apresentados ao longo de outras aulas desta disciplina. Esperamos que você tenha entendido um pouco mais sobre os anticorpos. Contudo, caso você tenha alguma dúvida sobre esta aula, não deixe de tirá-las com os tutores, pois os conceitos desta aula serão importantes para acompanhar o curso.

**ATIVIDADE**

3. Vamos fazer mais uma atividade para melhor fixar as propriedades das imunoglobulinas?

Correlacione as duas colunas:

- a. Imunoglobulina G
- b. Imunoglobulina M
- c. Imunoglobulina A
- d. Imunoglobulina E

() Imunoglobulina monomérica com um domínio adicional CH₄, que se liga à superfície de mastócitos e medeia as reações alérgicas.

() Primeira classe de imunoglobulina produzida por uma célula B ativada e, que em geral, está associada a infecção aguda.

() Imunoglobulina que se apresenta na forma de dímeros, unidas por ponte dissulfeto e cadeia J. A peça secretora que integra a molécula e que a protege de proteases presentes nas mucosas.

() É a classe de anticorpos com maior concentração no soro. Em humanos é a única classe de imunoglobulina que atravessa a barreira placentária.

RESPOSTA COMENTADA

Se você estudou com atenção, deve ter respondido d, b, c e a. Parabéns! Você acertou! Caso você não tenha acertado, reveja o texto e tente novamente. Temos a certeza de que dessa vez você não errará. Se você ainda tiver dúvidas, não deixe de resolvê-las com os tutores nos pólos.

ATIVIDADE FINAL

Com relação aos anticorpos, assinale (V) para as afirmações corretas e (F) para as afirmações erradas.

- a. () Uma célula B, ao ser estimulada, começa a produzir IgM. Para que esta célula passe a produzir anticorpos da classe IgG, é necessário que ela receba estímulos de linfócitos TCD4.
- b. () As regiões variáveis das imunoglobulinas VH e VL das cadeias pesadas e leves, respectivamente, estão localizadas na porção amino-terminal da molécula, enquanto a fração constante da molécula responsável pela atividade efetora do anticorpo está localizada na porção carboxi-terminal.
- c. () A IgM monomérica está presente principalmente na circulação e geralmente está associada a uma infecção aguda.
- d. () Os anticorpos da classe IgA estão presentes principalmente nas secreções das mucosas e agem bloqueando a interação dos patógenos com a superfície do epitélio das mucosas.

RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu (F) para a alternativa c, e (V) para as demais, você acertou! Parabéns, mas, se você errou, vamos entender por quê? A alternativa a está correta porque, para que a célula B passe a produzir anticorpos da classe IgG, ela precisa receber sinais estimuladores da célula TCD4, principalmente via uma molécula chamada CD40 e citocinas, que determinam qual a classe de IgG passará a ser produzida. Mas não se preocupe, estas informações serão detalhadas em uma aula mais a frente. A alternativa c está errada porque a IgM, que está presente na circulação e em geral associada à infecção aguda, é a forma pentamérica da molécula. As demais alternativas estão corretas e, caso você tenha errado, volte ao texto e reveja estes conceitos e, se, por acaso, você ainda tiver dúvidas, não deixe de consultar os tutores nos pólos.

RESUMO

Os anticorpos são produzidos naturalmente pelos linfócitos B e plasmócito. Em decorrência da estimulação antigênica da célula B, um dado clone pode se expandir e passar a produzir uma enorme quantidade de anticorpos. Estas moléculas têm a sua estrutura básica constituída de duas cadeias pesadas e duas leves interligadas por pontes dissulfeto. O sítio de ligação aos antígenos está localizado na extremidade amino-terminal da molécula que corresponde às regiões VH e VL das cadeias pesadas e leves, respectivamente. As regiões constantes CH da cadeia pesada correspondem a vários domínios que estão relacionados com as atividades efetoras das moléculas de anticorpo, ou seja, interage com outras moléculas ou células do sistema imune para desempenhar uma determinada função.

Os anticorpos da classe IgG são as imunoglobulinas mais abundantes no soro, enquanto a IgA é a classe de anticorpos que prevalecem nas secreções mucosas. Em contrapartida, a IgM também está presente no soro, porém está relacionada, principalmente, ao início da resposta imune humoral contra um antígeno específico.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, vamos apresentar mais um componente importante da imunidade humoral, o sistema complemento, que participa tanto da imunidade inata como da imunidade adaptativa. Vamos, então, nos preparar para entender este sistema que já comentamos em aulas anteriores e agora teremos a oportunidade de conhecê-lo integralmente. Até a próxima aula.

Sistema complemento

AULA 7

Meta da aula

Apresentar estrutura e função do sistema complemento e as consequências biológicas decorrentes da sua ativação.

objetivos

Esperamos que, ao final desta aula, você seja capaz de:

- Definir a função do sistema complemento.
- Diferenciar as vias clássica, alternativa e das lectinas do sistema complemento.
- Descrever as atividades biológicas dos componentes do sistema complemento.

Pré-requisitos

Para acompanhar bem esta aula, é importante que você tenha compreendido os conceitos de enzimas da disciplina de Bioquímica I, Aulas 20 e 21; os conceitos da estrutura dos anticorpos apresentados na Aula 4 desta disciplina e a estrutura e composição de membranas (Aulas 6, 7 e 8 de Biologia Celular I).

INTRODUÇÃO



JULES BORDET

Médico, de origem belga, trabalhou no Instituto Pasteur de Paris entre 1894 e 1901 e, ao retornar à Bélgica, fundou o Instituto Pasteur de Bruxelas. Em 1895, descobriu o sistema complemento. Foi ganhador do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1919.

O sistema complemento, como já comentamos em outras aulas desta disciplina, é um dos principais componentes efetores da imunidade humoral e atua tanto na imunidade inata como na adquirida. O nome complemento foi dado a esse sistema por **JULES BORDET**, logo após a descoberta da molécula de anticorpo. Ele demonstrou que, quando um soro fresco, contendo anticorpos contra uma determinada bactéria, era incubado com esta bactéria à temperatura fisiológica de 37°C, resultava na lise desta bactéria. Entretanto, quando esse soro era aquecido a 56°C, a lise das bactérias não ocorria. Bordet percebeu, então, que estava prestes a descobrir um novo fenômeno presente no soro. Para comprovar esse fenômeno, ele precisava demonstrar que a perda da atividade lítica do soro não era acompanhada da perda da atividade do anticorpo. Para validar a sua hipótese, Bordet demonstrou que o soro tratado pelo calor ainda era capaz de aglutinar as bactérias, confirmando que os anticorpos ainda mantinham as suas atividades preservadas. Porém, a atividade de induzir a lise de bactérias era perdida. Assim, Bordet pôde concluir que o soro fresco deveria conter algum outro componente que fosse termo-sensível e responsável pela atividade lítica. Este componente que assistia ou complementava a função do anticorpo, ou seja, acrescentava a função lítica à molécula do anticorpo, foi denominado sistema complemento. Hoje sabemos que o sistema complemento atua associado a algumas classes e subclasses de anticorpos, como também por outras vias independentes de anticorpos, como veremos a seguir.

Nesta aula, vamos ver como é composto o sistema complemento e como ele atua. Prepare o seu espírito. À primeira vista, você vai achar isso meio confuso, pois o sistema complemento é composto por uma série de enzimas que são ativadas seqüencialmente e geram uma cascata de reações enzimáticas em que cada componente é denominado por letras e números. Você vai se sentir mergulhado em uma sopa de letrinhas! Contudo, não se preocupe, você pode até acabar memorizando todos os componentes e a seqüência em que cada um entra na reação, embora isso não seja o mais importante. O fundamental nesta aula é que, ao final dela, você não tenha dúvidas de como funciona o sistema complemento e de quais sejam as conseqüências biológicas decorrentes da sua ativação.

O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é formado por um conjunto de aproximadamente 30 proteínas, encontradas no soro ou aderidas à superfície de algumas células, que interagem entre si, formando uma cascata enzimática. Essa cascata enzimática resulta na eliminação do antígeno e na geração de resposta inflamatória. A ativação do sistema complemento pode ser iniciada por três vias:

- 1– Via clássica – a primeira via a ser descrita, e depende de anticorpos para a sua ativação;
- 2– Via alternativa – não depende de anticorpos para ser ativada;
- 3– Via das lectinas – similar à via clássica, mas não depende de anticorpos.

A consequência da ativação resulta em:

- lise do patógeno ou da célula-alvo;
- **OPSONIZAÇÃO** do microrganismo e consequente aumento da fagocitose;
- produtos solúveis da clivagem dos componentes do complemento. Esses produtos promovem quimiotaxia para fagócitos e induzem inflamação;
- amplificação da resposta imune humoral;
- eliminação de **IMUNOCOMPLEXOS**.

Os componentes do sistema complemento são sintetizados principalmente pelos hepatócitos, no fígado, embora eles também o sejam, em menor quantidade, pelos monócitos, macrófagos e células epiteliais dos tratos gastrointestinal e genitourinário. Esses componentes circulam no soro na forma funcionalmente inativa, como proenzimas ou zimógenos, ou seja, para que eles se ativem, é necessário que haja remoção do fragmento inibitório e/ou mudança conformacional da enzima por clivagem proteolítica, expondo o sítio ativo da enzima.

Evolutivamente, a via alternativa do sistema complemento é encontrada nos deuterostomados, desde os equinodermos (ouriços e estrelas-do-mar) e tunicados até os mamíferos. Isso indica que essa via é a mais antiga do sistema complemento e que surgiu nos animais há mais de 700 milhões de anos. A via alternativa e das lectinas aparece nos agnatas (lampreias), enquanto a via clássica do sistema complemento é observada nos peixes cartilaginosos e ósseos. Veja que interessante!

OPSONIZAÇÃO

Ligação de anticorpos ou componentes do complemento na superfície de antígenos que resultam no aumento da eficiência da fagocitose.

IMUNOCOMPLEXOS

Complexos resultantes da interação antígeno-anticorpo.

O aparecimento da via clássica está estreitamente acompanhado pelo surgimento dos anticorpos nos peixes mandibulados; entretanto, não há registros do sistema complemento nos protostomados (anelídeos, moluscos e artrópodes).

A nomenclatura dos componentes se dá por letras seguidas de número, de acordo com a sua ordem de descoberta, ou somente por letras. Veja o exemplo da via clássica do complemento, cujos componentes são: C1p, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 e C9; na via alternativa, alguns componentes são chamados fatores, tais como: fator B, fator D, fator H e fator P. Quando um componente é proteoliticamente ativado, gera dois fragmentos: um maior, denominado “b”, e um menor, “a”, que é acrescido após o nome do componente. Vejamos o exemplo do componente C3. Ao ser ativado, ele se desdobra em C3b e C3a, que correspondem ao fragmento maior e menor, respectivamente. Como toda regra tem sua exceção, essa também tem a sua, que é o caso do componente C2. Ao ser ativado, esse componente gera os fragmentos C2a e C2b, que são exatamente o contrário dos outros. C2a corresponde ao fragmento maior e C2b corresponde ao menor.

As formas inativas dos componentes são identificadas pela letra i, de inativo, grafada antes de cada fragmento, como, por exemplo, o C4b que, na sua forma inativa, é identificado por iC4b.

Todas as vias de ativação do sistema complemento convergem para o componente C3 que, a partir dele, segue por uma via única até a ativação do último componente, o C9; veja, na **Figura 7.1**, um esquema simplificado das três vias de ativação do sistema complemento. Além disso, é pela ativação espontânea do C3 que se inicia a via alternativa do sistema complemento. Por essas razões, o C3 é considerado o componente principal desse sistema. Assim, vamos conhecer melhor a via alternativa do sistema complemento?

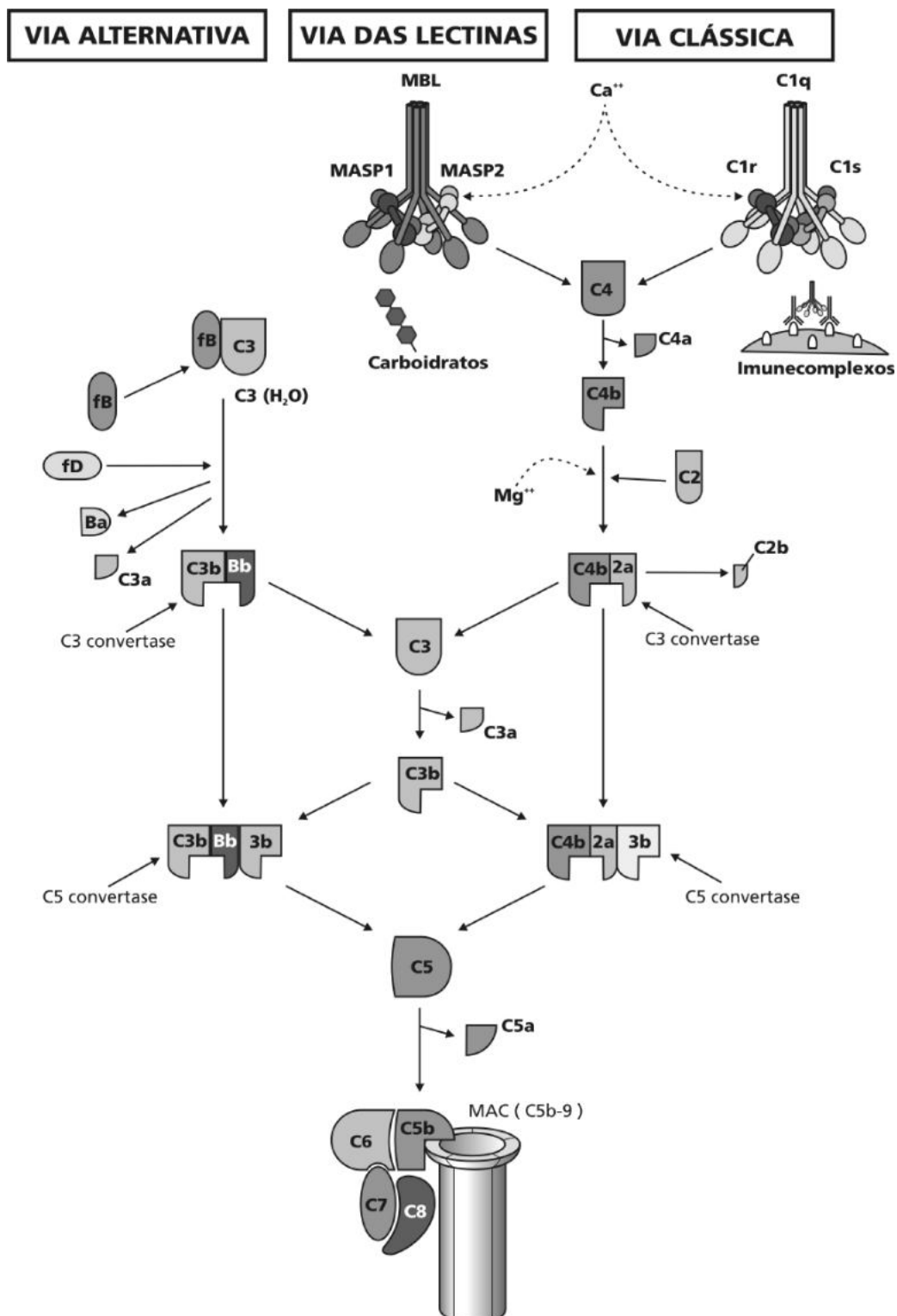


Figura 7.1: Figura representativa da ativação do sistema complemento pelas três vias. Observe as três vias de ativação e os elementos comuns desse sistema que participam das três vias de ativação.

Via alternativa do sistema complemento

A via alternativa do sistema complemento ativa-se diretamente na superfície de muitos patógenos, ou seja, ela pode atuar imediatamente após a entrada do antígeno no organismo hospedeiro. Ao contrário da via alternativa, a via clássica depende do anticorpo para ser ativada. Assim, a via clássica só pode entrar em ação alguns dias após a entrada do patógeno no organismo.

Normalmente, a molécula de C3 presente no plasma é espontaneamente clivada em C3a e C3b numa frequência baixa, porém contínua. O fragmento C3a fica solúvel no plasma, enquanto o fragmento C3b pode ficar também no plasma ou depositar-se na superfície de células do hospedeiro. Nestes dois casos, ele é rapidamente inativado. Entretanto, se o C3b ligar-se covalentemente à superfície de um patógeno, ele permite que o fator B (fB), também presente no plasma, se ligue a ele, formando C3bB. O fB ligado é clivado pelo fator D, gerando Ba, que fica na fase fluídica (no plasma), enquanto Bb permanece formando o complexo C3bBb, conforme podemos ver na **Figura 7.2**. Observe, ainda, nesta figura, que este complexo instável é estabilizado pela **PROPERDINA**. Esse complexo, então, é chamado C3 convertase da via alternativa, que possui a função de clivar (ativar) mais moléculas de C3, constituindo uma alça de amplificação desse sistema. As novas moléculas de C3b, geradas pela C3 convertase, podem se ligar na superfície do patógeno. Dessa maneira, formar mais complexos C3bBb e geram mais C3b, como já descrevemos. Assim, fica fácil entender que várias células do patógeno, presentes no sítio da infecção, serão alvos de moléculas de C3b e subsequente formação da C3 convertase. Ainda na **Figura 7.2**, veja que alguns complexos da C3 convertase da via alternativa permitem a ligação de mais uma molécula de C3b, formando C3bBb3b. Este fato resulta na mudança da especificidade deste complexo que passa, agora, a atuar no próximo componente da cascata, que é o C5. Denominamos esse novo complexo C5 convertase da via alternativa, que inicia a etapa final da ativação do sistema complemento que é comum às três vias de

PROPERDINA

Também conhecido como fator P. É um fator que regula positivamente a via alternativa do sistema complemento. Ela atua estabilizando as C3/C5 convertases desta via.

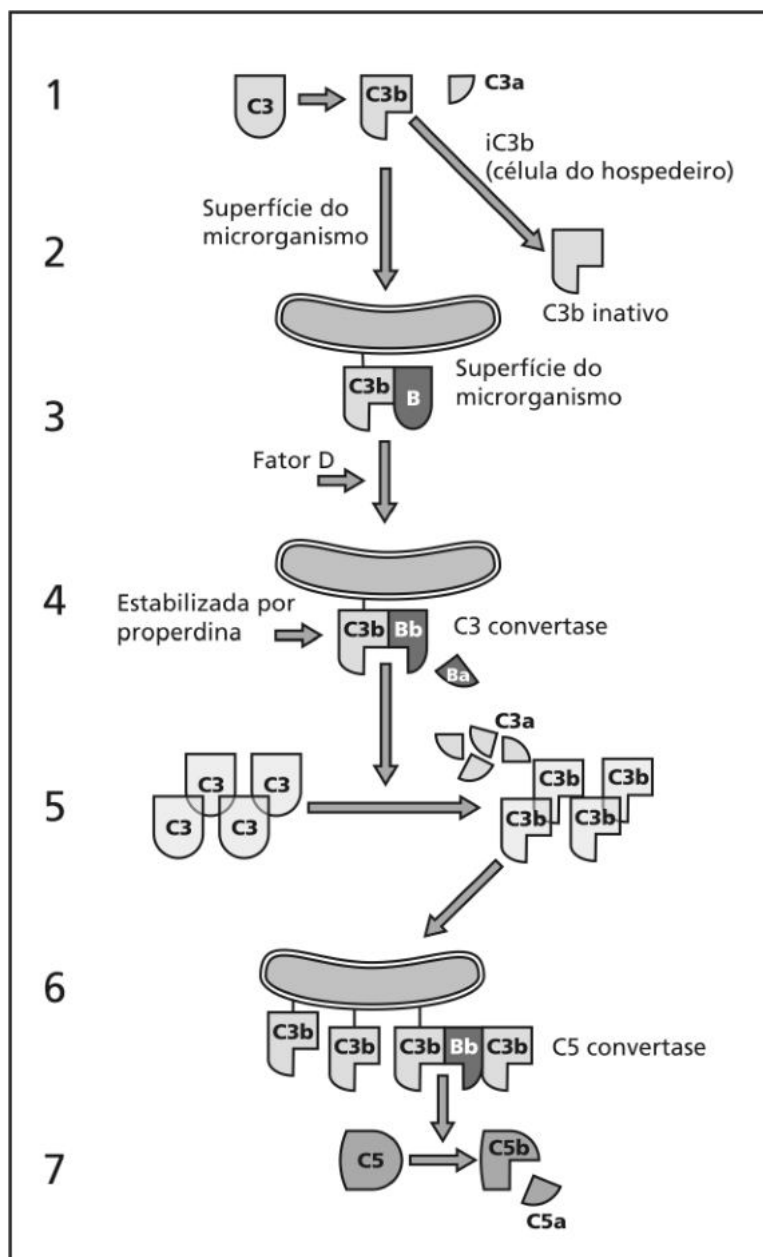


Figura 7.2: Diagrama esquemático da ativação do sistema complemento pela via alternativa. Veja na **Tabela 7.1** os componentes desta via.

ativação desse sistema.

Tabela 7.1: Proteínas que compõem a via alternativa do sistema complemento

Proteína	Estrutura	Concentração no soro (µg/mL)	Função
C3	185 kDa (subunidade α 110 kDa e subunidade β 75 kDa)	1000-1200	C3b liga-se ao antígeno, funciona como opsonina e compõe as C3 e C5 convertases. C3a estimula a inflamação.
Fator B	Monômero de 93 kDa	200	Bb é uma serino-protease; é a enzima ativa das C3 e C5 convertases.
Fator D	Monômero de 25 kDa	1-2	Serino-protease plasmática; cliva o fB ligado ao C3b.
Properdina	Composto por quatro subunidades de 56 kDa	25	Estabiliza C3 convertase (C3Bb) na superfície do antígeno.

Via terminal da ativação do sistema complemento

A consequência biológica da ativação da via terminal ou via lítica do sistema complemento é a lise da célula-alvo, que pode ser bactérias, protozoários, vírus, uma célula infectada por parasitas intracelulares etc. Veja, na **Tabela 7.2**, os componentes dessa via.

As C5 convertases geradas pelas vias alternativa, clássica e lectina iniciam a etapa final da ativação do sistema complemento pela clivagem do componente C5, gerando os fragmentos C5a e C5b. O fragmento menor C5a fica solúvel no soro, enquanto o fragmento maior C5b permanece ligado às outras proteínas do complemento na superfície microbiana. A molécula de C5b, na superfície do patógeno, permite, agora, a ligação dos componentes restantes da cascata C6, C7, C8 e C9, que são estruturalmente relacionadas e não apresentam atividade enzimática. Observe, na **Figura 7.3**, que o complexo C5b ligado a C6 e C7, formando C5b67, na qual o componente C7 é hidrofóbico, insere-se na bicamada lipídica e torna-se um receptor de alta afinidade para C8. O complexo resultante estável, C5b678, permite a ligação de várias moléculas de C9, concluindo a formação do complexo de ataque à membrana MAC (do inglês – *membrane attack complex*), que é um canal transmembrânico formado na superfície microbiana. Este canal, inserido na superfície do patógeno, resulta na perda da integridade da membrana e, por consequência, o desequilíbrio iônico, com a saída de Ca^{++} , entrada de K^{+} e água, que resulta no aumento do volume intracelular, que culmina na lise da célula-alvo.

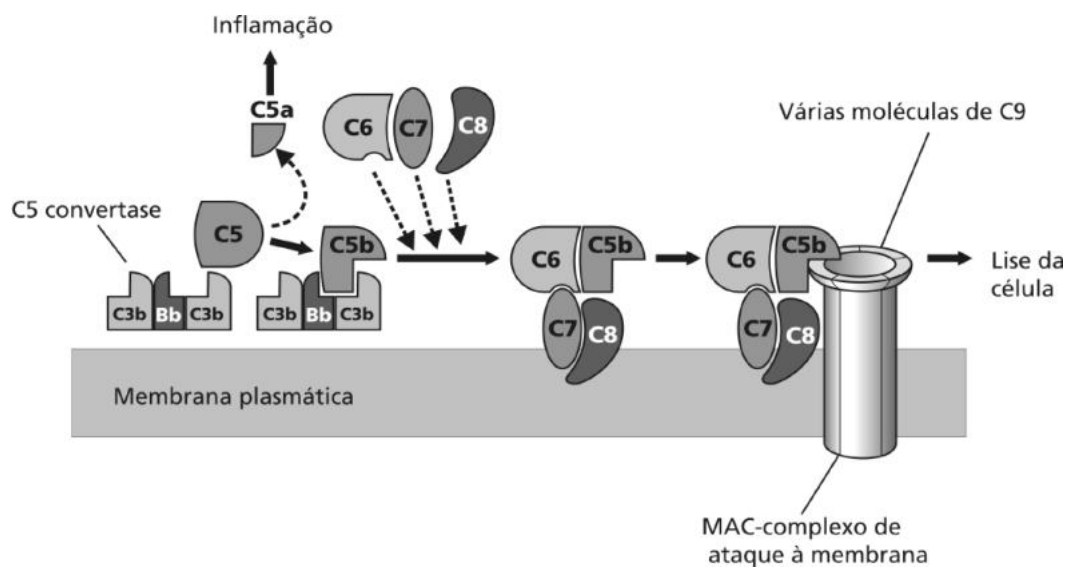


Figura 7.3: Esquema da via terminal da ativação do sistema complemento. Observe a formação do MAC (complexo de ataque à membrana).

Tabela 7.2: Proteínas componentes da via terminal do sistema complemento

Proteína	Estrutura	Concentração no soro (µg/mL)	Função
C5	Dímero de 190 kDa (composta por cadeias de 115 e 75 kDa)	80	C5b inicia a montagem do MAC. C5a estimula a inflamação (ANAFILATOXINA).
C6	Monômero de 110 kDa	45	Componente do MAC. Liga-se ao C5b e é receptor de C7.
C7	Monômero de 100 kDa	90	Componente do MAC. Liga-se ao C5b6 e insere-se na bicamada lipídica.
C8	Trímero de 155 kDa (composto por cadeias de 64, 64 e 22 kDa)	60	Componente do MAC. Liga-se ao C5b67 e inicia a ligação e polimerização do C9.
C9	Monômero de 79 kDa	60	Componente final do MAC. Liga-se ao C5b678 e polimeriza-se, formando um poro na membrana da célula-alvo.

ANAFILATOXINA

Compreende os fragmentos C3a, C4a e C5a derivados da ativação do sistema complemento. Faz quimiotaxia para células inflamatórias e também induz à degranulação de mastócitos, liberando uma grande quantidade de substâncias vasoativas, ou seja, induz à inflamação. Dentre essas substâncias estão as histaminas e a bradicinina, que você já viu na Aula 6 (Anticorpos e Antígenos).

Via clássica do sistema complemento

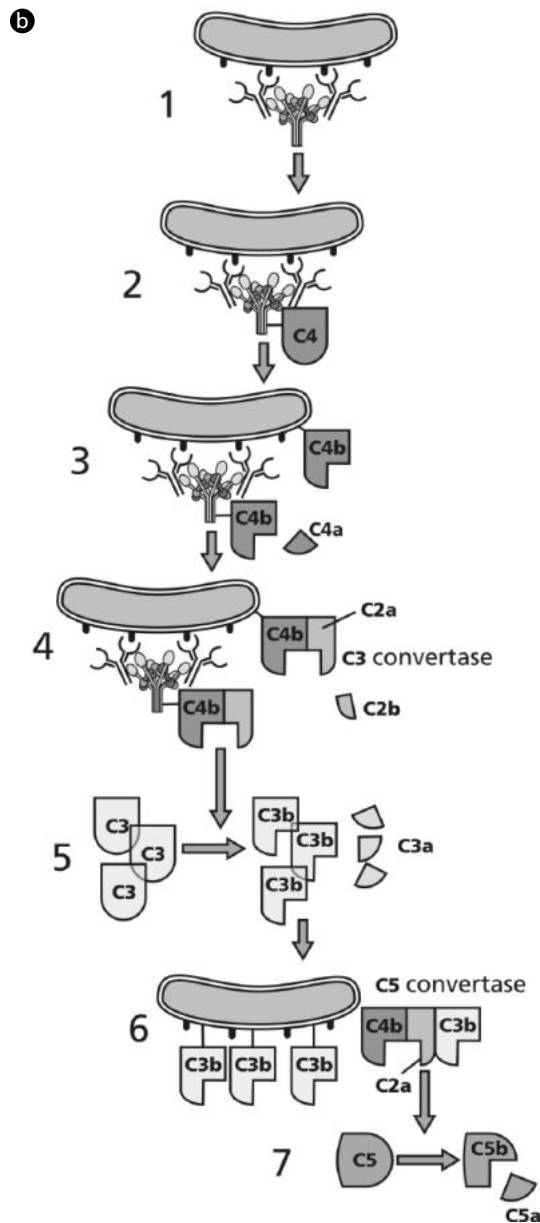
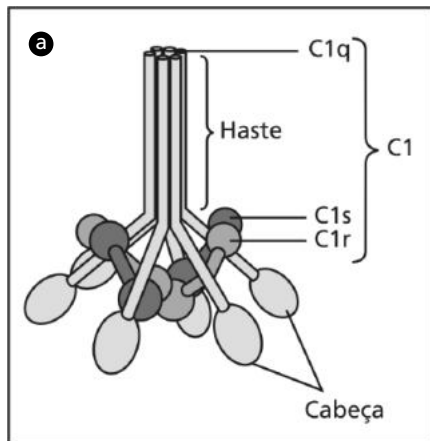
A ativação da via clássica do sistema complemento se inicia pela ligação do primeiro componente desta via, o C1, nos domínios CH2 da IgG ou nos domínios CH3 da IgM que estejam ligadas a um antígeno qualquer, ou seja, formando imunocomplexo. Em humanos, a IgM e as subclasses IgG1 e IgG3 são as imunoglobulinas que fixam complemento de forma mais eficiente. O componente C1 é uma proteína grande, composta por cinco subunidades, sendo uma molécula de C1q, duas de C1r e mais duas de C1s. A molécula C1q tem uma estrutura interessante, que se assemelha a um buquê invertido com seis tulipas. Olhe para a **Figura 7.4.a** com um pouquinho de imaginação. Você vai ver que essa analogia é válida. A molécula de C1q é composta por seis cabeças globulares, sendo cada uma ligada por uma estrutura alongada similar ao colágeno, que se unem formando um cabo central. Para iniciar a ativação da via clássica, é imprescindível que C1q se ligue a duas Fc da molécula de anticorpo, conforme pode ser visto na **Figura 7.4.b**. Para que a IgG ative a via clássica do complemento, são necessárias duas moléculas, enquanto para a IgM é preciso somente uma molécula. Lembre-se de que ela é um pentâmero? Por esta razão, a IgM é uma molécula de anticorpo que fixa melhor complemento que uma IgG. Com a ligação de C1q ao anticorpo complexado ao antígeno, ocorre provavelmente uma mudança conformacional em C1q, a qual acaba por ativar C1r. Quando C1r é ativada, passa a exibir uma atividade enzimática do tipo serino-protease, ativando C1s. É importante ressaltar que a completa ativação desse complexo é dependente de íons Ca^{++} e Mg^{++} . O complexo C1qrs ativado, que também apresenta atividade serino-protease, capacita-o a atuar sobre os próximos componentes C2 e C4, clivando-os. Vamos acompanhar esta reação em cadeia pela **Figura 7.4.b**. Veja também a **Tabela 7.3**; a molécula de C4 se liga ao C1q e é clivada pela C1s, resultando nas moléculas C4a e C4b, fragmentos menor e maior, respectivamente. A molécula resultante, C4a, fica solúvel no plasma e desempenha algumas funções biológicas, que serão vistas mais adiante, enquanto C4b permanece covalentemente ligada ao complexo ou à membrana da célula-alvo. Então, a molécula de C4b permite a ligação de C2, que também é clivada por C1s e resulta em C2a e C2b. O fragmento menor C2b (lembre-se de que esta é uma exceção, o fragmento menor é o b) fica solúvel no plasma, enquanto o

complexo resultante, C4b2a, também conhecido como C3 convertase da via clássica, vai atuar no próximo componente, o C3. A molécula de C3 liga-se ao complexo da C3 convertase pela molécula de C4b e é clivada pela C2a, resultando em C3a e C3b. O fragmento menor, C3a, fica solúvel no plasma e desempenha algumas funções biológicas, que veremos a seguir, enquanto C3b formado pode se ligar covalentemente à superfície celular ou ao anticorpo que iniciou a ativação da via clássica do complemento. A molécula de C3b, ao se depositar, permite a ligação de fB, como na via alternativa, lembra-se? Este fato gera mais C3 convertase, que funciona como uma alça de amplificação, como já falamos na via alternativa, ou seja, uma molécula de C3 convertase pode gerar centenas ou milhares de C3b na superfície da célula-alvo.

Algumas das moléculas de C3b geradas ligam-se ao complexo anterior que vai resultar na formação do complexo C4b2a3b. Este complexo funciona como C5 convertase da via clássica, que vai ativar o componente C5, iniciando a via lítica ou via terminal comum, descrita na Figura 7.3.

Tabela 7.3: Proteínas componentes da via clássica do sistema complemento

Proteína	Estrutura	Concentração no soro (µg/mL)	Função
C1 (C1q ₂ r ₂ s ₂)	750 kDa		Iniciam a ativação da via clássica do sistema complemento.
C1q	460 kDa; hexâmero com três pares de cadeias (22, 23 e 24 kDa).	75 –150	Ligam-se à porção Fc de anticorpos que tenham se ligado a antígenos.
C1r	85 kDa; dímero.	50	Serino-protease; cliva C1s tornando-a ativa.
C1s	85 kDa; dímero.	50	Serino-protease; cliva C4 e C2.
C4	210 kDa; trímero com cadeias de 97, 75 e 33 kDa.	300 – 600	C4b liga-se covalentemente à superfície da célula-alvo. Permite a ligação de C2, para ser clivado pelo C1s. C4a estimula a inflamação (anafilatoxina).
C2	102 kDa; monômero	20	C2a é uma serino-protease e funciona como uma enzima ativa das C3 e C5 convertases.
C3	Veja Tabela 7.1		



1. Ligação de anticorpos a antígeno; ligação de C1 aos anticorpos.
2. Ligação do C4 ao C1q associado a anticorpos.
3. Clivagem do C4 pela enzima C1rs; ligação covalente de C4b aos anticorpos e na superfície do antígeno.
4. Ligação do C2 ao C4b; clivagem do C2 formando o complexo C4b2a (C3 convertase).
5. Clivagem de C3 pela C3 convertase.
6. Ligação do C3b à superfície do antígeno e ao complexo C4b2a.
7. Clivagem do C5; início da via terminal da ativação do complemento.

Figura 7.4: Ativação do complemento pela via clássica. (a) Figura esquemática da molécula de C1qrs. (b) Esquema simplificado da ativação do complemento pela via clássica. Veja também os componentes dessa via na **Tabela 7.3**.



ATIVIDADE

1. Jules Bordet, para provar a existência do sistema complemento, demonstrou que o soro fresco de um coelho imunizado com uma determinada bactéria era capaz de induzir a lise daquela bactéria, se fossem incubados soro e bactéria a 37°C , e que essa atividade lítica se perdia quando o soro era aquecido a 56°C . O que você acha que aconteceria se ele, ao incubar o soro aquecido e a bactéria, acrescentasse também o soro fresco de um outro coelho não-imunizado? E se esse soro fresco fosse de uma outra espécie animal? Nos ensaios-controle desse experimento, o soro fresco do coelho não imunizado e o da outra espécie animal foram incubados com as bactérias e não induziram a lise. Lembre-se de que o soro do coelho imunizado tem anticorpos específicos contra a bactéria, e que os anticorpos são resistentes ao aquecimento de 56°C .

RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu que, nos dois casos, ocorreria a lise das bactérias, você acertou! Parabéns! Mas se você errou, não há motivos para se preocupar. Vamos entender o porquê desse resultado? Bem; no primeiro caso, o soro fresco repôs os componentes do sistema complemento que foram inativados pelo calor. Assim, a presença dos anticorpos específicos que são termorresistentes, junto com os componentes repostos, resultaram na lise das bactérias pela via clássica do sistema complemento. No segundo caso, o soro fresco de uma outra espécie animal repôs os componentes do sistema complemento inativados pelo calor, da mesma forma que no primeiro caso. Os componentes do sistema complemento não são espécie-específicos. É muito comum, pesquisadores que trabalham com sistema complemento utilizarem soro de porquinho-da-índia (cobaia) como fonte de complemento para estudar a função ou a interação do sistema complemento com patógenos, ou mesmo em soros de outras espécies animais previamente inativados pelo calor.

A via das lectinas

LECTINAS

Proteínas que podem se ligar especificamente a carboidratos na superfície celular. Já foram isoladas de várias plantas e animais. Se você quiser saber um pouco mais, reveja a Aula 6 de Biologia Celular.

A via das **LECTINAS** é a última das vias de ativação do sistema complemento a ser descrita. Essa via, basicamente, consiste numa forma distinta de ativar os componentes C2 e C4 da via clássica. A ativação dessa via se inicia com a ligação de lectinas, presentes na circulação, a resíduos de açúcares dos microrganismos. Essa proteína, denominada MBL ou MBP, que significa lectina (proteína) ligadora de manose (manana), do inglês *manose binding lectin* ou *monose binding protein*, respectivamente, se liga principalmente a resíduos de manose, fucose e N-acetil-glicosamina de polissacarídeos encontrados, em abundância, na superfície microbiana. Por ser estruturalmente semelhante a C1q, a MBL pode disparar a ativação do sistema complemento, ativando os componentes C1r e C1s de forma similar ao C1q da via clássica. A outra forma de disparar essa reação é pela ligação da MBL a uma outra enzima chamada MASP (serino-proteinase associada a MBP), do inglês *manose binding lectin associated serine-protease*. Em humanos, são conhecidas como MASP-1 e MASP-2 e encontram-se fisicamente ligadas à MBL. A MASP-1 e a MASP-2 são ativadas, provavelmente, quando a MBL se liga a algum resíduo de açúcar na superfície de algum microrganismo. Como consequência, há a clivagem de C4, dando origem à C4a e C4b, e de C2, dando origem à C2a e C2b, conforme pode ser visto na **Figura 7.5**. A partir da formação desse complexo C4bC2a, essa via prossegue igual à via clássica de ativação do sistema complemento.

Via das lectinas

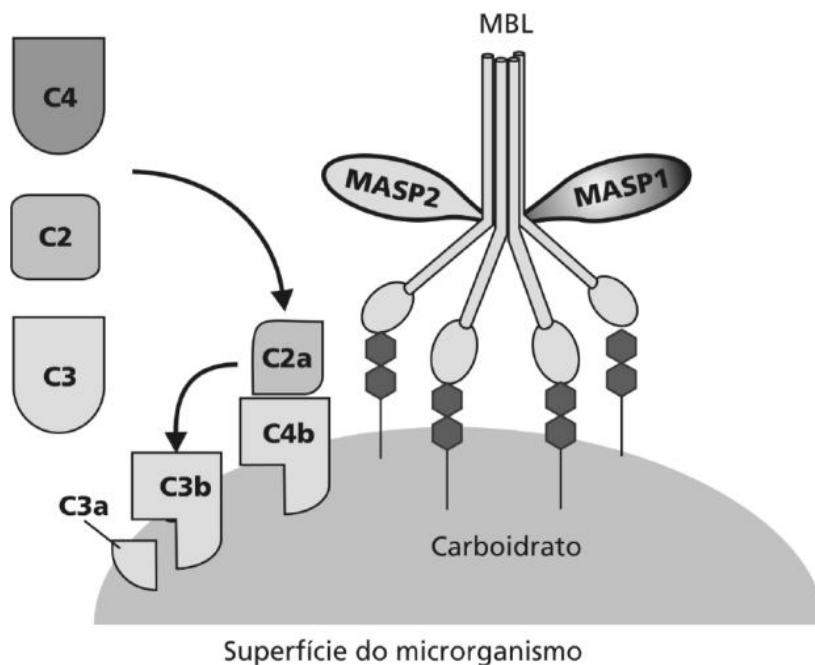


Figura 7.5: Esquema da ativação do sistema complemento pela via das lectinas. Observe a ligação da MBL aos carboidratos na superfície da bactéria.

ATIVIDADE



2. O sistema complemento atua tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida, de acordo com a forma como cada uma das três vias é ativada. Com base no que você já viu nesta disciplina, classifique, justificando, as vias que participam da imunidade inata e as da imunidade adquirida respectivamente.

RESPOSTA COMENTADA

Para que você tenha acertado, deve ter respondido assim: a via clássica pertence à imunidade adquirida, porque depende de anticorpos para que ela se inicie. As vias alternativa e das lectinas pertencem à imunidade inata, pois não dependem de elementos produzidos pela imunidade adaptativa para que aconteçam, ou seja, essas duas vias podem ser ativadas, em seguida à invasão do patógeno no organismo. Se você acertou, parabéns! Mas, se você errou, vamos esclarecer um pouco mais este assunto? Bem, você já sabe que o anticorpo é produzido pela célula B ativada, e que isso acontece quando um linfócito B reconhece especificamente um antígeno através do seu receptor BCR. Como já vimos na Aula 2 desta disciplina, essa especificidade refinada caracteriza a imunidade adaptativa. Assim, fica fácil concluir que a via clássica do complemento pertence à imunidade adaptativa, por depender do anticorpo para ser ativada. Por outro lado, as vias alternativa e das lectinas pertencem à imunidade inata, porque os elementos que iniciam essas duas vias ligam-se diretamente na superfície do antígeno por interações químicas. O C3 da via alternativa liga-se de forma covalente na superfície da célula-alvo, enquanto a MBL liga-se a resíduos de açúcares na superfície dos micróbios. Esperamos ter esclarecido as suas dúvidas; caso isso não tenha acontecido, procure os tutores da disciplina para resolvê-las ou mande um e-mail.

Como falamos da ligação do C3 nessa atividade, vamos entender melhor como se processa a ligação química do C3 com a superfície celular? Bem, a molécula de C3 é composta por duas subunidades: uma α e uma β , e possui internamente um grupamento do tipo tiol-ester na cadeia α . Observe, na **Figura 7.6**, que o C3, ao ser clivado, libera C3a, que é um pequeno fragmento da cadeia α ; assim, essa cadeia expõe o grupamento tiol-ester na molécula C3b. Ainda nesta figura, observe que este grupamento exposto é instável e fica sujeito a um ataque nucleofílico pelo átomo de oxigênio ou nitrogênio, que resulta na formação de ligações covalentes com proteínas ou carboidratos na superfície de células-alvo. Entretanto, se a molécula de C3b não se ligar a nenhuma estrutura celular, ela é rapidamente inativada por hidrólise do grupamento tiol-ester. A molécula de C4b da via clássica e, também, a da via das lectinas, utiliza-se deste mesmo princípio para se fixar na superfície das células-alvo.

Molécula intacta de C3 evidenciando o grupamento tiol-éster

Clivagem da cadeia α de C3 pela C3 convertase

Grupamento tiol-éster exposto em C3b

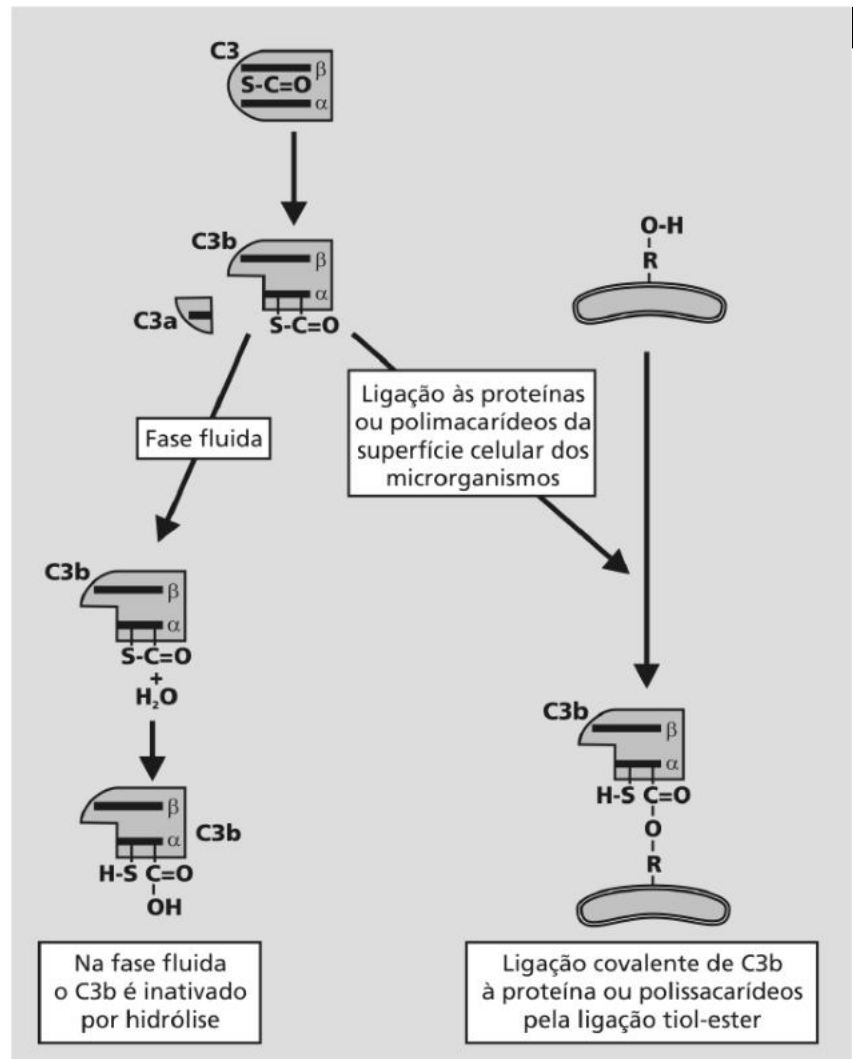


Figura 7.6: Ligação da molécula de C3 à superfície celular. Observe a exposição do grupamento tiol-éster na molécula de C3b e a sua ligação à célula-alvo ou a sua inativação no meio líquido.

REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

Você já viu, nessa aula, que alguns elementos gerados pela ativação do sistema complemento, potencialmente, podem se ligar à superfície das células do próprio hospedeiro como também às células do organismo invasor. Assim, fica fácil entender a existência de mecanismos reguladores bastante precisos para impedir a ocorrência de lise das células do hospedeiro ou um consumo exagerado de seus componentes. Um mecanismo geral de regulação, presente em todas as vias de ativação, é a geração de componentes altamente lábeis que sofrem inativação espontânea, caso não reaja, rapidamente, com outros componentes para serem estabilizados, como é o caso do C3b, cujo tempo nessa forma ativa é de apenas microssegundos a segundos. Algumas dessas proteínas reguladoras ficam solúveis no plasma, enquanto outras encontram-se ligadas à membrana celular.

Proteínas reguladoras solúveis

Como podemos ver, na **Tabela 7.4**, existem várias proteínas solúveis que regulam o sistema complemento. Vamos entender como funcionam estas proteínas para que este sistema não cause danos ao nosso organismo?

Tabela 7.4: Proteínas que regulam o sistema complemento

Proteína	Forma da proteína	Via que interfere	Função
Inibidor de C1 (C1 INH)	Solúvel	Clássica	Inibidor de serino-protease; causa a dissociação de C1rs de C1q.
Proteína ligadora de C4b (C4bBP)	Solúvel	Clássica e lectina	Bloqueia a formação da C3 convertase pela ligação ao C4b; funciona também como co-fator para a clivagem de C4b pelo fator I.
Fator H	Solúvel	Alternativa	Bloqueia a formação da C3 convertase pela ligação ao C3b; funciona também como co-fator para a clivagem de C3b pelo fator I.
Receptor de complemento tipo 1 (CR1). Proteína co-fator de membrana (MCP)	Ligado à membrana	Clássica, alternativa e lectina	Bloqueia a formação da C3 convertase pela ligação a C3b ou C4b; funciona como co-fator para que o fator I clive C4b e C3b.

Fator de aceleração do decaimento (DAF ou CD55)	Ligado à membrana	Clássica, alternativa e lectina	Acelera a dissociação das C3 convertases C4b2a e C3bBb (vias clássica e alternativa, respectivamente).
Fator I	Solúvel	Clássica, alternativa e lectina	Serino-protease que cliva os componentes C4b e C3b usando como co-fator: C4BP, CR1, fator H, DAF e MCP.
Proteína S	Solúvel	Terminal	Liga na forma solúvel do complexo C5b67 e impede a sua inserção na membrana.
Fator de restrição homólogo (HRF). Inibidor da lise reativa de membrana (MIRL ou CD59)	Ligado à membrana	Terminal	Liga ao complexo C5b678 na célula autóloga e impede a ligação do componente C9.
Inativador da anafilatoxina	Solúvel	Efetora	Inativa a atividade das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a pela retirada da arginina carboxi-terminal dessas moléculas.

1– Inibidor de C1 (C1INH) – O C1INH pertence a uma família de proteínas chamadas serpinas, que são proteínas inibidoras da enzima serino-proteases. Em condições fisiológicas, o inibidor de C1 encontra-se constantemente ligado a esta molécula, porém de forma reversível. Com a ligação de C1q a, pelo menos, duas moléculas de anticorpo pela fração Fc, lembre-se de que o anticorpo deve estar ligado ao antígeno. Ocorre o deslocamento de C1INH e uma rápida ativação dos componentes C1r e C1s, os quais promovem a clivagem de C4 e C2. Observe, na **Figura 7.7.a**, que o inibidor de C1 volta a se ligar, agora, de forma irreversível ao domínio catalítico destas duas serino-proteases, evitando que C1 continue a clivar C4 e C2. Além disso, promove o desligamento destas enzimas do C1q.

2– Fator I (fI) – É responsável pela clivagem de C4b em iC4b e, posteriormente, em C4c e C4d, e pela clivagem de C3b em iC3b e, a seguir, em C3c e C3dg. Apesar de estes fragmentos, gerados pela ação do fator I, exercerem outras funções biológicas importantes, eles não são capazes de gerar C3 convertases e C5 convertases e, conseqüentemente, a ativação do sistema complemento fica interrompida. Para que fI possa atuar, ele necessita da participação de outros componentes reguladores que funcionem como co-fatores, que são C4bBP, fator H, CR1 e MCP.

O fI é fundamental para evitar o consumo excessivo de C3 pela geração exagerada de C3 convertases. Na ausência de fI, os níveis plasmáticos de C3 são drasticamente reduzidos e acarretam maior susceptibilidade do indivíduo a algumas infecções.

3– Fator H (fH) – É um importante co-fator de fI que, ao interagir com C3b, favorece a sua clivagem pelo fI. Além disso, o fH também acelera o decaimento funcional da C3 convertase das vias alternativa e clássica.

4– C4BP (proteína ligadora de C4b) – esta proteína se liga ao fragmento C4b e atua como co-fator, para que fI possa inativar C4b. Adicionalmente, C4bBP tem a função de acelerar o decaimento da atividade funcional da C3 convertase da via clássica (C4b2a).

5– Vitronectina ou proteína S – veja, na **Figura 7.7.d**, esta proteína reguladora, que compete com o componente C8 para se ligar ao complexo C5b67 da via terminal do sistema complemento.

6– Inibidor de anafilatoxina – proteína presente no plasma, responsável pela inativação das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, que são responsáveis pela quimiotaxia de células inflamatórias e pela indução da inflamação.

Proteínas reguladoras presentes na membrana celular

1– MCP (proteína co-fator de membrana) – proteína transmembranar de cadeia única que atua como co-fator de fI na clivagem de C3b e C4b, como pode ser visto na **Figura 7.7.c**. Esta molécula também pode atuar desfazendo o complexo C4b2a. O MCP está presente em todos os leucócitos sangüíneos e plaquetas, mas não em eritrócitos. Além disso, essa proteína é encontrada em fibroblastos, em células epiteliais, no rim, no baço etc. É abundante também em espermatozóides, trofoblastos e células do trato genitourinário, indicando que ela desempenha um papel importante na fertilidade.

2– DAF (fator de aceleração do decaimento) – esta proteína encontra-se ancorada à membrana por uma molécula de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Lembra-se deste assunto em Biologia Celular I? Se você tiver dúvidas, dê uma revisada na Aula 8; ela fala sobre a GPI. O DAF é encontrado na maioria das células, incluindo células endoteliais, eritrócitos e leucócitos. Esta proteína funciona como acelerador do decaimento da atividade funcional de C3 convertase e C5 convertase,

formada na superfície das células do hospedeiro. Veja, na **Figura 7.6.b**, que, ao se ligar ao fragmento C3b, o DAF desfavorece a ligação de C2a ao C4b ou Bb ao C3b ou pode, também, desligar estas duas moléculas ligadas ao C4b e C3b, respectivamente, interferindo, assim, na formação e manutenção dessas convertases.

3– CR1 (receptor de complemento 1) – acelera o decaimento de C3 convertase e C5 convertase e, além disso, funciona também como co-fator de f1. O CR1 também apresenta algumas funções similares ao DAF; veja na **Figura 7.7.b**. Esta molécula está presente em eritrócitos, monócitos, macrófagos e eosinófilos.

4– HRF (fator de restrição homóloga) – proteína de cadeia única que também está ancorada à membrana por uma molécula de GPI. Este fator se liga aos complexos C5b678 e C5b6789, inibindo a formação do MAC. O HRF já foi descrito na superfície de hemácias, plaquetas, leucócitos etc.

5– CD59 – também conhecida como inibidor da lise reativa de membrana; é melhor chamá-la CD59, você não acha? Você se lembra da nossa Aula 3? Falamos da classificação por CD das proteínas de membrana, cujo objetivo era evitar nomes complicados e duplicidade de nome para a mesma estrutura. O CD59 é também uma proteína ancorada na membrana por uma molécula de GPI e funciona da mesma forma que o HRF, isto é, bloqueando a formação do MAC ao se ligar aos complexos C5b678 e C5b6789, como você pode ver na **Figura 7.7.d**. A sua presença é detectada em várias células, incluindo sangüíneas, endoteliais e epiteliais.

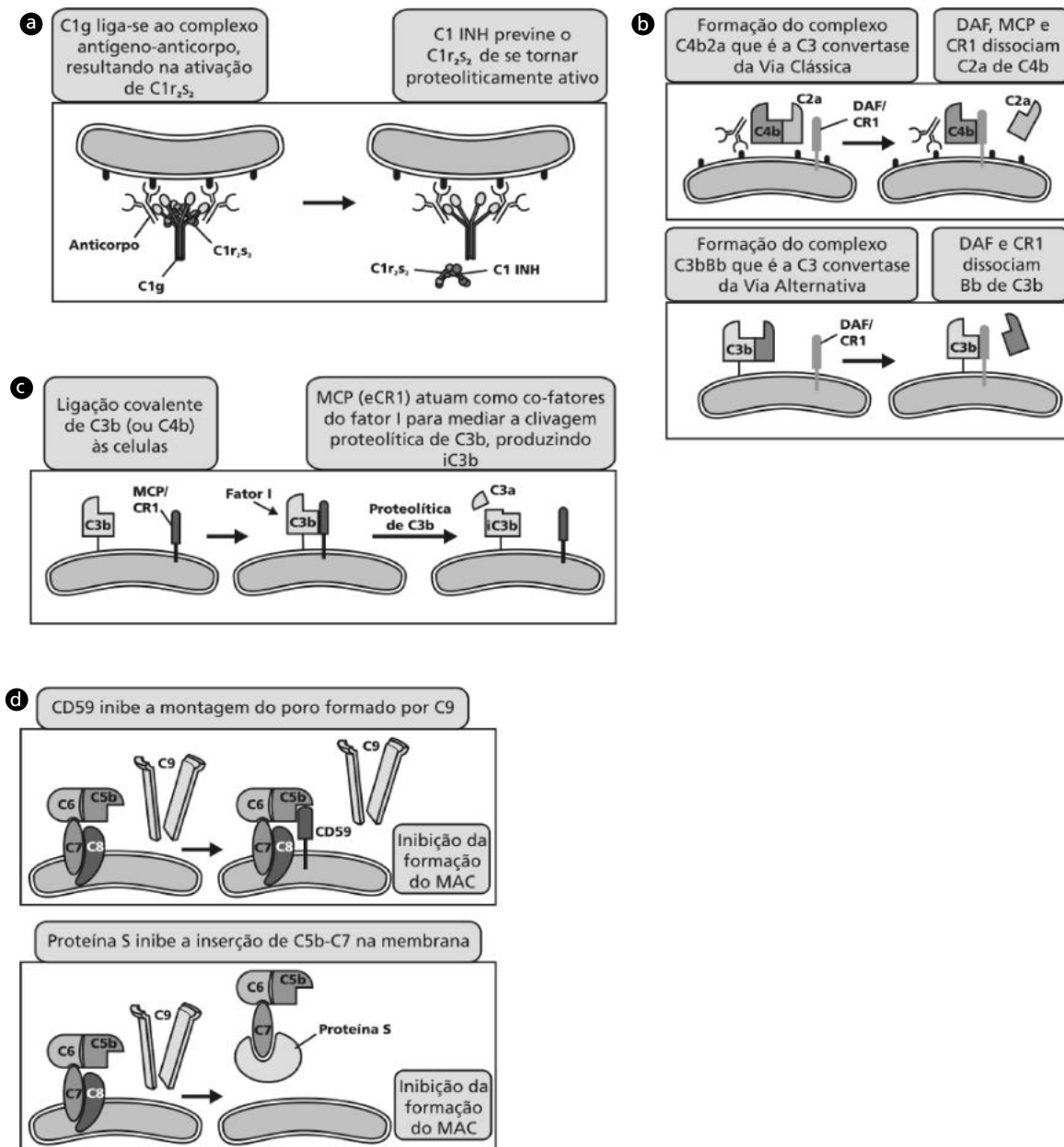


Figura 7.7: Proteínas que regulam o sistema complemento. (a) Proteína C1INH, que inibe o complexo C1qrs da via clássica. (b) Proteínas que regulam as C3 convertases das vias clássica e alternativa. (c) Proteínas que funcionam como co-fatores para o fator I. (d) Proteínas que interferem na formação do MAC.



Como você viu nesta aula, as moléculas reguladoras do sistema complemento são de fundamental importância para impedir que este sistema não ataque as suas próprias células. Entretanto, os milhares/milhões de anos de co-evolução entre parasita e hospedeiro fizeram com que parasitas desenvolvessem vários mecanismos de evasão da resposta imune, para que pudessem sobreviver nos hospedeiros. Vamos citar, como exemplo, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de chagas. Entre os mecanismos de evasão da resposta imune que este parasita possui, um deles é o T-DAF, que é uma molécula com a mesma função do DAF em humanos, ou seja, o T-DAF inibe a função das C3 e C5 convertases, impedindo que o sistema complemento atue sobre ele. Essa molécula foi descoberta por um grupo de pesquisadores brasileiros liderado pela Dra. Thereza L. Kipnis, da UENF, e foi publicado na revista *Infection and Immunity* (61), em 1993.

RECEPTORES PARA OS PRODUTOS DERIVADOS DO SISTEMA COMPLEMENTO

Como você já viu nesta aula, o resultado final da ativação do sistema complemento é induzir a lise da célula-alvo. Entretanto, este sistema participa de outras funções biológicas importantes, que são mediadas pela ligação de fragmentos derivados da sua ativação a receptores expressos em vários tipos celulares. Vamos ver, na **Tabela 7.5**, onde estão resumidos os receptores do sistema complemento, as células em que eles estão presentes e as consequências biológicas decorrentes da ligação desses receptores.

Tabela 7.5: Proteínas componentes da via clássica do sistema complemento.

Receptor	Principais células onde são expressos	Ligantes / principais funções biológicas
C1qRp	Células mielóides, células endoteliais e plaquetas	C1q e MBL. Participa da fagocitose de partículas ou de restos celulares opsonizados por C1q e MBL.
C3aR	Neutrófilos, monócitos, eosinófilos, astrócitos, neurônios e células da glia	C3a. Participa da degranulação de mastócitos e basófilos.
C5aR	Granulócitos, monócitos, mastócitos, células endoteliais, epiteliais e da glia	C5a. Participa da quimiotaxia; liberação de histamina; geração de radicais de O ₂ reativo e aumento da expressão de moléculas de adesão. Lembre-se das CAMs da nossa Aula 5?

CR1	Hemácias, linfócitos B, polimorfonucleares, monócitos, células foliculares dendríticas	C3b, C4b e, com menor afinidade, para iC3b. Promove a fagocitose de partículas opsonizadas por esses fragmentos. Participa da remoção de imunocomplexos na circulação. Co-fator do fator I na clivagem de C3b em iC3b e C3f, e também, na clivagem de iC3b em C3c e C3d. Além disso, acelera o decaimento funcional das C3 e C5 convertases da via clássica.
CR2	Linfócitos B maduros e células foliculares dendríticas	C3dg, C3d, iC3b e EBV (ver boxe de atenção). Participa na ativação do linfócito B e na produção de anticorpos.
CR3	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e NK	iC3b. Participa da fagocitose e desencadeia a explosão respiratória (ver boxe de atenção). Aumentam a expressão de CAMs em monócitos e neutrófilos, para que migrem para o sítio da inflamação. Aumenta a fagocitose mediada por receptores de Fc de imunoglobulina.
CR4	Neutrófilos, monócitos e macrófagos	iC3b. Participa da fagocitose e medeia a adesão de neutrófilos e eosinófilos ao endotélio.



EBV – Vírus Epstein-Barr. Este vírus é o agente etiológico da mononucleose infecciosa em humanos. Ele infecta principalmente os linfócitos B e usa o CR2 para se ligar à superfície dessas células e infectá-las.

Explosão respiratória – rápido aumento na atividade metabólica de macrófagos e neutrófilos, na qual é produzida uma grande quantidade de reativos intermediários de oxigênio, tais como ânion superóxido, hidroxila e peróxido de oxigênio, que são liberados principalmente nos vacúolos fagolisossomais para matar os microrganismos fagocitados.

ATIVIDADE



3. Um imunologista especialista em complemento, querendo saber a função do fator I, resolveu conduzir o seu estudo num modelo animal deficiente desse componente. Para isso, ele produziu um camundongo *knockout* para o fator I (veja a Aula 4 dessa disciplina, caso você tenha dúvida acerca de *knockout*). Ao estudar o camundongo deficiente do fator I, ele percebeu que o animal apresentava maior susceptibilidade a algumas infecções bacterianas e, ao analisar a produção de C3, viu que ela era normal. Entretanto, os níveis de C3 no soro eram extremamente baixos. Como você explicaria a concentração sérica de C3 tão baixa, uma vez que a sua produção era normal?

RESPOSTA COMENTADA

Você deve ter respondido que este fato ocorreu porque o fator I é o principal componente responsável pela regulação da geração de C3b, pois ele atua clivando o C3b, impedindo a geração de C3 convertase da via alternativa. Vale lembrar que este mesmo mecanismo acontece com o C4b. Para que o fator I clive o C3b em subfragmentos C3c e C3d, é essencial que esta molécula esteja ligada aos co-fatores CR1 na membrana plasmática ou ao fator H, que é uma proteína plasmática (solúvel no plasma). Dessa forma, fica fácil concluir que, na ausência do fator I, há uma geração maior de C3 convertase e, conseqüentemente, o consumo exagerado de C3 circulante, o que justifica os níveis baixos de C3 sérico no camundongo knockout para o fator I.

FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO SISTEMA COMPLEMENTO

Como comentamos no início desta aula, o sistema complemento atua na imunidade inata e adquirida. Vamos ver agora como a ativação do complemento resulta em funções efetoras tanto na imunidade inata como na adquirida. Podemos citar as principais:

1. Promover a fagocitose dos organismos que induzem a ativação do complemento.
2. Induzir a inflamação;
3. Induzir a lise daqueles organismos.

Opsonização e fagocitose

Os micróbios nos quais o complemento é ativado pela via clássica ou alternativa são alvos da ligação dos fragmentos C3b, iC3b ou C4b e têm a sua fagocitose facilitada pela existência de receptores para esses componentes na superfície de macrófagos e neutrófilos; veja como isso

ocorre pela **Figura 7.8.a**. Os fragmentos C3b e C4b se ligam ao receptor CR1, enquanto o iC3b se liga aos receptores CR3 e CR4. O CR1, *per se*, é ineficiente em promover a fagocitose de microrganismos ligados por C3b, porém, a fagocitose é incrementada, caso esse organismo esteja também ligado a uma IgG que, simultaneamente, liga CR1 com o receptor de Fc (receptor de Fc de anticorpo) na superfície dos fagócitos. A fagocitose de microrganismos, via C3b e iC3b, se constitui como um mecanismo importante de defesa inato e adaptativo nas infecções. Para que este assunto fique mais claro, vamos ver um exemplo da associação da fagocitose e do complemento na defesa do hospedeiro? Nas infecções por bactérias que têm a cápsula rica em polissacarídeos, tais como pneumococos e meningococos, a proteção é mediada pela imunidade humoral. Nessas infecções, os anticorpos IgM direcionados contra os polissacarídeos bacterianos ativam o complemento pela via clássica, e os componentes opsonizantes, gerados pela sua ativação, induzem a eliminação desses patógenos, via fagocitose, que ocorre no baço. Este é o motivo pelo qual indivíduos que não têm o baço (esplenectomia cirúrgica após traumas, por exemplo) são mais susceptíveis a infecções generalizadas por pneumococos ou meningococos. A deficiência de C3 em humanos ou em camundongos está associada às infecções sérias e freqüentes por bactérias piogênicas (que induzem a formação de pus), que podem ser fatais. Este fato ilustra o papel central do C3 na opsonização e aumento da fagocitose para destruição destes microrganismos.

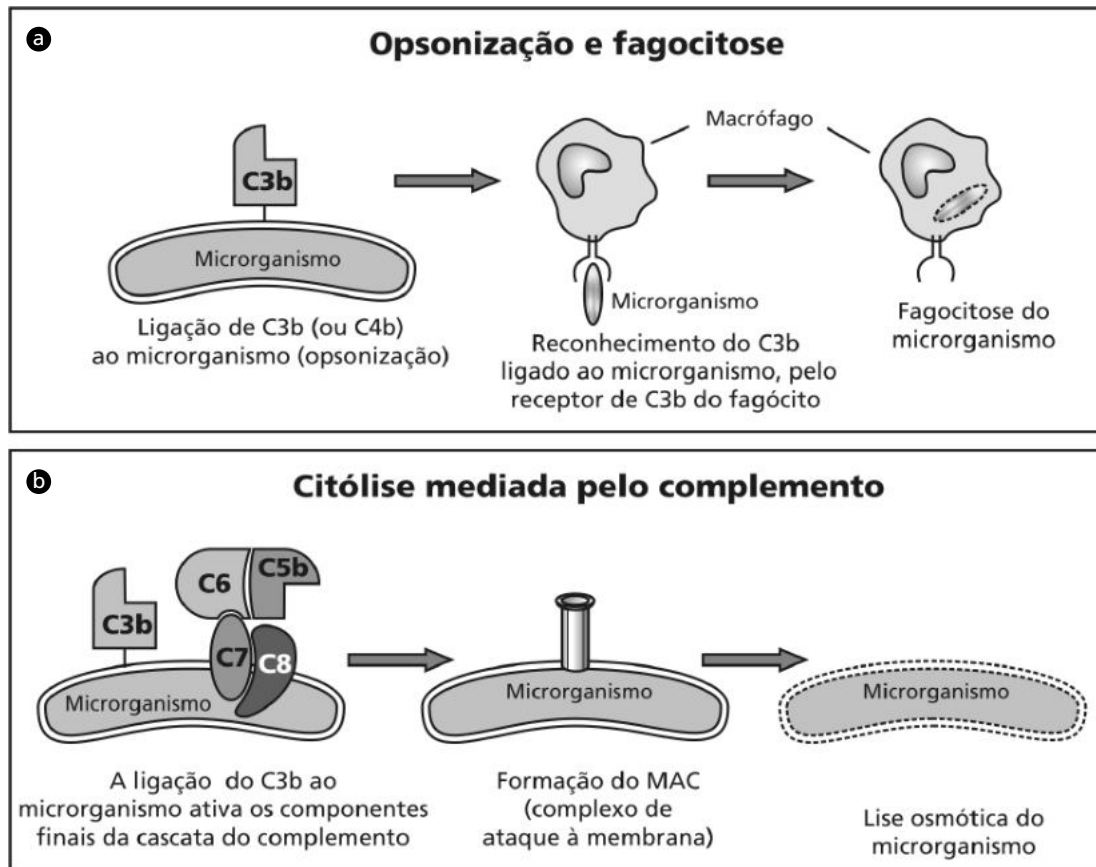


Figura 7.8: Funções biológicas do sistema complemento. (a) Opsonização e fagocitose de microrganismo. (b) Lise de microrganismo mediado pelo complemento.

Resposta inflamatória

Os fragmentos peptídicos resultantes da ativação do sistema complemento C5a, C4a e C3a induzem inflamação aguda pela ativação de mastócitos e neutrófilos. Todos estes três peptídeos podem se ligar a mastócitos e induzem a sua degranulação, liberando mediadores vasoativos, tais como a histamina. Você certamente deve se lembrar da Aula 5 sobre inflamação, não é mesmo? Em neutrófilos, o C5a aumenta a motilidade e, associado aos mediadores vasoativos liberados pelos mastócitos, modulam positivamente a expressão de moléculas de adesão (CAMs) no endotélio dos vasos e no próprio neutrófilo, que resulta na sua migração ao sítio da inflamação. Um mecanismo similar acontece com outras células que também são atraídas para o foco inflamatório a fim de combater o patógeno presente no local.

Lise celular mediada pelo complemento

O MAC, formado pela via terminal do sistema complemento, pode induzir a lise de bactérias, principalmente gram-negativas, parasitas, vírus, eritrócitos e células nucleadas. Veja na **Figura 7.8.b**. A maioria dos vírus envelopados são susceptíveis à lise mediada pelo complemento, uma vez que o envelope viral é derivado da membrana plasmática da célula infectada. Dentre esses vírus, podemos citar os herpesvirus, orthomyxovirus (ex.: vírus influenza), paramyxovirus (ex: parainfluenza) e retrovirus (ex.: HIV). Em relação às bactérias, a maioria das gram-negativas são passíveis de lise mediada pelo complemento, com exceção da *escherichia coli* e *salmonella* que, por exemplo, são resistentes. Já as gram-positivas, geralmente, são resistentes à ação do sistema complemento devido a uma camada espessa de peptidoglicana na parede celular que previne a inserção do MAC.

Outras funções biológicas mediadas pelo complemento

Uma resposta imune com níveis elevados de anticorpos contra antígenos circulantes resulta na formação de uma pequena quantidade de imunocomplexos. Se estes imunocomplexos se acumularem na circulação, podem formar agregados, ser depositados na parede dos vasos e induzir inflamação, causando uma flebite (inflamação de vasos sanguíneos). A interação do complemento com os imunocomplexos impede que se formem os agregados. Além disso, os imunocomplexos associados à C3b ligam-se às hemácias pelo receptor CR1 que são carregados para o baço, onde os imunocomplexos são fagocitados. Este mecanismo de eliminação de imunocomplexos é particularmente importante em indivíduos que têm uma doença inflamatória auto-imune denominada **LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**, na qual são produzidos anticorpos contra as proteínas do próprio indivíduo. Esses anticorpos formam complexos com os antígenos do indivíduo e, caso não sejam eliminados, depositam-se nos tecidos, causando inflamação.

LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

É uma doença inflamatória sistêmica crônica que segue uma evolução com exacerbações e remissões alternadas. A sua causa ainda é desconhecida. Na fase ativa da doença pode ocorrer o comprometimento de vários sistemas orgânicos, tais como articulações e músculos, pele, rins, pulmões, coração, olhos, gastrointestinal, vascular etc. Esta doença se caracteriza pela presença de vários auto-anticorpos, principalmente contra os antígenos nucleares que incluem as histonas, ribonucleoproteínas, DNA de fita simples ou dupla. São observados, também, a deposição de imunoglobulinas nos rins e na junção dermoepidérmica e o declínio dos níveis séricos de complemento durante a fase exacerbada da doença. Os fatores de risco genético estão relacionados a deficiências dos componentes iniciais da via clássica do sistema complemento.

O fragmento C3d, derivado da clivagem do C3b na superfície do antígeno, pode se ligar à célula pelo receptor CR2. Essa ligação pode acontecer de forma simultânea com o reconhecimento do antígeno pelo receptor de célula B. Essa ligação conjunta induz a uma ativação de linfócitos B muito mais eficiente. A ligação do C3d ao CR2 no linfócito B, devido à sua capacidade de incrementar a ativação dos linfócitos B, pode ser considerada como um segundo sinal de ativação para essa célula. Essa analogia é baseada no fato de que, nos linfócitos T, o segundo sinal, dado por moléculas co-estimulatórias, é imprescindível para a ativação. Este tema será abordado adequadamente na Aula 13 desta disciplina.

Você viu, nessa aula, que o sistema complemento se constitui como um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral e faz interface entre a imunidade inata e a adaptativa. A ativação do complemento resulta em destruição da célula-alvo, indução da inflamação, ativação de células B, incremento da fagocitose etc. Assim, podemos dizer que o sistema complemento funciona, também, como um elemento importante de integração entre os vários elementos que compõem a resposta imune.

ATIVIDADE FINAL

Vamos retornar à Atividade 1 e repeti-la com algumas modificações. O soro do coelho imunizado com a bactéria foi utilizado para purificar anticorpos, ou seja, por métodos imunoquímicos, separamos os anticorpos de outras proteínas constituintes do soro. Esses anticorpos purificados foram separados em tubos A, B e C, e submetidos aos seguintes tratamentos:

Tubo A – foi tratado com papaína (reveja a Aula 6, sobre anticorpos, caso tenha dúvidas);

Tubo B – foi tratado com pepsina;

Tubo C – não foi submetido a nenhum tratamento;

Tubo D – controle (soro fresco do coelho mais bactéria).

Após esses tratamentos, os anticorpos foram incubados com as bactérias mais soro fresco de um coelho não imunizado com a bactéria. O que você acha que aconteceu com as bactérias? Elas sofreram lise ou não?

RESPOSTA COMENTADA

Se você respondeu que a lise da bactéria só ocorreu no tubo C, você acertou! Parabéns! Caso você tenha errado, vamos entender o porquê? Os anticorpos submetidos aos tratamentos enzimáticos estão na forma Fab' ou na F(ab')₂. Lembra-se da Aula 6, de anticorpos? Pois bem, estes anticorpos estão desprovidos de Fc, que é essencial para que ocorra a ativação do complemento pela via clássica. No tubo C, aconteceu a lise das bactérias porque ocorreu ativação do complemento pela via clássica, já que os anticorpos estavam íntegros.

RESUMO

O sistema complemento é um sistema bioquímico complexo, multicompetente, composto por, aproximadamente, 30 moléculas que se ligam covalentemente a estruturas na superfície dos patógenos. Ele pode ser ativado por três vias distintas e resultar na destruição do antígeno. A via alternativa e a via das lectinas não dependem de anticorpos para serem iniciadas, ao contrário da via clássica, que é dependente de anticorpos. Por ser um sistema composto por vários elementos, também é regulado por vários componentes que são distribuídos ao longo da cascata do sistema. As funções biológicas decorrentes da ativação do sistema complemento resultam, principalmente, em lise da célula-alvo e indução da inflamação.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, iremos fazer uma aula prática. Você vai ver como pode ser produzido um soro hiperimune, ou seja, como imunizar um animal para que ele produza anticorpos específicos contra um determinado antígeno. Vamos praticar uma técnica chamada imunodifusão radial, que nos permite visualizar uma reação de tipo antígeno anticorpo. Prepare-se! Essa é uma oportunidade de ver, na prática, alguns conceitos que já vimos até agora. Até lá!...

Aula prática: interação antígeno e anticorpo

AULA 8

Meta da aula

Demonstrar a reação antígeno x anticorpo e as suas aplicações.

objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Descrever e interpretar a imunodifusão dupla radial.
- Entender o princípio dos testes de diagnóstico baseado na interação antígeno-anticorpo.

Pré-requisitos

Para que você possa acompanhar adequadamente esta aula, é importante que você tenha bem claro os conceitos sobre anticorpos apresentados nas Aulas 2 e 6 desta disciplina.

INTRODUÇÃO

Você já viu, na Aula 6 desta disciplina, que os anticorpos são produzidos pelo linfócito B ou plasmócito. Esse processo se inicia com reconhecimento do antígeno pelo receptor da célula B, o BCR, seguido da interação com a célula T. Essa interação resulta na ativação do linfócito B que se transforma em plasmócito e produz uma grande quantidade de anticorpos. Os anticorpos, *per se* ou associados a outros mecanismos efetores da resposta imune (falaremos nas Aulas 14 e 15), culminam, em geral, na proteção do indivíduo. Falamos, também, na Aula 6, que os anticorpos constituem-se uma ferramenta importante na pesquisa básica e aplicada na clínica e diagnóstica. Nesta aula, vamos falar especificamente da utilização dos anticorpos como ferramenta para diagnóstico. Vamos realizar uma prática denominada imunodifusão radial dupla que também é conhecida como Ouchterlony, em homenagem ao pesquisador que a descreveu.

IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

O processo de ligação de um anticorpo a um antígeno, ou seja, a formação de um imunocomplexo, constitui a base de grande parte dos testes imunológicos. Você certamente já fez ou ouviu falar de alguém que fez um teste sorológico, cujo resultado foi negativo ou positivo. Isso significa que, no caso negativo, você ou o indivíduo não apresentam, no soro, anticorpos contra o antígeno em teste. Se o teste foi positivo, significa que você ou o indivíduo já tiveram ou têm o antígeno ainda no organismo e, no soro, foram detectados anticorpos contra o antígeno que foi testado.

A técnica de imunodifusão foi uma das primeiras técnicas imunológicas desenvolvidas para detectar anticorpos. Em 1946-1948, **ÖRJAN OUCHTERLONY** desenvolveu a imunodifusão radial dupla. Essa denominação foi dada a este teste porque ele se baseia na difusão radial do antígeno e do anticorpo em meio semi-sólido. Atualmente, ela não é muito utilizada, pois foi substituída por outros métodos de diagnóstico mais modernos que apresentam maior sensibilidade e execução mais rápida. Entretanto, essa técnica nos permite visualizar diretamente a reação antígeno x anticorpo, que é o fundamento da maioria dos testes imunológicos. Assim, temos a certeza de que, se você entender bem esta aula, você não terá dificuldade em entender outros testes imunológicos. Além disso, a imunodifusão radial dupla é de fácil execução e não exige equipamentos sofisticados.

ÖRJAN OUCHTERLONY

Pesquisador sueco, descreveu em 1946 – 1948 a técnica da imunodifusão radial dupla. O termo “dupla” se refere ao fato de que o anticorpo e o antígeno migram um em direção ao outro na matriz gel.

Princípio do teste de imunodifusão radial dupla

O teste de imunodifusão radial dupla é uma técnica simples e consiste no preparo de uma solução contendo agarose ou Ágar para, depois, depositá-la em uma placa de Petri. Após a solidificação do gel, com o auxílio de uma roseta, fazem-se os orifícios no gel, conforme pode ser visto na **Figura 8.1.a**. Nos orifícios periféricos são colocados os soros a serem testados e também um soro controle positivo, que tem a função de inferir que o teste está funcionando adequadamente. No orifício central é colocado o antígeno que deve ser solúvel, ou seja, não pode ser uma célula bacteriana, um protozoário, um vírus ou qualquer outro antígeno que seja particulado, por uma razão bem lógica – antígenos particulados não difundem através do gel. Anticorpos e antígenos solúveis difundem radialmente pelo gel. Veja na **Figura 8.1.b**. Observe que na região onde eles se encontram forma-se uma linha de precipitação. Essa região é denominada zona de equivalência. Então, vamos agora à prática?

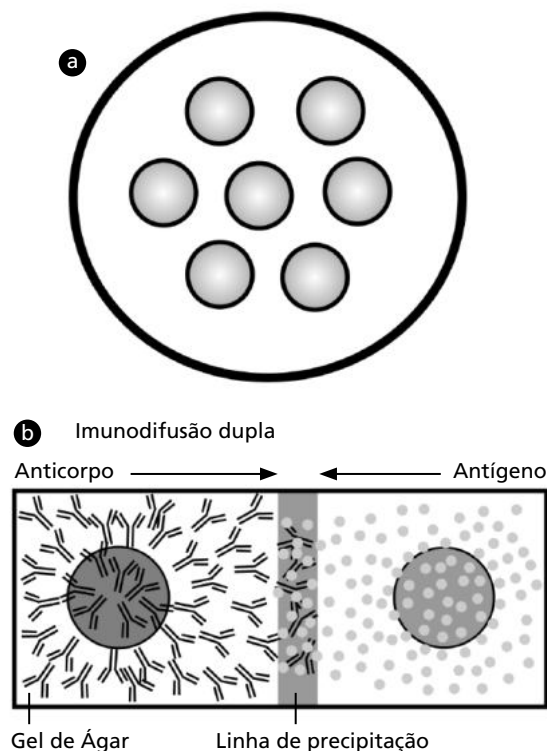


Figura 8.1: Imundifusão radial dupla. (a) Placa de Petri contendo Ágar e seis orifícios periféricos e um central. (b) Esquema da difusão do antígeno e dos anticorpos através do gel de Ágar. Observe a zona de equivalência e a linha de precipitação.

Materiais

Placas de Petri
Pipetas Pasteur
Pipetas de 5mL
Erlenmeyer
Câmara úmida

Reagentes

Solução salina fosfato (PBS)
Ágar Noble
Soro de coelho antiovalbumina
Soro de coelho normal (não imunizado)
Solução de ovalbumina 1mg/mL

Procedimento experimental

1. Aquecer em banho-maria o gel contendo Ágar 1,5% em PBS, até dissolver completamente.
2. Pipetar 5 mL da solução de Ágar na placa de Petri e deixar solidificar.
3. Fazer os orifícios com a roseta e identificar conforme a **Figura 8.2**.
4. Preencher o orifício central com o antígeno (solução de ovalbumina 1mg/mL).
5. Preencher os orifícios 1, 3 e 5 com o soro de coelho antiovalbumina. Os orifícios 2, 4 e 6 serão preenchidos com o soro de coelho normal.
6. Colocar a placa na câmara úmida e deixar a temperatura ambiente em uma superfície plana.
7. Fazer a leitura com 24 e 48 horas.

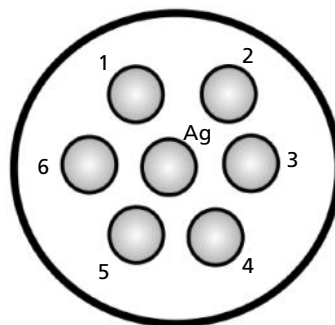


Figura 8.2: Placa de Petri contendo gel de Ágar e os orifícios identificados.

Resultado esperado

Considerando que a ovalbumina que utilizamos esteja realmente pura, ou seja, a solução de ovalbumina que utilizamos contenha somente a ovalbumina, o resultado esperado seriam somente as linhas de precipitação, conforme podemos ver na **Figura 8.3**. Uma vez que o coelho foi imunizado com esta mesma solução de ovalbumina, conseqüentemente, produziu somente anticorpos contra a ovalbumina. Assim, os anticorpos solúveis antiovalbumina e a ovalbumina também solúvel, ao se encontrarem na zona de equivalência no gel de Ágar, formam complexo antígeno-anticorpo que se precipita. Essa precipitação corresponde àquelas linhas opacas que podemos visualizar na **Figura 8.3**. Agora, vamos fazer uma atividade para fixar melhor este conceito?

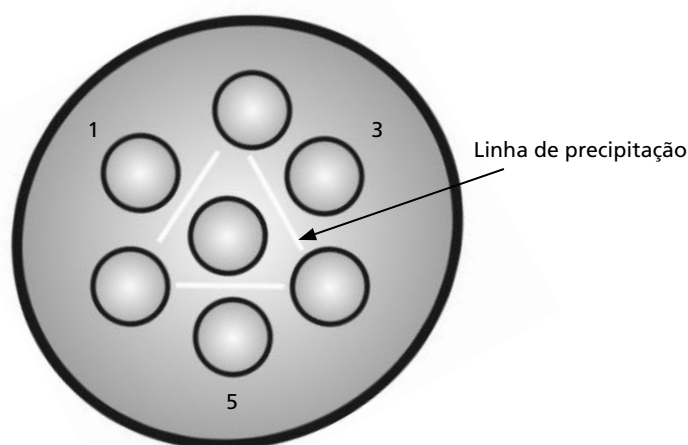


Figura 8.3: Reação de imunodifusão radial dupla. Observe a linha de precipitação entre o orifício central e os orifícios 1, 3 e 5. Nos orifícios 2, 4 e 6, preenchidos com soro normal de coelho não se observa linha de precipitação.

ATIVIDADE



1. Vamos considerar que a ovalbumina que utilizamos não esteja pura, ou seja, ela contém uma outra proteína contaminante que vamos denominá-la proteína X, sendo que essa proteína X tem peso molecular de 70 kDa, enquanto a ovalbumina tem peso molecular de 45 kDa. Foi feita uma solução contendo a albumina e o contaminante X, que foi utilizada para imunizar um coelho. No final da imunização, foi colhido sangue do coelho, e o soro obtido foi utilizado para fazer o teste de imunodifusão radial dupla. O antígeno utilizado foi a mesma solução utilizada para imunizar o coelho. Como você acha que será o resultado desse teste? Utilize o esquema a seguir para desenhar a(s) linha(s) de precipitação.



RESPOSTA COMENTADA

Se você desenhou duas linhas de precipitação, você acertou. Parabéns! Se você errou, vamos entender o porquê? Bem, como o coelho foi imunizado com a solução de antígenos que continha a ovalbumina e a proteína X, ele produziu anticorpos contra a ovalbumina e a proteína X. Ao realizar o teste de imunodifusão radial dupla com o antígeno e o soro, temos, no soro, anticorpos antiovalbumina e antiproteína X e, como antígeno, temos a solução contendo a ovalbumina e a proteína X. Assim, fica fácil entender o surgimento das duas linhas de precipitação, pois a ovalbumina e a proteína X, por terem pesos moleculares diferentes, migram com velocidades diferentes através do gel, justificando a formação de duas linhas de precipitação, conforme podemos ver na **Figura 8.4**. A linha menor corresponde à proteína X. Por ela ser maior, a sua velocidade de migração através do gel é menor, ao contrário da ovalbumina que, por ter peso molecular menor, tem velocidade de migração maior.

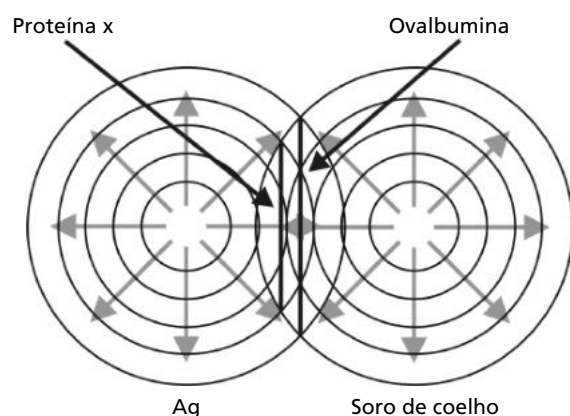


Figura 8.4: Figura esquemática das linhas de precipitação da ovalbumina e da proteína X.

APLICAÇÕES DA IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

Uma das aplicações dessa técnica em humanos é no diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico (SLE), uma doença auto-imune sobre a qual falamos na Aula 7. O diagnóstico dessa enfermidade é feito pela detecção de anticorpos no soro contra algumas proteínas nucleares denominadas ENA, do inglês *Extractable Nuclear Antigen*. O teste é realizado colocando-se nos orifícios periféricos, de maneira alternada, o soro controle positivo e um soro de paciente a ser testado, enquanto no orifício central é colocado o antígeno ENA, sendo a leitura e a interpretação dos resultados feitas em 24 e 48 horas. Como podemos ver na **Figura 8.5**, as interpretações dos resultados podem ser as seguintes:

1. Identidade – a linha de precipitação é contínua entre os dois soros. Isto indica que os anticorpos, presentes nos dois soros, reconhecem o mesmo antígeno. Logo, o soro em teste é positivo. Veja a **Figura 8.5.a**.
2. Identidade parcial – a linha de precipitação é contínua entre os dois soros, porém forma um “esporão” (na linha de precipitação), como pode ser visto na **Figura 8.5.b**. Este resultado indica que os dois soros reconhecem o mesmo antígeno, ou seja, o soro teste é positivo. Entretanto, o soro teste contém anticorpos adicionais que reconhecem um componente a mais do antígeno que o soro controle não reconhece.
3. Ausência de identidade – as linhas de precipitação se cruzam entre o soro teste e o soro controle. Isso indica que os soros identificam antígenos nucleares diferentes. Conseqüentemente, há a necessidade de testes adicionais de confirmação. Veja a **Figura 8.5.c**.

4. Negativo – o soro teste não forma linha de precipitação. Somente o soro controle forma a linha de precipitação, como pode ser visto na Figura 8.5.d.

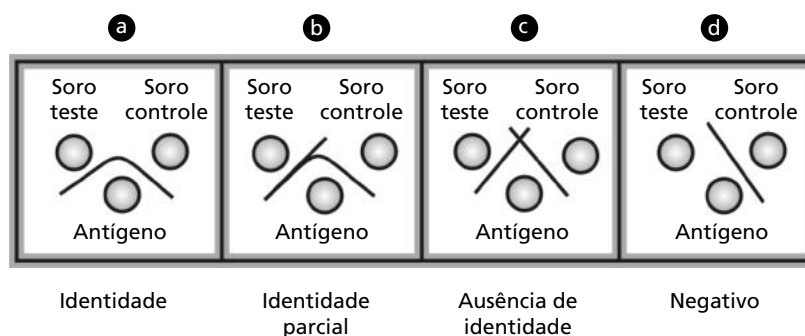


Figura 8.5: Figura esquemática da interpretação dos resultados do teste de imunodifusão radial dupla. Informações retiradas do site do FDA (Food and Drug Administration) <http://www.fda.gov/cdrh/ode/848.pdf>, órgão americano responsável pelo controle de drogas e alimentos.

Nesse teste de imunodifusão radial dupla, você viu que os anticorpos também podem ser utilizados para diagnosticar as doenças, com base no princípio da formação de complexo antígeno-anticorpo que precipita e pode ser visualizado diretamente no gel de Ágar. Existem outros métodos de diagnóstico em que o complexo antígeno-anticorpo formado é identificado de forma indireta, com a utilização de um outro anticorpo chamado anticorpo secundário que pode ser marcado com enzimas, com substâncias que emitem fluorescência ou substâncias radioativas. Dentre esses testes, podemos citar o ELISA, o immunoblotting, a imunofluorescência, o radioimunoensaio e outros. Vale ainda ressaltar que todos esses testes apresentam variações, o que complicaria bastante se fôssemos explicar todos eles. Assim, vamos entender o princípio do teste de ELISA que é o mais utilizado para diagnóstico? E ao entender o teste de ELISA, você terá subsídio para entender todos esses outros testes imunológicos. Então, vamos lá?

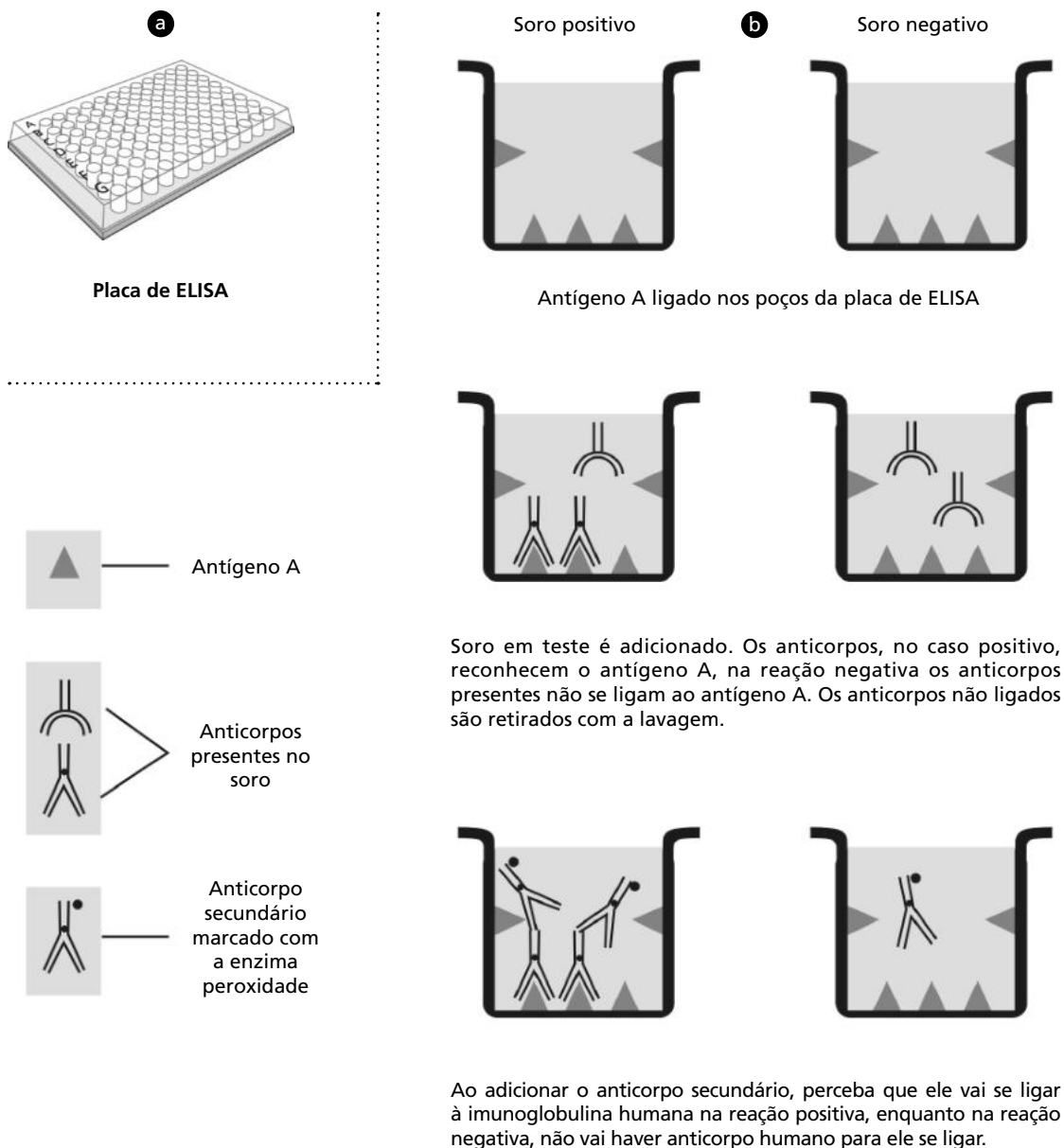


Anticorpo secundário é o anticorpo produzido em uma espécie contra os anticorpos de uma outra espécie animal. Calma! Vamos explicar melhor isso. Você viu na aula de anticorpos (Aula 6) que os anticorpos reconhecem os antígenos pela fração Fab, e a fração Fc é a parte constante do anticorpo. Pois bem, a região Fc, por ser constante, é específica para cada espécie animal. Quer dizer que a região Fc dos anticorpos é diferente para cada espécie animal? – Isso mesmo! Vamos ver um exemplo prático disso? Podemos purificar, por métodos imunoquímicos, IgG de humanos. Essa IgG purificada pode ser utilizada para imunizar um coelho, por exemplo. Veja, a IgG purificada de humano vai ser estranha ao coelho. Assim, o coelho vai produzir uma grande quantidade de anticorpos contra a IgG humana, principalmente contra a fração Fc. Agora podemos colher o soro do coelho, e purificar os anticorpos do coelho pelo mesmo método imunoquímico. Então, teremos a IgG de coelho que reconhece a IgG humana. No jargão imunológico, dizemos que temos um anticorpo de coelho anti-humano. Esse anticorpo de coelho antiIgG humana pode ser marcado com todas aquelas substâncias que já comentamos. Como vamos falar do teste de ELISA, vamos marcar a IgG de coelho com uma enzima que pode ser a peroxidase. Ainda não estou entendendo como isso vai funcionar! Ok, vamos ver, agora, o teste de ELISA, e isso vai ficar bem claro para você.

PRINCÍPIOS DO TESTE DE ELISA

A sigla ELISA vem do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* que quer dizer ensaio imunoabsorvente ligado à enzima. O teste é realizado numa placa específica para ELISA, contendo 96 poços, **Figura 8.6.a**. Agora acompanhe pela **Figura 8.6.b**. Vamos supor que queremos detectar anticorpos contra o antígeno A no soro de um paciente humano. Na coluna da esquerda temos um soro positivo, e na coluna da direita um soro negativo. O antígeno A é fixado no fundo dos poços da placa de ELISA, e em seguida, adicionado à placa os soros positivo e negativo, respectivamente. Veja que os anticorpos específicos contra o antígeno A se ligam a ele. Os anticorpos não ligados são retirados por lavagem e, então são acrescentados à placa IgG de coelho antiIgG humana marcada com a enzima peroxidase. Note que o anticorpo secundário se liga à IgG humana na reação positiva e, na reação negativa, não há nada ligado ao antígeno, pois os anticorpos não ligados são retirados pela lavagem. Na próxima etapa, é adicionado à placa o tampão de revelação do teste, que é composto de substrato da enzima peroxidase, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), junto com um indicador de cor, que genericamente chamamos cromógeno. A enzima, ao converter o H_2O_2 em H_2O mais O_2 , gera uma coloração no meio que pode ser quantificada em um espectrofotômetro, enquanto, na reação negativa, o meio ficou transparente. Você percebeu que no teste de ELISA o complexo antígeno-anticorpo formado é

detectado pelo anticorpo secundário? E que a visualização da reação positiva é feita pela atividade da enzima ligada ao anticorpo? Ótimo! Você aprendeu o princípio de boa parte dos testes imunológicos que têm como, fundamento, a detecção do complexo antígeno-anticorpo baseado em um anticorpo secundário. O que muda nesses outros testes é a substância que vai ligada ao anticorpo secundário, o suporte onde o antígeno é imobilizado e, às vezes, a adição de mais um ou outro elemento no teste, como por exemplo, os ensaios de competição, mas o princípio de interação antígeno-anticorpo ainda é válido.





Com a retirada do excesso de anticorpo secundário pela lavagem, veja que só restou presente na reação positiva os anticorpos (humanos ligados ao antígeno A e os secundários ligados aos anticorpos humanos). Na reação negativa só ficou o antígeno ligado a placa, pois não houve nenhum reconhecimento específico pelos anticorpos presentes no soro negativo. Assim, ao acrescentar nos poços o substrato da enzima e o indicador cromógeno, a presença de cor será observada somente quando a reação for positiva.

Figura 8.6: Figura esquemática do teste de ELISA. (a) Placa de ELISA. (b) Esquema simplificado do teste de ELISA. Observe as diversas etapas do teste.

Nesta aula, vimos que os anticorpos funcionam também como uma importante ferramenta no diagnóstico de doenças. Em geral, os testes imunológicos baseiam-se na detecção do complexo antígeno-anticorpo. Por isso, caso tenha dúvidas não deixe de resolvê-las com os tutores nos pólos.

ATIVIDADE FINAL

Pesquise na internet ou em livros uma doença cujo diagnóstico é feito por um teste imunológico e faça um breve relato desse método de diagnóstico, preferencialmente baseado na aula que acabamos de ver. Se você tiver dificuldades, procure os tutores nos pólos.

COMENTÁRIO

Se você tiver dificuldade, uma dica é entrar no site do Google www.google.com.br, e buscar o nome de qualquer teste imunológico. Você ficará surpreso com o número de resultados encontrados.

ATENÇÃO: o relatório da atividade prática, junto com a Atividade Final serão a sua AD1!!!

Geração de diversidade dos receptores antigênicos de linfócitos B e T

AULA 9

Metas da aula

Apresentar a organização genômica que codifica para a produção de imunoglobulinas e TCRs e apresentar os mecanismos moleculares que sustentam a geração de diversidade dos receptores antigênicos dos linfócitos B e dos linfócitos T.

objetivos

Ao final desta aula você deverá ser capaz de:

- Aplicar o conceito da recombinação somática na geração de diversidade dos anticorpos e TCRs
- Apresentar o conceito de exclusão alélica na produção de imunoglobulinas e TCRs.
- Aplicar os conceitos de recombinação somática e de exclusão alélica no contexto da geração de diversidade dos anticorpos e dos TCRs

Pré-requisitos

Para acompanhar esta aula, você precisa ter estudado as Aulas 1, 2, 3 e 6 de Imunologia. É importante, também que você reveja as Aulas 15 (Recombinação) e 22 (Processamento do RNA-retirada de íntrons e emenda de éxons, *splicing*) da disciplina Biologia Molecular.

INTRODUÇÃO

Nesta aula, estudaremos os mecanismos moleculares de geração de diversidade dos receptores antigênicos de linfócitos B (anticorpos ou imunoglobulinas) e T (TCRs). Desde que iniciamos nosso curso de Imunologia temos comentado sobre a diversidade dos anticorpos e dito que, em decorrência desta diversidade, eles são capazes de reconhecer uma gama enorme de diferentes antígenos. Este fato, ao longo dos anos, intrigou imunologistas e geneticistas. Algumas hipóteses foram formuladas para explicar a diversidade dos anticorpos, mas somente em meados da década de 1970 é que, finalmente, esta área da investigação teve seu ápice de esclarecimento. Apesar dos enormes avanços neste campo da Imunologia, ainda existem pesquisas em curso nesta área que, certamente, trarão novos conhecimentos importantes sobre o tema. Os conhecimentos adquiridos acerca da geração de diversidade dos anticorpos ajudaram a desvendar os mecanismos da geração de diversidade nos receptores antigênicos dos linfócitos T (TRCs) na década de 1980, conforme veremos em detalhes nesta aula.

UMA BREVE HISTÓRIA SOBRE AS TEORIAS GENÉTICAS PARA EXPLICAR A DIVERSIDADE DOS ANTICORPOS

Conforme você viu na Aula 6, os estudos sobre a estrutura molecular dos anticorpos revelaram que aquelas moléculas possuíam uma porção constante Fc (fração cristalizável) e duas porções variáveis e que a molécula era constituída por quatro cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto. A revelação desta estrutura não aconteceu de uma vez e se deu ao longo de alguns anos.

Ao longo de alguns anos, também foram formuladas teorias para tentar explicar, do ponto de vista genético, a diversidade dos anticorpos. Assim, duas teorias, a princípio, foram propostas. Uma delas, a Teoria da Linhagem germinativa (do inglês *germ-line*) preconizava que a diversidade dos anticorpos estava codificada como tal no DNA dos indivíduos, e a Teoria da Variação somática (do inglês *somatic variation*) preconizava que a diversidade dos anticorpos era fruto de mecanismos de mutação e recombinação no DNA das células que os produzem. À medida que mais e mais moléculas de anticorpos iam sendo seqüenciadas, ficava claro o fato de que ambas as teorias impunham um paradoxo genético insustentável, pelo seguinte fato: como uma molécula de proteína poderia manter a estabilidade e constância de sua estrutura variando apenas uma

de suas porções e mantendo a outra constante sendo codificada por um único gene. Em meados dos anos 1960, era vigente a idéia de que, para cada proteína, haveria apenas um gene responsável pela sua codificação. Em 1965, William J Dreyer e J Claude Bennett publicaram um trabalho bastante interessante apresentando evidências moleculares para contestar as teorias da linhagem germinativa e da variação somática.



Você pode acessar este trabalho no link (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4160200). Não deixe de ver, pois além de muito interessante ele traz um desenho esquemático sobre a concepção para a molécula de anticorpo daquela época.

Ambos, Dreyer e Bennett, propuseram uma nova teoria em que haveria dois tipos de genes codificando a informação para a produção das imunoglobulinas. Segundo eles, na proteína, produto de expressão dos dois genes, poderia haver uma “ligação enzimática” de modo a formar ponte dissulfeto na molécula de imunoglobulina para mantê-la como uma única molécula. Vamos lembrá-lo(a) de que naquela época não tinham sido desenvolvidas metodologias experimentais para investigar, em profundidade, a teoria proposta por Dreyer e Bennett. Além disso, eles apresentaram sua teoria em uma época em que era vigente o conceito de que, para cada proteína, haveria apenas um gene que a codificaria.

Em 1976, isto é, 11 anos após a publicação de Dreyer e Bennett, os pesquisadores S. Tonegawa e N. Hozumi obtiveram as primeiras evidências experimentais diretas para o fato de que genes separados codificavam para as regiões variáveis (V) e constantes (C) das imunoglobulinas. Tonegawa descobriu que, no curso de diferenciação dos linfócitos B, ocorrem rearranjos nos genes de modo a permitir toda a diversidade dos anticorpos para reconhecerem diferentes antígenos. Em 1987, ele recebeu o prêmio Nobel de Medicina pelos seus trabalhos nesta área, em reconhecimento ao impacto imenso que teve não só na Imunologia, mas também nas Ciências Biológicas de um modo geral. Você pode ler a autobiografia de Tonegawa no site: <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1987/tonegawa-autobio.html>.

UM LOOK NA ESTRUTURA DOS TCRs

Na Aula 6 você estudou, em detalhes, os anticorpos. O mesmo não aconteceu ainda com os TCRs sobre os quais você ainda sabe muito pouco. Apresentamos a você o desenho esquemático de um TCR na **Figura 9.1**. Neste momento, o importante é que você saiba que, assim como os anticorpos, os TCRs são compostos por domínios globulares com uma porção variável e uma porção constante. Veja. A figura mostra que o TCR pode ser constituído por cadeias alfa e beta ou gama e delta conforme lhe foi dito na Aula 2.

A região do TCR que interage com o antígeno é a porção variável da molécula, da mesma maneira que você viu na Aula 6 para os anticorpos. Esta região é constituída pelo espaço físico que se forma entre a porção variável da cadeia alfa e a porção variável da cadeia beta no TCR do tipo $\alpha\beta$ e entre a porção variável da cadeia gama e a porção variável da cadeia delta no TCR do tipo $\gamma\delta$. Para que o TCR possa reconhecer antígenos, outras estruturas moleculares na superfície dos linfócitos T são requisitadas, conforme veremos em outra aula. Mas isto não vem ao caso agora pois, para entender esta aula, é necessário que você saiba que os TCRs, assim como os anticorpos, são compostos por cadeias polipeptídicas formadas por domínios globulares constantes e também variáveis, inclusive com regiões hipervariáveis que são as CDRs (*complementarity determining regions*), conforme você viu na Aula 6.

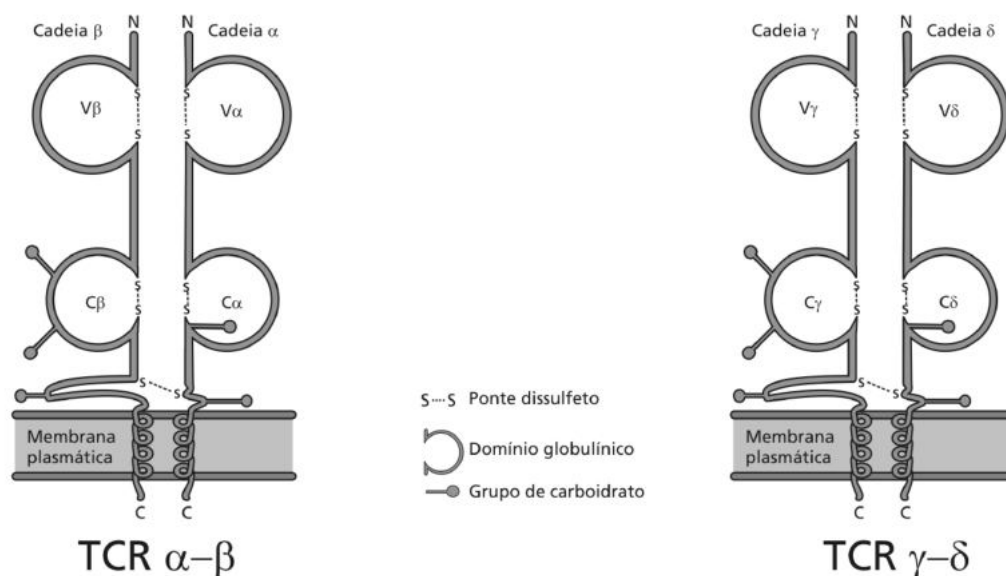


Figura 9.1: Desenho esquemático da estrutura de TCRs do tipo $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$.

CONHECENDO A ORGANIZAÇÃO MULTIGÊNICA QUE CODIFICA PARA IMUNOGLOBULINAS E TCRs

Falamos na Aula 2 sobre a recombinação somática como sendo o mecanismo molecular capaz de viabilizar a geração de diversidade dos anticorpos e TCRs a partir de “economia” de material genético. Vamos olhar a **Figura 9.2** que traz o desenho esquemático de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve da molécula de anticorpo, e o desenho esquemático de uma cadeia alfa e uma beta da molécula de um TCR do tipo $\alpha\beta$. Observe bem o desenho esquemático. Ele mostra os domínios globulares de anticorpos (que você viu na Aula 6). Relembramos que cada uma das duas cadeias leves e cada uma das duas cadeias pesadas da molécula de imunoglobulina possui domínios globulares variáveis e constantes. O desenho mostra também as cadeias polipeptídicas dos TCRs que você viu na **Figura 9.1**, evidenciando também os domínios variáveis e os domínios constantes. Na **Figura 9.2**, apenas uma das duas cadeias pesadas e uma das duas cadeias leves da molécula de imunoglobulina estão sendo mostradas. Observe que nos domínios variáveis da cadeia pesada da molécula de anticorpo e da cadeia beta da molécula de TCR, existem regiões marcadas como V, D e J. No entanto, nos domínios variáveis da cadeia leve da molécula de anticorpo e da cadeia alfa da molécula de TCR, existem regiões marcadas apenas como V e J. Estas letras correspondem a regiões na molécula de anticorpo e na molécula do TCR, codificadas por segmentos gênicos, respectivamente denominados variáveis (V), de diversidade (D) e de junção (J), conforme veremos em detalhes a seguir.

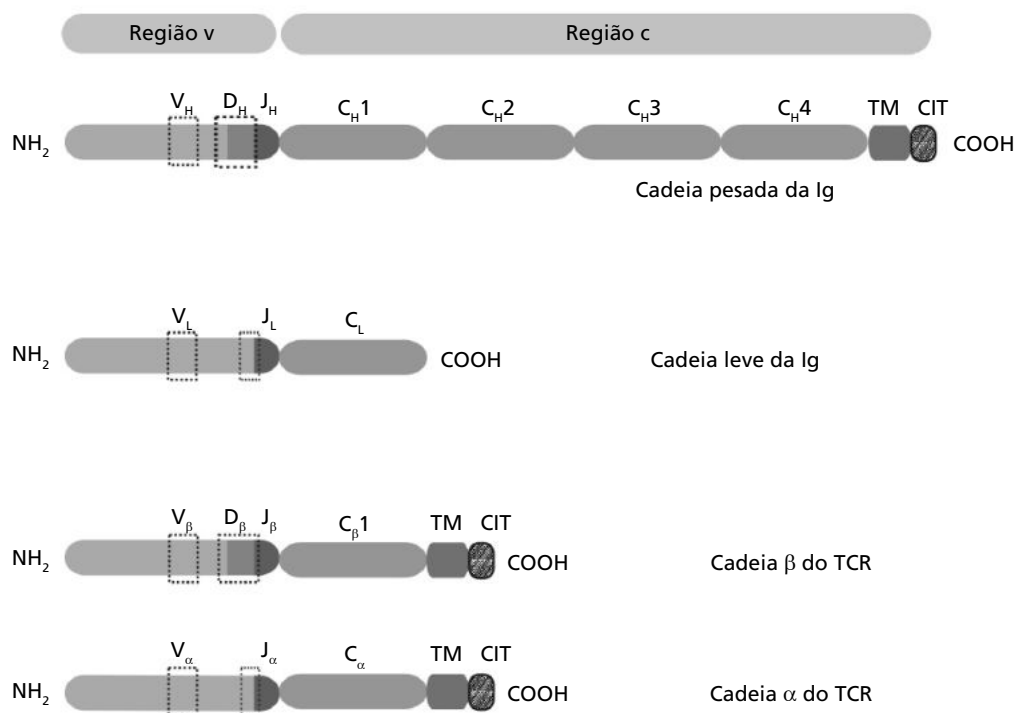


Figura 9.2: Desenho esquemático evidenciando os domínios globulares das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas, e das cadeias α e β do TCR.

Observe que as porções variáveis em cada molécula apresentam letras que correspondem às regiões das moléculas codificadas pelos segmentos gênicos V D e J, ou apenas pelos segmentos V J.

CH e CL denotam, respectivamente, os domínios constantes das cadeias pesadas e das cadeias leves da imunoglobulina.

Cβ e Cα denotam, respectivamente, os domínios constantes das cadeias beta e alfa do TCR.

TM e CIT denotam, respectivamente as porções transmembrana e citoplasmática da cadeia pesada da imunoglobulina.

Nesta figura estão sendo mostradas as porções amino terminal (NH₂) e carboxi-terminal (COOH) das cadeias polipeptídicas.

Para que possamos entender os mecanismos moleculares que dão origem à diversidade dos anticorpos e TCRs, será preciso conhecer como os genes estão dispostos nos cromossomos. Observe o **Quadro 9.1**. Ele informa a localização cromossômica dos genes que codificam para as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas, e para as cadeias alfa beta gama e delta dos TCRs de humanos e de camundongos.

Quadro 9.1: Localização cromossômica de genes que codificam para imunoglobulinas e TCRs de humanos e de camundongos

Linfócito e gene	Número do cromossomo	
	Humano	Camundongo
B (cadeia leve káppa)	22	16
B (cadeia leve lambda)	2	6
B (cadeia pesada)	14	12
T (cadeia alfa)	14	14
T (cadeia beta)	7	6
T (cadeia gama)	7	13
T (cadeia delta)	14	1

Observe que os genes que codificam para as moléculas inteiras não estão todos localizados nos mesmos cromossomos. No entanto, os genes que codificam para as cadeias polipeptídicas inteiras estão localizados nos mesmos cromossomos. Note que os genes que codificam para os dois tipos de cadeias leves, que você viu na Aula 6, estão em cromossomos diferentes. Já os genes que codificam para as cadeias pesadas inteiras estão todos no mesmo cromossomo. Há um sentido para este tipo de arranjo que veremos, nesta aula, quando estivermos descrevendo sobre a recombinação somática propriamente dita.

Os genes que codificam para as cadeias polipeptídicas das moléculas de imunoglobulinas, bem como aqueles que codificam para as cadeias polipeptídicas que compõem os TCRs não estão organizados linearmente, isto é, sem interrupções, nos seus respectivos cromossomos. Na verdade, eles estão separados por íntrons. Sabemos que o conceito de íntron não é para você nenhuma novidade. Você já o estudou em Biologia Molecular, mas vamos lembrar que os íntrons contêm seqüências que sinalizam para o reconhecimento de enzimas importantes nos processos de quebra e reparo do DNA, por exemplo.

Durante o processo de amadurecimento dos linfócitos B (na medula óssea) e dos linfócitos T (no timo) ocorre o rearranjo somático no DNA que codifica para as imunoglobulinas e os TCRs, conforme veremos nesta aula. Chamamos *seqüência germinativa* (do inglês *germe-line sequence*) aquela seqüência do DNA que observamos nos estágios iniciais de diferenciação de linfócitos T e B, antes de acontecer a recombinação somática. Grave bem esta informação!

Foi exatamente isto que Tonegawa observou em 1972, ou seja, ele observou, ao estudar a sequência de nucleotídeos da cadeia leve λ durante o processo de amadurecimento de um linfócito B, que a mesma apresentava determinada composição nos primórdios da diferenciação celular, a qual era diferente da composição observada nos seus estágios mais maduros de diferenciação celular. Na prática, ele observou que a distância entre o DNA que codifica para a região (ou porção) variável da cadeia λ e o DNA que codifica para a região (ou porção) constante da cadeia λ era bem menor nos linfócitos B maduros quando ele comparou esta mesma distância na célula precursora do linfócito B (antes da recombinação somática). Então ele deduziu que algum mecanismo genético contribuía para gerar esta aproximação das sequências de DNA que codificam para a porção variável e a porção constante da cadeia leve λ durante o amadurecimento do linfócito B. Este mecanismo nada mais é que a *própria* recombinação somática. Mais tarde foi observado que fenômeno semelhante acontecia no processo de amadurecimento dos linfócitos T no timo. O processo de recombinação somática que leva ao rearranjo completo dos genes que codificam para as imunoglobulinas acontece apenas nos linfócitos B e não em outros tipos de células. Nem nos linfócitos T ele ocorre. Da mesma maneira, o processo de recombinação somática que leva ao rearranjo completo dos genes responsáveis por codificar os TCRs acontece apenas nos linfócitos T e não em outros tipos de células, nem nos linfócitos B.

Passaremos agora a lhe informar como, fisicamente, está arranjada a informação em cada um dos cromossomos (conforme mostrado no **Quadro 9.1**). Mas antes é preciso lhe dar mais algumas informações. A primeira delas é que, quando falamos sobre os genes que codificam para as cadeias de imunoglobulinas e TCRs, utilizamos expressões que, à primeira vista, podem causar certa confusão. No entanto, uma vez esclarecidas não mais serão fontes para confusão. Veja o box de atenção para que você tenha isto esclarecido.



Quando falamos de loci de imunoglobulinas (Igs) e TCRs, normalmente utilizamos a palavra “gene” para designar a sequência de DNA que codifica para a cadeia polipeptídica inteira (cadeia leve ou pesada das Igs, e as cadeias alfa, ou beta, gama ou delta dos TCRs). Mas na verdade, cada gene é composto por muitos “segmentos gênicos” porções do DNA que codificam para determinadas porções (ou regiões) da molécula como, por exemplo, os domínios globulares (vimos nas Aulas 5 e 6 o conceito de domínio globular). Os termos “éxons”, “segmentos gênicos” e “gene” podem ser, algumas vezes, utilizados como sinônimos entre si. Esteja atento!

Mas antes vamos dar uma paradinha para um comentário.

COMENTÁRIO

Você já reparou, certamente, que nesta disciplina, volta e meia apresentamos um conceito e dizemos que você o verá em maiores detalhes mais adiante. Por que isto acontece com certa frequência no ensino de Imunologia? Acontece por causa da natureza biológica do Sistema Imune. Você já observou que a resposta imune e o sistema imune têm grande interface com outros sistemas biológicos, certo? A aula de inflamação é um bom exemplo desta relação de interface com outros sistemas. Acontece também pelo fato de que não é possível, em uma única aula, definirmos em detalhes todos os conceitos necessários para a sua plena compreensão. Por isso, fique atento(a) aos objetivos de cada aula para saber se os mesmos estão sendo alcançados por você. Não se aflija. Ao final do nosso curso você poderá ter a compreensão geral de todo o sistema e do seu modo de operar.

Vamos observar agora o **Quadro 9.2**. Ele traz informações sobre elementos que compõem o genoma germinativo (isto é, do genoma, antes da recombinação somática) que codifica para a região variável das imunoglobulinas e TCRs. Reforçamos, mais uma vez, a informação de que a recombinação somática acontece *durante* o processo de amadurecimento dos linfócitos B e T. Veremos, em aula específica, maiores detalhes sobre o processo de diferenciação celular na medula óssea para o linfócito B e no timo para o linfócito T. Nesta aula, iremos nos concentrar nos mecanismos genéticos que proporcionam a geração de diversidade dos anticorpos e TCRs.

O **Quadro 9.2** resume as principais características da organização genômica germinativa que codifica para a porção variável das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas (Igs) e da porção variável das cadeias α β γ e δ dos TCRs. A organização genômica dos segmentos que codificam para as porções constantes das cadeias leves e pesadas das Igs e das cadeias polipeptídicas do TRC serão informadas a seguir.

Quadro 9.2: Descrição sobre a organização (seqüência) germinativa dos elementos que compõem o genoma que codifica para a região variável das imunoglobulinas e TCRs

Elemento do genoma	Descrição da organização germinativa
Segmentos variáveis (V).	Os segmentos gênicos variáveis V apresentam-se com cerca de 300 pares de bases de comprimento. Apresentam-se agrupados nos respectivos cromossomos que abrigam os genes para a produção das cadeias leves e pesadas das Igs e das cadeias polipeptídicas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ dos TCRs. Eles estão na posição 5' do <i>loci</i> que codifica para as Igs e TCRs. Dizemos que eles estão agrupados em famílias (que por homologia de seqüência apresentam identidade por volta de 70% a 80% entre si). Cada segmento gênico V recebe um código alfanumérico. Por exemplo, o segmento $\nu\beta 1$ é um dos segmentos gênicos capazes de codificar parte da região variável da cadeia polipeptídica β do TCR de um dado linfócito T. Um número muito grande de segmentos gênicos V existem nos cromossomos que abrigam informações para as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas e as cadeias alfa, beta, gama e delta dos TCRs. Podem existir até cerca de 1.000 segmentos gênicos V que codificam para as cadeias pesadas das imunoglobulinas de camundongos! Cerca de 250 a 300 segmentos gênicos V para a cadeia leve κ e 2 segmentos V para a cadeia leve λ de camundongos. A discrepância entre o número de segmentos variáveis nas cadeias do tipo κ e λ no camundongo não é bem compreendida. No reino animal estes números podem variar de espécie para espécie. Cada segmento gênico V pode estar espaçado em até 2.000 pares de bases um do outro. Ver Figuras 9.3 e 9.4.
Seqüência líder	A seqüência líder corresponde à seqüência de um éxon posicionado imediatamente na orientação 5' de cada região V. Esta seqüência codifica para cerca de 20 a 30 resíduos de aminoácidos moderadamente hidrofóbicos. Estes aminoácidos são encontrados nas proteínas recém-sintetizadas, mas não na proteína madura que será expressa na membrana ou excretada. Esta seqüência parece ter a função de orientação para guiar peptídeos do ribossomo ao lúmen do retículo onde são clivados. Ver Figuras 9.3 e 9.4.
Segmentos de junção (J)	Os segmentos gênicos J estão posicionados entre os segmentos gênicos V e os segmentos gênicos C que codificam para os domínios constantes das cadeias leves das Igs. Estão também desta maneira organizados no genoma que codifica para as cadeias α e γ dos TCRs, isto é entre os segmentos gênicos V e os segmentos gênicos C. No DNA, que codifica para as cadeias pesadas das Igs e para as cadeias β e δ dos TCRs, os segmentos gênicos J estão posicionados entre os segmentos gênicos D (ver nesta tabela) e os segmentos gênicos que codificam para os domínios constantes C daquelas cadeias. O número de segmentos gênicos J varia nas cadeias leves e pesadas bem como nas cadeias α , β , γ e δ dos TCRs e entre diferentes espécies de animais. O número de segmentos J nas Igs é bem menor (menos de 10) dos que nos TCRs (nestes podendo chegar a 250). Cada segmento gênico J recebe um código alfanumérico. Ver Figuras 9.3 e 9.4.
Segmentos de Diversidade (D)	Os segmentos gênicos D estão posicionados entre os segmentos gênicos J e os segmentos gênicos que codificam para os domínios constantes das cadeias pesadas das Igs e das cadeias beta e delta dos TCRs. O DNA que codifica para as regiões variáveis das cadeias leves das Igs e as cadeias α e γ dos TCRs não possuem segmentos gênicos D. O número de segmentos D no DNA que codifica para Igs é maior (mais de 20 para humanos) do que o número de segmentos D que codifica para a região variável das cadeias β e δ dos TCRs (2 segmentos cada em humanos). Cada segmento gênico D recebe um código alfanumérico. Ver Figuras 9.3 e 9.4.

Os segmentos gênicos constantes C codificam para as porções constantes das cadeias polipeptídicas α β γ e δ dos TCRs. Estão posicionados na extremidade 3' do cromossomo em relação aos segmentos gênicos variáveis, têm codificação alfanumérica ou apenas por letras do alfabeto arábico e grego. Dois segmentos gênicos codificam para a porção constante de cada um dos domínios constantes beta ou gama do TCR humano. Eles têm respectivamente a codificação C β 1, C β 2 e C γ 1 C γ 2. Apenas um segmento gênico codifica para cada um dos domínios constantes da cadeia alfa e delta do TCR humano, assim eles têm respectivamente a codificação C α ou C δ .

Nas imunoglobulinas, os domínios constantes, leves e pesados, são codificados por segmentos gênicos constantes que têm a notação C. Os domínios constantes das cadeias leves têm a notação CL que significa constante leve (L, de *light* em inglês que significa leve) as notações C λ e C κ também são utilizadas para designar as cadeias leves constantes lambda e káppa respectivamente. Os segmentos gênicos que codificam para estes domínios têm também, respectivamente, a notação C λ e C κ . Em humanos existe um segmento gênico que codifica para o domínio constante da cadeia káppa (C κ) e quatro segmentos gênicos que codificam para o domínio constante da cadeia lambda (C λ 1, C λ 2, C λ 3 e C λ 4). Apenas um dos quatro segmentos gênicos λ codificará para o domínio constante lambda da cadeia leve. Existem nove genes que codificam para as nove classes e subclasses de imunoglobulinas de humanos vistas na Aula 6. Isto é, IgD, IgM, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2 e IgE. Os segmentos C estão posicionados a 3' do cromossomo em relação aos segmentos gênicos V, e têm código alfanumérico conforme mostrado no **Quadro 9.3**. Neste quadro, vemos que cada letra do alfabeto arábico denota uma classe ou subclasse. Existe uma letra grega que denota os domínios constantes pesados da respectiva imunoglobulina. Esta mesma letra grega é utilizada para codificar de forma alfanumérica os segmentos gênicos que codificam para as respectivas classes e subclasses das imunoglobulinas. No entanto, na porção terminal 3' do DNA que codifica para as classes e subclasses das imunoglobulinas existem dois éxons pequenos que codificam para as porções transmembrana e citoplasmática na porção carboxila terminal da molécula.

Quadro 9.3: Domínios globulares e segmentos gênicos que codificam para a região constante das cadeias pesadas das imunoglobulinas de humanos

Classe/subclasse	Notação dos domínios globulares na proteína (anticorpo)	Notação dos segmentos gênicos que codificam para as classes/subclasses
IgD	C δ 1, C δ 2 e C δ 3	C δ
IgM	C μ 1, C μ 2, C μ 3, C μ 4	C μ
IgG1	C γ 1, C γ 2 e C γ 3	C γ 1
IgG2	C γ 1, C γ 2 e C γ 3	C γ 2
IgG3	C γ 1, C γ 2 e C γ 3	C γ 3
IgG4	C γ 1, C γ 2 e C γ 3	C γ 4
IgA1	C α 1, C α 2 e C α 3	C α 1
IgA2	C α 1, C α 2 e C α 3	C α 2
IgE	C ϵ 1, C ϵ 2, C ϵ 3, C ϵ 4	C ϵ

No **Quadro 9.3**, a letra C denota para os domínios constantes (C) na imunoglobulina e para os segmentos gênicos no DNA que codifica para toda a região constante da cadeia pesada. As letras gregas denotam a classe ou subclasse. Os números que se seguem a essas letras denotam, na proteína (imunoglobulina), os respectivos domínios na ordem crescente amino-terminal para a carboxi-terminal. No DNA, os números denotam a classe ou subclasse da imunoglobulina.



Algumas vezes, você observará que se podem utilizar maneiras diferentes para as notações dos domínios das imunoglobulinas e TCRs e dos segmentos gênicos que codificam para estes domínios. Estas diferenças podem variar entre autores de livros de Imunologia ou mesmo de artigos que você estiver lendo em função do nível de detalhe de informação que se deseja passar sobre tal notação. Por exemplo, C γ 1 pode denotar o primeiro domínio constante pesado da IgG1, ou da IgG2 ou da IgG3 ou da IgG4. CH1 também pode denotar “o primeiro domínio constante” da cadeia pesada de qualquer uma das Igs (isto é, de qualquer uma das classes ou subclasses). Dependendo do autor ou da conveniência do próprio autor, podem-se usar ambas as notações. O texto escrito e as figuras que o acompanham vão lhe ajudar a compreender o significado da notação.



ATIVIDADE

2. Vamos voltar à **Figura 9.2**. Veja nela o esquema de uma cadeia pesada com domínios marcados com as letras CH. Não lhe foi dito a qual classe ou subclasse de imunoglobulina pertencia aquela cadeia pesada. Observe agora o **Quadro 9.3**. Baseando-se na informação contida no **Quadro 9.3**, a qual(is) classe(s)/subclasse(s) de imunoglobulina poderia pertencer aquela cadeia pesada esquematizada na **Figura 9.2**? Por quê?

RESPOSTA COMENTADA

*Poderia ser uma IgM ou uma IgE. Porque ambas têm quatro domínios constantes nas cadeias pesadas. Além disso, ambas podem existir na forma ancorada à membrana do linfócito B. Observe que na **Figura 9.2** estão sendo mostrados os domínios transmembrana e citoplasmáticos. Se você quiser ler mais sobre a IgE, procure as referências com links para acesso livre na internet na lista de referências desta aula. Aqueles artigos trazem um pouco do aspecto evolutivo das imunoglobulinas na filogênese.*

A ORGANIZAÇÃO ESPACIAL NOS CROMOSSOMOS QUE CONTÊM OS GENES QUE CODIFICAM PARA IMUNOGLOBULINAS E TCRs

Observe, na **Figura 9.3.a**, o desenho esquemático da organização genômica germinativa dos cromossomos humanos de número 14, de número 2 e 22, nos quais está codificada a informação para a produção de cadeias pesadas de imunoglobulinas humanas e a informação para a produção de cadeias leves káppa e cadeias leves lambda. Observe, na **Figura 9.3.b**, o mesmo esquema para a organização genômica germinativa dos cromossomos murinos (isto é de camundongos) de número 12, no qual está a informação para a produção de cadeias pesadas de imunoglobulinas e os cromossomos de número 6 e 16 que contêm as informações para a produção de cadeias leves káppa e lambda.

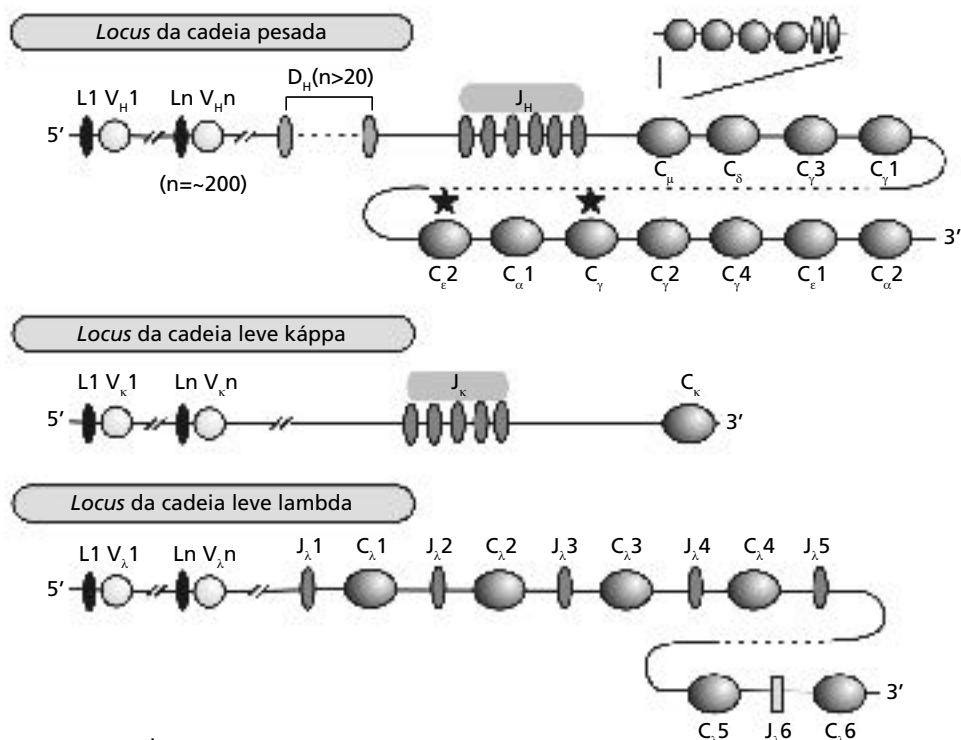
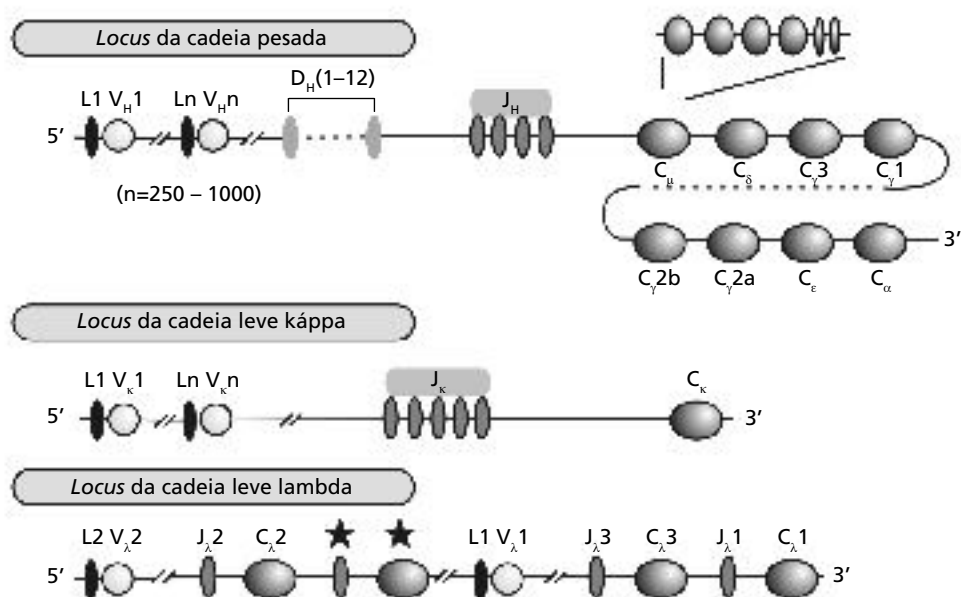
a Cromossoma humano**b** Cromossoma murino

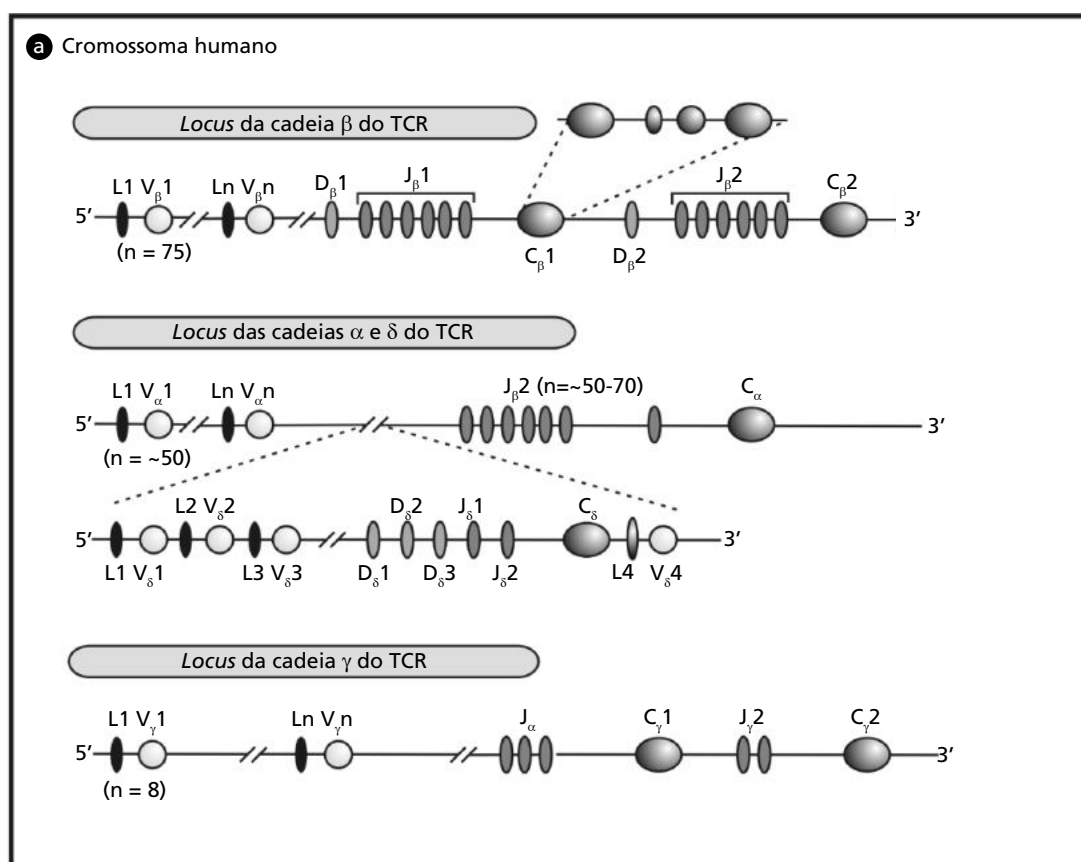
Figura 9.3: Desenho esquemático da organização germinativa que codifica para a produção de cadeias leves e pesadas de Igs de humanos (a) e de camundongos (b). Cada região constante da cadeia pesada das imunoglobulinas é constituída por três ou quatro éxons (veja em detalhe C_μ) e mais dois pequenos éxons que codificam para aminoácidos que compõem a proteína nas suas regiões transmembrana e intracitoplasmática.

Olhando a sequência da informação genômica, **Figura 9.3**, você poderá fixar o que foi explicado nos **Quadros 9.2 e 9.3**. Os éxons e íntrons não estão desenhados em escala. Veja que $C\mu$, na figura, denota o segmento gênico (gene) que codifica para IgM. Este segmento contém seis éxons (veja no detalhe dos desenhos), sendo que quatro correspondem a cada um dos quatro domínios globulares; e mais dois, um que codifica para a porção transmembrana e outro para a porção intracitoplasmática da IgM. Nesta figura, apenas para IgM, estão sendo mostrados os éxons de cada domínio globular. Cada notação alfanumérica nesta figura corresponde a uma das nove classes/subclasses de imunoglobulinas mostradas no **Quadro 9.3**. Na **Figura 9.3.a**, estão sendo também mostrados dois pseudogenes que não são funcionais (não são traduzidos). Eles estão marcados com uma estrela. São eles $C\epsilon 2$ (com sequência similar ao segmento gênico que codifica para a porção constante de IgE) e $C\gamma$ (com sequência similar ao segmento gênico que codifica para a porção constante das IgGs).

Veja também, nesta figura, que na organização dos segmentos gênicos que codificam para a porção constante da cadeia leve lambda (cromossomo 2 humano e 16 murino), cada segmento J aparece imediatamente antes do segmento que codifica para o domínio constante da cadeia lambda. De maneira diferente, no cromossomo 2 humano e no cromossomo 6 murino, onde estão codificadas as informações para a produção da cadeia leve kappa, os segmentos J aparecem separados do único segmento gênico que codifica para a porção constante das cadeias kappa.

Vamos olhar agora como se organizam os genes que codificam para os TCRs em humanos e em camundongos. Na **Figura 9.4** estão mostrados os desenhos esquemáticos da organização genômica germinativa do cromossoma humano de número 7 no qual estão codificadas as informações para a produção das cadeias polipeptídicas beta e gama do TCR (**Figura 9.4.a**), e a informação para a produção de cadeias betas de murinos está no cromossomo de número 6 (**Figura 9.4.b**). Estão também mostrados os cromossomos humano de número 14, e murino também de número 14, nos quais estão codificadas as informações

para a produção das cadeias polipeptídicas alfa e delta do TCR. Veja que toda a informação que codifica para a cadeia delta (δ) do TCR no cromossoma 14 está situada entre a região que codifica para a porção variável da cadeia alfa (α) e a região que codifica para a porção J também da cadeia alfa. A informação que codifica para a cadeia gama (γ) do TCR de camundongos está localizada no cromossomo de número 13.



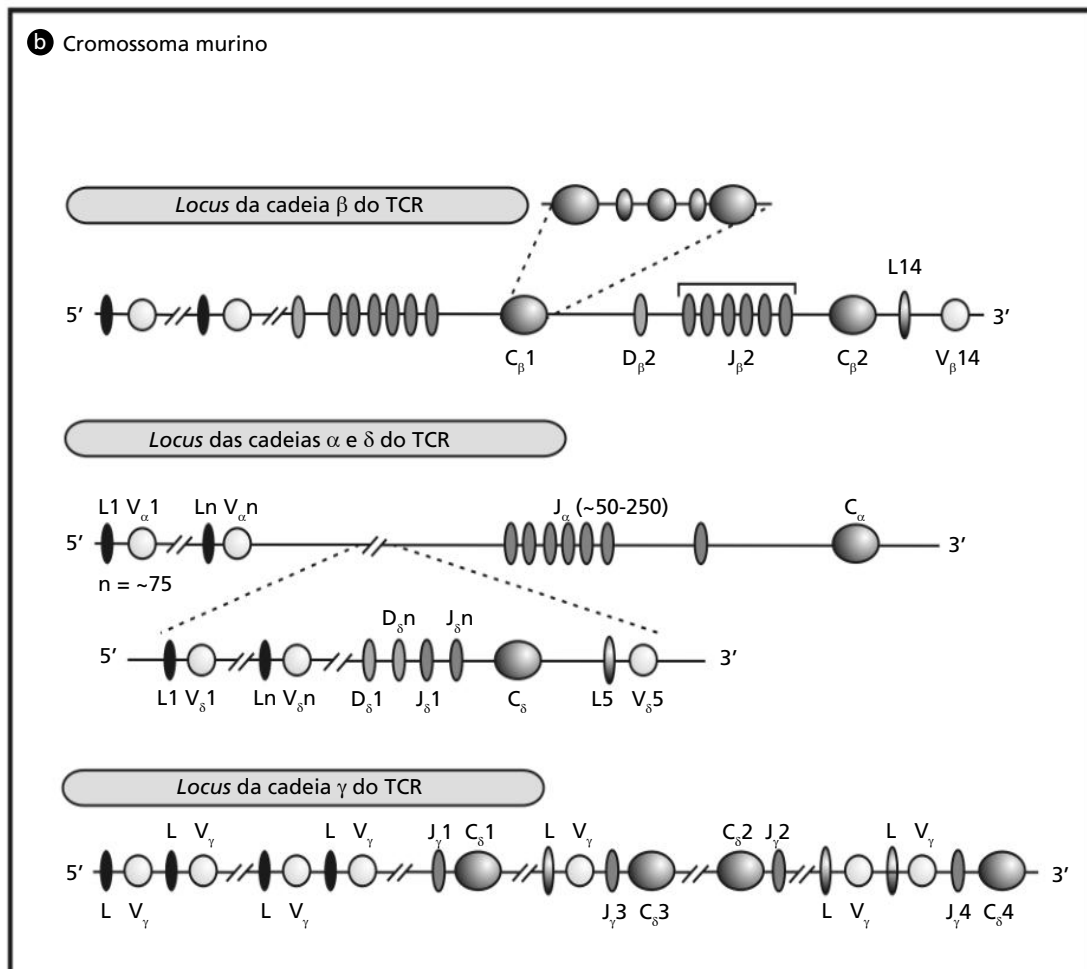


Figura 9.4: Desenho esquemático da organização germinativa que codifica para as cadeias polipeptídicas dos TCR. Cada região constante do TCR é constituída por três ou cinco éxons (veja em detalhe para C_{β} , sendo que na figura contam cinco éxons no detalhe, em vez de três éxons) e mais dois pequenos éxons que codificam para aminoácidos que compõem a proteína nas suas regiões transmembrana e intracitoplasmática.

RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS CADEIAS PEPTÍDICAS DOS ANTICORPOS E TCRs

As seqüências germinativas não produzem Igs e TCRs funcionais. Assim, durante o desenvolvimento das células B e T, ocorrem rearranjos nos segmentos gênicos de modo a produzir uma seqüência de DNA que seja produtiva nas células B e T maduras. A recombinação dos segmentos gênicos ocorre em ordem precisa.

Vamos observar a **Figura 9.5**.

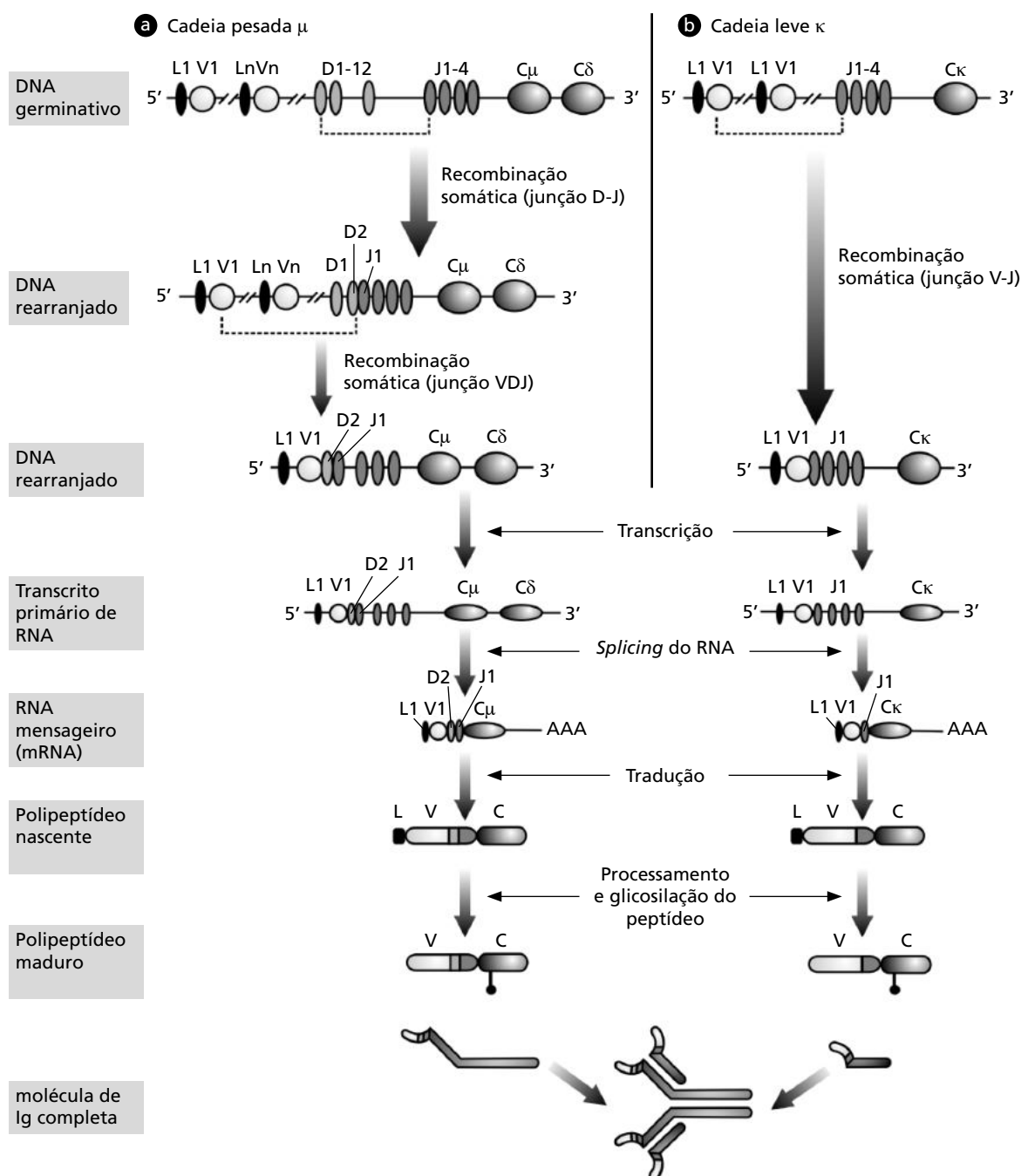


Figura 9.5: Recombinação dos segmentos gênicos que codificam para cadeias leves e pesadas no fluxo de produção de imunoglobulinas.

A **Figura 9.5** mostra a recombinação somática dos segmentos gênicos que codificam para a produção de cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas. O primeiro evento de recombinação ocorre no cromossomo 14 onde está a informação genética para a síntese das cadeias pesadas de humanos e no cromossomo 12 de camundongos. Observa-se primeiro a aproximação de um dos segmentos D a um seguimento J ocorrendo a exclusão do DNA interveniente (isto é, do DNA que estava entre os dois segmentos). A junção de um dos muitos segmentos V ao segmento DJ, rearranjado então, ocorre de modo a formar a sequência VDJ. Todos os segmentos intervenientes também são excluídos. A região do DNA que codifica para a porção constante permanece distante da porção rearranjada VDJ. Olhe a **Figura 9.5** e veja como a sequência VDJ permanece distante dos segmentos que codificam para a cadeia constante.

Assim que a sequência VDJ esteja rearranjada, ocorre a síntese de um RNA nuclear (transcrito primário de RNA). Este transcrito primário é gerado a partir do DNA rearranjado na porção que codifica para a região (domínio) variável da imunoglobulina e de parte do DNA que não foi rearranjado e que codifica para os domínios constantes das imunoglobulinas. Assim este RNA nuclear contém informações codificadas pelo DNA com a sequência VDJ rearranjada e as informações codificadas pelo DNA não rearranjado que codificam para os segmentos gênicos μ e δ . Lembramos que todos estão no cromossoma 14 humano e 12 de camundongos. Este RNA tem sequências consenso para **SÍTIOS DE POLIADENILAÇÃO** na extremidade 3' do seguimento gênico μ (que é o que codifica para a cadeia pesada μ , da IgM) e sofrerá *splicing* conforme visto na Aula 22 da disciplina de Biologia Molecular, que é o processamento para a retirada de íntrons e emenda de éxons. Este RNA processado dará origem a um RNA mensageiro funcional que contém a sequência gênica VDJ μ , e que, ao ser traduzido, dará origem à cadeia polipeptídica μ (isto é, uma das duas cadeias pesadas da IgM monomérica). Lembramos que todas as classes/subclasses de imunoglobulinas possuem duas cadeias pesadas idênticas entre si e duas cadeias leves idênticas entre si.

Os **SÍTIOS DE POLIADENILAÇÃO** são sequências presentes no mRNA às quais são adicionadas várias unidades de nucleotídeos de adenina, formando uma sequência denominada cauda Poli-A. Este processo ocorre durante o amadurecimento do mRNA.

Também na **Figura 9.5** observamos a recombinação somática do DNA que contém a informação para a síntese de cadeias leves κ , a qual opera de modo semelhante ao anteriormente descrito para as cadeias pesadas e ocorre no cromossomo 2 de humanos e no 6 de camundongos.

A diferença básica se constitui no produto da recombinação somática que, para cadeia leve, gera a sequência VJ rearranjada no DNA (já que não há a sequência gênica D para a cadeia leve). O RNA nuclear será processado e originará o RNA mensageiro com a informação para a síntese de cadeias leves káppa. Da mesma maneira, ocorre a recombinação que vai gerar cadeias lambda no cromossomo 22 humano e no 16 murino. Lembramos que apenas um segmento gênico codifica para as cadeias leves káppa enquanto mais de um segmento gênico codifica para a cadeia lambda. Assim, o RNA nuclear, com informação para cadeia lambda, contém os segmentos constantes lambda que existem no DNA e sofrerá *splicing* gerando o RNA mensageiro com informação para a síntese da cadeia lambda completa. Este RNA mensageiro codifica para a região variável e apenas *um* dos segmentos gênicos para a porção constante da cadeia lambda. Isto não está sendo mostrado na figura.

Na **Figura 9.6** observamos a sequência de esquemas que mostram etapas da recombinação somática e o processamento do RNA para gerar a produção de cadeias alfa e beta do TCR.

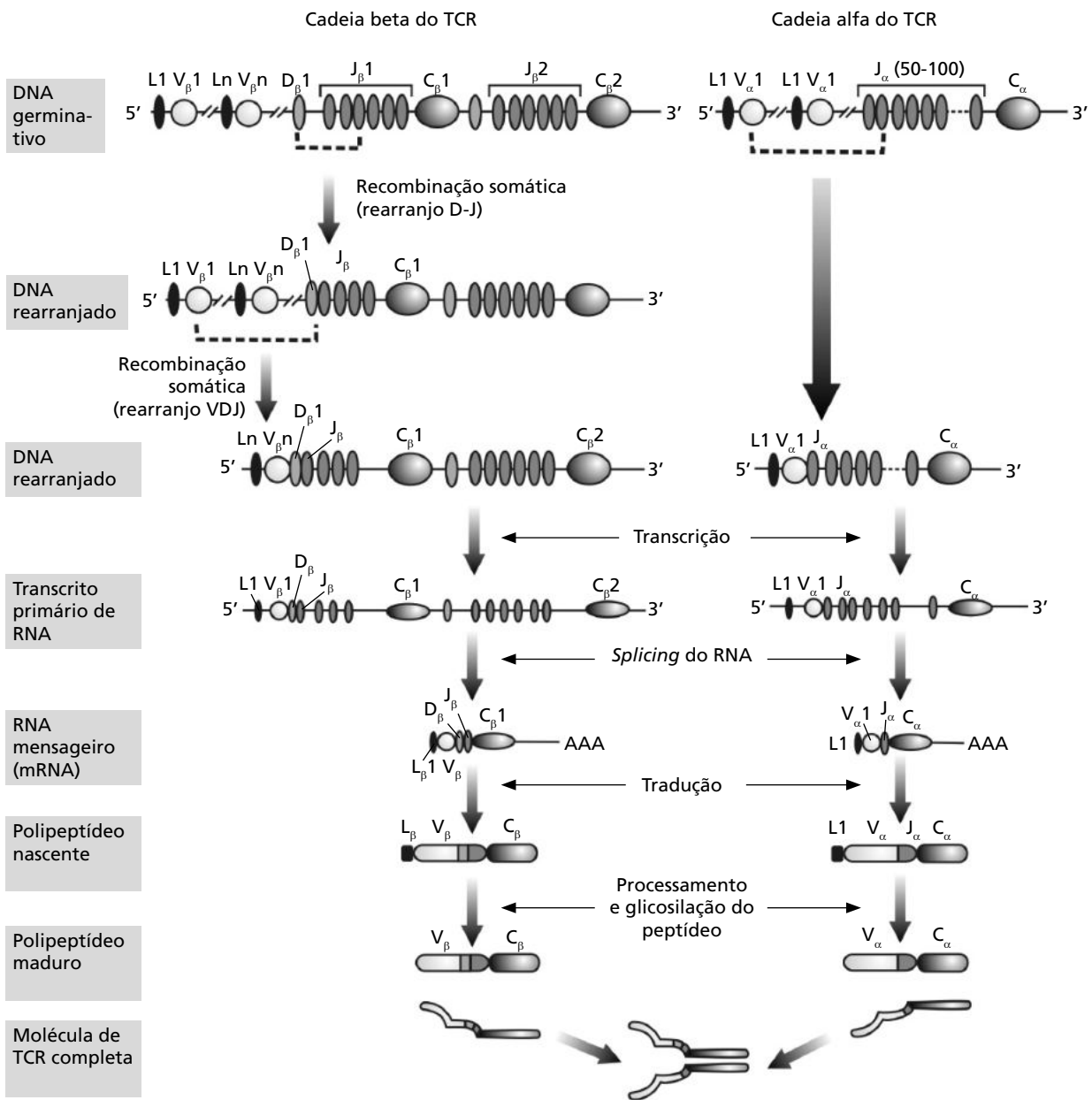


Figura 9.6: Recombinação dos segmentos gênicos que codificam para cadeias alfa e beta no fluxo de produção dos TCRs.

Estes processos são muito semelhantes aos anteriormente descritos para imunoglobulinas e também seguem uma ordem precisa. Nas etapas iniciais da diferenciação das células que darão origem ao linfócito T ocorre primeiro o rearranjo da cadeia beta. No primeiro rearranjo, apenas um dos dois segmentos gênicos D ($D\beta 1$ ou $D\beta 2$) se justapõe a um dos seis segmentos J de $J\beta 1$ ou a um dos seis segmentos J de $J\beta 2$, gerando a seqüência rearranjada DJ. Isto acontece no cromossomo 7 humano e no 6 murino. Prossegue-se o rearranjo trazendo um dos diversos segmentos gênicos V para perto do segmento rearranjado DJ, formando a seqüência VDJ rearranjada. O RNA nuclear que resulta desta fase do desenvolvimento celular sofrerá *splicing* (retirada de íntrons e emenda de éxons) para formar o RNA mensageiro funcional que codifica para a cadeia beta inteira e que conterá a seqüência VDJ rearranjada e apenas um dos dois segmentos gênicos (presentes no DNA e no RNA nuclear) que codificam para o domínio constante da cadeia beta do TCR. O rearranjo gênico da cadeia alfa se dá em semelhança ao rearranjo da cadeia beta. Porém não há segmento gênico D no DNA que codifica para a cadeia alfa e a seqüência rearranjada gerada do segmento VJ. O grande número de segmentos gênicos J no DNA que codifica para a cadeia alfa do TCR possibilita grande diversidade de produtos gênicos rearranjados. O RNA nuclear que se forma a partir desta etapa da recombinação gênica do DNA sofrerá *splicing* para retirada das seqüências de DNA (íntrons), que permanecem entre a seqüência rearranjada VJ e o segmento gênico que codifica para o domínio constante da cadeia alfa do TCR. O RNA mensageiro maduro que codifica para a cadeia alfa completa tem a seqüência rearranjada $VJ\alpha$.

Esteja atento ao fato de que a seqüência gênica que codifica para o peptídeo líder (L), conforme descrito no **Quadro 9.2**, é mantida desde o DNA até o RNA mensageiro tanto para as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas quanto para todas as cadeias polipeptídicas do TCR, conforme você pode ver nas figuras. Relembramos que essa seqüência sinaliza para a entrada das cadeias polipeptídicas, recém-sintetizadas nos ribossomos, para o retículo endoplasmático e lá será clivada. De maneira semelhante se processa a recombinação somática para gerar as seqüências rearranjadas nas cadeias gama e delta, não mostrada na **Figura 9.6**.



Você certamente tem notado que sempre utilizamos expressões e siglas que são do idioma inglês nas nossas aulas de Imunologia. Não fazemos isto por acaso, mas sim para que os estudantes possam estar familiarizados com estes termos (universalmente utilizados), e quando forem buscar a literatura em Imunologia não tenham maiores dificuldades. Cada vez menos, em todas as áreas das ciências, as siglas são traduzidas do idioma inglês para outros idiomas. Também cada vez mais palavras do idioma inglês são incorporadas aos demais idiomas nos diversos campos da ciência e da tecnologia. Esta é uma tendência sem retorno. Este não é um efeito perverso da globalização, mas uma maneira prática e eficiente de se comunicar. Assim, aconselhamos a quem ainda não está fluente com a leitura em inglês que escolha sua disciplina predileta e leia livros e artigos escritos em inglês. Este é o melhor caminho para se aprender, pois o seu interesse será seu aliado na persistência que será necessária.

DE ONDE VÊM OS NÚMEROS QUE REFLETEM O TAMANHO DA DIVERSIDADE DO REPERTÓRIO LINFOCITÁRIO?

Temos dito que o tamanho do repertório linfocitário (linfócitos T e B) pode ter magnitude em torno de 10^9 a 10^{11} possibilidades de reconhecimento de estruturas moleculares diferentes. De onde vêm tais estimativas? Conforme você viu, no DNA da célula linfóide, que dará origem aos linfócitos T e B, existem muitos segmentos gênicos (segmentos V D J) que codificarão o domínio variável dos anticorpos e TCRs. Eles estão separados, no DNA, por íntrons e após a recombinação somática são trazidos juntos para formar seqüências justapostas VDJ (nas cadeias pesadas das Igs, e cadeias beta e delta dos TCRs) ou VJ (nas cadeias leves das Igs e nas cadeias alfa e gama dos TCRs) no DNA dos linfócitos T e B. Porque estas junções são aleatórias (isto é, ao acaso), um número muito grande de possibilidades de receptores contendo diferentes combinações VDJ ou VJ podem resultar da recombinação somática. Vamos observar o **Quadro 9.4** para termos uma idéia de como se pode estimar a possibilidade no repertório de linfócitos B dos camundongos.

Observe, no **Quadro 9.4**, apenas o número de seqüências gênicas funcionais (não estão sendo considerados os chamados pseudogenes que você viu na **Figura 9.3**, pois os pseudogenes não geram *seqüências funcionais*, conforme veremos a seguir). Veja também, os números resultantes das possibilidades de recombinação para gerar a diversidade de repertório dos linfócitos B de camundongos. Cálculos semelhantes para estimar as possibilidades de recombinação podem ser feitos para calcular o repertório dos linfócitos B humanos e dos linfócitos T de humanos e camundongos (murinos).

Quadro 9.4: Número de segmentos gênicos funcionais que codificam para os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas e cálculo estimado do repertório dos linfócitos B de camundongos

Segmento gênico	Número de segmentos gênicos no DNA germinativo (antes da recombinação somática)		
	Cadeia leve λ	Cadeia leve κ	Cadeia pesada
V	2	250	250-1000
J	0	0	12
D	3	4	4
Recombinação somática gerando associações V x J ou V x D x J.	6	1000	$1,2 \times 10^3$ a $4,8 \times 10^3$
Possibilidades de associação entre as cadeias leves λ e cadeias pesadas	$7,2 \times 10^3$ a $2,8 \times 10^4$		
Possibilidades de associação entre as cadeias leves κ e cadeias pesadas	$1,2$ a $4,8 \times 10^7$		
Tamanho possível estimado do repertório final de anticorpos	$8,4 \times 10^{10}$ a $7,6 \times 10^{11}$		

OS MECANISMOS MOLECULARES DA RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA. A IMPORTÂNCIA DOS GENES RAGs E SEUS PRODUTOS!

Você sabe o que é RAG?

Deseja saber?

Busque na rima,
incentivo que anima
oi você!
menino ou menina
e procure saber!

Esta não é uma aula de poesia. Mas apostamos que você queira, agora, saber o que é RAG, e ao saber você concluirá que os genes RAGs na verdade são essenciais na produção da diversidade das imunoglobulinas e TCRs. Os genes RAG (do inglês *recombination-activating genes*) codificam para enzimas (proteínas) que são importantes na geração de diversidade das imunoglobulinas e dos TCRs. Sem estas enzimas a geração de diversidade não seria possível. Aguarde e veja adiante por quê!

Você acaba de conhecer o mecanismo geral da recombinação somática e como está organizada a seqüência germinativa dos segmentos gênicos, que codificam para os domínios variáveis das Igs e TCRs no DNA das células que estão se diferenciando em linfócitos B e T, respectivamente. Agora, então, vamos conhecer, no nível molecular, como ocorre a recombinação somática. O processo de recombinação somática conta com a atuação de dois tipos de enzimas: 1) enzimas que ocorrem (são expressas) *apenas* nas células que estão se diferenciando em linfócitos T e B; 2) enzimas de reparo de DNA, *ubíquas*, isto é, enzimas que estão envolvidas nos processos de reparo de DNA encontradas sem restrições, ou seja, em qualquer tipo celular, inclusive nos próprios linfócitos. Estes dois tipos de enzimas são chamados, no seu conjunto, V(D)J *recombinases*. São diversas enzimas que compõem o conjunto das V(D)J recombinases e elas não serão tratadas por nós em separado e sim no seu conjunto, porém discriminando entre aquelas que são típicas apenas da linhagem linfocitária e as que são ubíquas. A letra D aparece entre parênteses porque as recombinases participam tanto da recombinação VJ quanto da recombinação VDJ.

As recombinases V(D)J que são expressas apenas nas células que estão se diferenciando em linfócitos T ou B reconhecem regiões do DNA chamadas *seqüências sinais para recombinação* (RSS *recombination signal sequence*). Tais seqüências são compostas por segmentos altamente conservados e seqüências não conservadas (aleatórias), como veremos a seguir, e sinalizam para a união VJ e VDJ. Estas recombinases são proteínas diméricas, produtos de dois genes *RAG* (*recombination-activating genes*), RGA-1 e RAG-2, e têm o mesmo nome de seus genes, isto é, são chamadas proteínas (as quais são enzimas) RGA-1 e proteína RGA-2. Para termos uma idéia da importância destas enzimas, basta dizer que os animais que não possuem genes RAG (por algum defeito genético natural ou induzido), falham em produzir Igs e TCRs. Os genes RAGs são ativos apenas nas células que estão se diferenciando em linfócitos B e T, e eles estão ativos na fase que precede a recombinação somática. Isto quer dizer que, nos linfócitos T e B maduros que têm seus segmentos gênicos que codificam para os domínios variáveis já rearranjados, nem os genes RAGs e nem os seus produtos (enzimas) estão ativos ou atuando. Por esta razão, não ocorrem mais rearranjos gênicos nos linfócitos T e B maduros.

Dois tipos de seqüências conservadas no DNA são reconhecidas pelas recombinases V(D)J. Uma delas tem 7 nucleotídeos (heptâmero) e a outra tem 9 nucleotídeos (nonâmero). Ambos, heptâmeros e nonâmeros, são seqüências altamente conservadas. Estas seqüências se dispõem da seguinte maneira no DNA germinativo: a 3' de cada seguimento V, a 5' de cada segmento J e flanqueando ambos os lados dos segmentos D.

Fazendo ainda parte da região RSS (*recombination signal sequence*) no DNA germinativo das células das linhagens linfocitárias (ou linfocíticas) que se diferenciarão em linfócitos T e B (antes da recombinação somática), existem, também, na região que codifica para a porção variável da Igs e TCRs, segmentos de DNA de 12 ou 23 nucleotídeos não conservados (que correspondem aproximadamente a uma e duas voltas da hélice de DNA), os quais se intercalam entre os nonâmeros e heptâmeros conforme mostrado na **Figura 9.7.a**.

Observe a **Figura 9.7.b** para você ver os locais onde estão os heptâmeros nonâmeros, os quais apresentam seqüências complementares, sendo algumas delas **PALINDRÔMICAS**. As seqüências dos heptâmeros e nonâmeros podem se parear quando uma alça de DNA dobra sobre si mesma durante o processo de recombinação somática.

Os heptâmeros e nonâmeros que flanqueiam a região VL são complementares aos heptâmeros e nonâmeros que flanqueiam JL. Você já deve ter concluído que tanto os heptâmeros quanto os nonâmeros e também as seqüências de 12 e 23 pares de bases são íntrons, certo?

A palavra **PALÍNDROMO** deriva da palavra grega *palíndromos* *Pálin* (para trás, em sentido contrário) e *drómos* (corrida). Palavras ou versos palíndromos podem ser lidos de trás para frente e de frente para trás mantendo-se idênticos. Ana e Oto são exemplos de nomes palíndromos. As seqüências palindrômicas ou seqüências palíndromos são aquelas que possuem 2 eixos de rotação de simetria perpendicular à hélice do DNA. Em decorrência disto, a seqüência de bases das duas cadeias é idêntica quando lida na mesma direção de polaridade. Exemplo:

5'GGGAAATTTCCC3'
3'CCCTTTAAAGGG5'

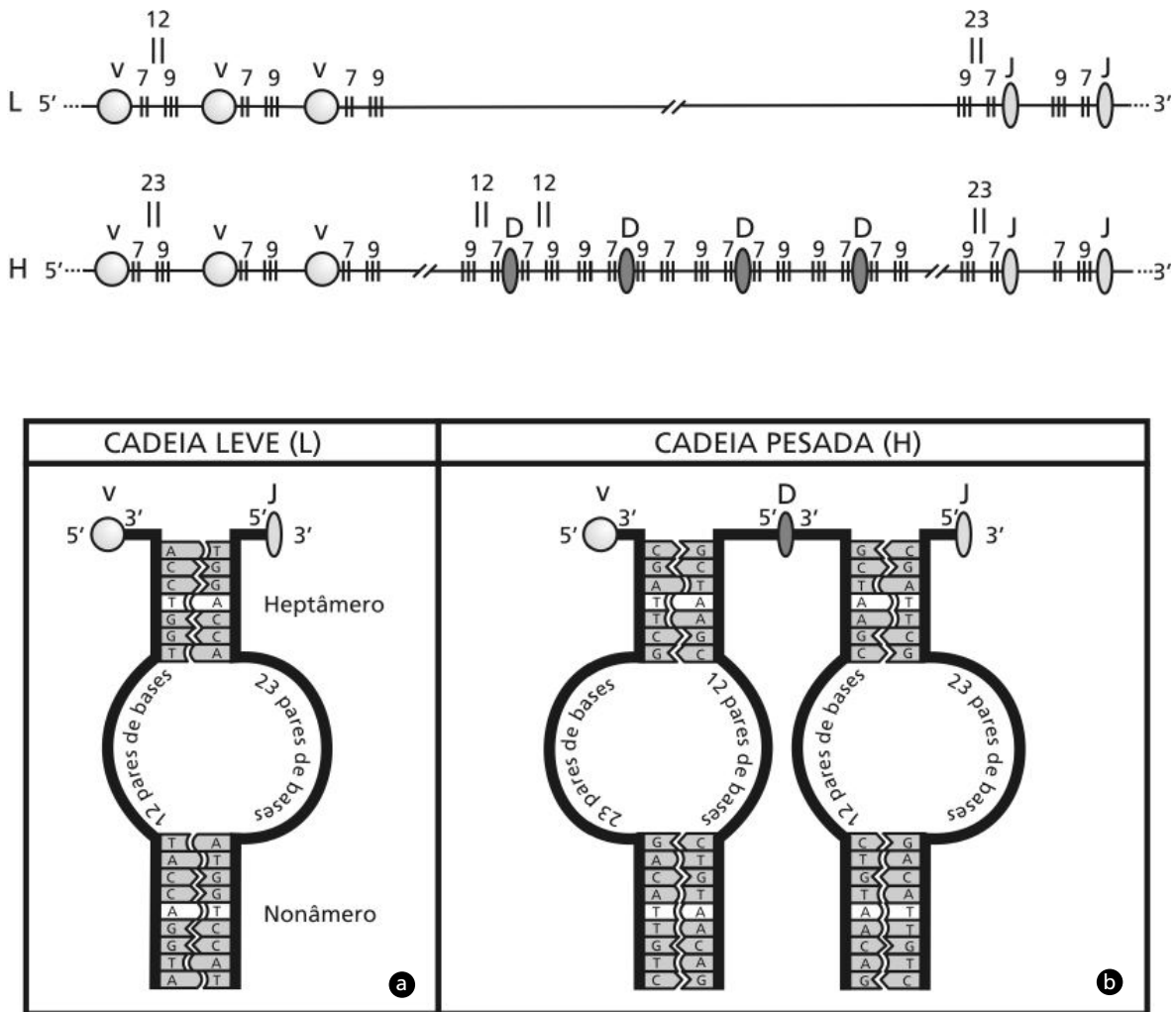


Figura 9.7: (a) Desenho esquemático da sequência germinativa que codifica para a cadeia leve kappa destacando heptâmeros e nonâmeros e as sequências de 12 e 23 nucleotídeos; (b) detalhes de pareamento entre heptâmeros e nonâmeros (observe algumas sequências palindrômicas marcadas em cinza claro).

Existe uma regra para que ocorram as junções VJ e VDJ. As junções somente ocorrem entre segmentos de 12 e de 23 pares de bases. Vamos explicar esta regra com a ajuda da **Figura 9.8**, que descreve a junção VDJ no DNA germinativo que codifica para Igs. Primeiro ocorre a junção DJ conforme já lhe dissemos e você viu na **Figura 9.5**, agora veja o porquê na **Figura 9.8.a**. Observe que existe uma sequência de 12 pares de nucleotídeos a 5' do segmento gênico D e uma sequência de 23 pares de nucleotídeos a 3' do segmento gênico J que se juntam. O segmento V não pode se juntar diretamente ao segmento J pois ambos os segmentos estão flanqueados por segmentos 23 pares de bases.

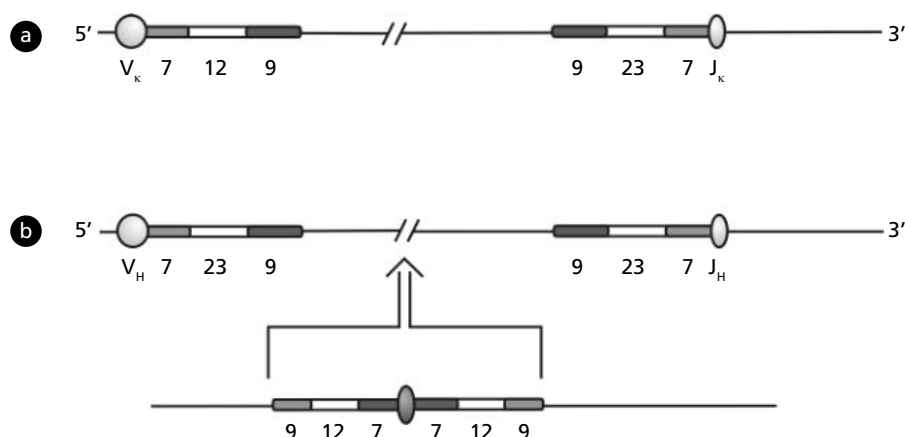


Figura 9.8: Junção VDJ no DNA germinativo.

Veja na **Figura 9.8.b** que no processo de junção do segmento VJ ocorre a excisão dos segmentos que contêm os heptâmeros e nonâmeros para proporcionar aproximação do segmento V com o J. Este segmento de DNA, que é eliminado do cromossomo por excisão, é circular e pode ser experimentalmente detectado conforme mostrou Okazaki e colaboradores em publicação na revista *Cell* de 1987. O mecanismo circular de excisão do DNA nas junções V(D)J é um dos mecanismos possíveis. Existe outro também que é chamado inversão, que vai ocorrer quando segmentos gênicos V estiverem em orientação de transcrição oposta da usual (comum de acontecer em cadeias leves κ). Veja na **Figura 9.8.b**. Assim, a disposição de heptâmeros e nonâmeros em relação aos segmentos gênicos V estarão na mesma orientação que os heptâmeros e nonâmeros do segmento J, e para haver a junção VJ deverá ocorrer a inversão. Veja na **Figura 9.8.b**. As inversões são relativamente comuns de acontecerem no rearranjo somático de cadeias káppa (com frequência de até 50%). No entanto, para a maioria das recombinações somáticas para a produção de Igs e TCRs ocorre a excisão de DNA circular.

As enzimas, que são produzidas pelos genes RGA-1 e RAG-2, agem de modo a promover quebras no DNA para que ocorram as junções entre segmentos que estavam distantes entre si na seqüência germinativa do DNA. Outras enzimas do conjunto das V(D)J recombinases (ubíquas) são envolvidas para promover o reparo do DNA.

Vimos na **Tabela 9.4** que a combinação de segmentos gênicos de maneira aleatória faz com que seja possível a geração de um enorme número de possibilidades de estruturas e Igs, o que é válido também para os TCRs. Outros mecanismos contribuem também de maneira pontual e importante para a geração de diversidade. Durante o processo de quebra e reparo do DNA, alguns nucleotídeos são excluídos ou adicionados no DNA rearranjado. A diversidade é criada nas junções dos segmentos gênicos pela adição e eliminação ao acaso de nucleotídeos. Nucleotídeos nas posições finais dos éxons V, D e J são normalmente excluídos (deletados) no processo de recombinação somática e novos nucleotídeos, que não faziam parte do DNA que originalmente codificava para aquelas seqüências, chamados *nontemplated nucleotides* (que são os nucleotídeos que não estavam no “molde”), são adicionados. Estes nucleotídeos são chamados *N-nucleotídeos* (N de *nontemplated*) e são importantes na geração de diversidade. O número de nucleotídeos excluídos e adicionados pode variar, sendo que a adição de até 20 nucleotídeos já foi descrita. Em contrapartida, se nucleotídeos nas posições finais dos éxons V, D e J não são excluídos, pode ocorrer que seqüências palindrômicas (as quais não são codificadoras conforme vimos anteriormente nos nonâmeros e heptâmeros) passem a fazer parte da região final de codificação. Estes nucleotídeos são chamados *P-nucleotídeos* (P de palindrômicos). Se você quiser ler mais sobre este assunto com perspectiva evolutiva acesse o *link* <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/164/4/1916>.

Você deve estar pensando que muitos erros podem acontecer neste processo com a geração de códigos de terminação (*termination codons*). De fato isto acontece. Em tese, de cada três eventos de junção na recombinação somática, apenas um “vinga”, isto é, dá certo e produz TCRs e Igs funcionais! Este é o “preço” que se paga para a geração de diversidade dos anticorpos e TCRs. Você se lembra da região CDR3 dos domínios variáveis dos anticorpos na Aula 6? (se não se lembra dê uma olhada rapidamente para se lembrar). Aquelas regiões nos anticorpos (que também se fazem presentes no TCRs) correspondem às regiões onde há a maior variabilidade de seqüências de aminoácidos em toda a região variável da molécula de anticorpo e TCRs, certo? Sabe por quê? Porque aquelas regiões correspondem às regiões dos sítios de recombinações VJ e VDJ que acabamos de descrever. Nestes locais acontecem as adições de nucleotídeos N e P. Temos visto que muitas

células da linhagem linfocitária morrem de apoptose durante o processo de geração de linfócitos na medula óssea e no timo. Os erros passíveis de acontecer no processo de geração de diversidade de Igs e TCRs podem levar à morte muitas células que não geraram Igs e TCRs produtivos. Vamos ver isto, a seguir.

O FENÔMENO DA EXCLUSÃO ALÉLICA NA PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS E TCRs: COMO O SISTEMA GARANTE A DIVERSIDADE E A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS FUNCIONAIS DE IMUNOGLOBULINAS E TCRs E A SIMETRIA DOS ANTICORPOS!

Acabamos de lhe mostrar como se organiza a informação no genoma das células linfóides que dão origem aos linfócitos T e B e como, durante o amadurecimento destas células, o DNA é rearranjado para dar origem a um imenso número de combinações possíveis na porção variável das Igs e dos TCRs. Agora vamos lhe apresentar um lado desta história que deixamos para trás por uma questão didática, mas que acontece também durante o processo da recombinação somática. Estamos falando de um fenômeno chamado *exclusão alélica*.

Como você já viu, os genes que codificam para a síntese de imunoglobulinas e TCRs estão situados em vários cromossomos (veja novamente o **Quadro 9.1**). O processo de recombinação somática é bastante sofisticado e porque não dizer “arriscado e audacioso”, podendo, em consequência, levar a erros, como você já sabe. Assim, para que pudéssemos estar aqui agora fazendo milhares de coisas, dentre elas estudando esta disciplina, algo de muito importante na organização genômica deste sistema aconteceu durante os milhões de anos da evolução. Estamos falando da localização de genes que compõem as cadeias leves e pesadas de Igs bem como dos genes que codificam para as cadeias dos TCRs.

Você também já viu que esses genes estão localizados em cromossomos diferentes. Este tipo de organização foi estratégico e deu certo (fundamentalmente no caso dos anticorpos e em menor grau no caso dos TCRs) por causa do fenômeno da exclusão alélica. A exclusão alélica viabilizou poder-se “ousar”, produzindo mecanismos “econômicos” de geração de diversidade o qual é arriscado (pois produz muitos erros), ao mesmo tempo em que permitiu que novas tentativas

exitosas de arranjos gênicos acontecessem. Veja como isto acontece para a produção de seqüências gênicas que codificam para anticorpos. Durante o processo de recombinação somática, em apenas *um* dos dois cromossomos (paterno ou materno) ocorre, inicialmente, o rearranjo dos genes que codificam para a produção de cadeias pesadas (que é aquela que se rearranja primeiro, conforme vimos). Se erros ocorrem de modo a inviabilizar o rearranjo gênico em curso para a produção de seqüências gênicas VDJ μ produtivas (conforme descrito na seção “Recombinação somática dos genes que codificam para as cadeias peptídicas dos anticorpos e TCRs”), o mesmo processo é iniciado no outro cromossomo. Em contrapartida, se a recombinação gênica dá certo e ocorre a produção de cadeias pesadas μ , o outro cromossomo é inativado e não mais poderá produzir rearranjo somático. Esse processo de inativação do outro alelo que também codifica para a cadeia pesada na mesma célula é chamado *exclusão alélica* (exclusão do outro alelo). Esse mecanismo também garante que seja produzido, por célula, Igs com apenas um único tipo de arranjo VDJ para a produção de cadeias pesadas. Isso garante a clonalidade dos linfócitos B bem como a simetria dos anticorpos que são compostos por quatro cadeias polipeptídicas, dentre elas duas cadeias pesadas idênticas entre si. O mesmo processo acontecerá na recombinação somática que vai gerar seqüências gênicas funcionais ou não funcionais para a produção de cadeias leves. Nesse caso, ocorrendo o arranjo funcional em um dos quatro cromossomos possíveis (lembramos que são os cromossomos maternos e paternos para as cadeias κ e λ), o fenômeno da exclusão alélica inativará a possibilidade de recombinação somática nos outros três cromossomos. Assim estará garantida, também, a produção de apenas um tipo de cadeia leve ou cáppa ou lambda, com apenas um único tipo de rearranjo VJ, o que garantirá a produção de cadeias leves idênticas entre si. Agora estamos certos de que você compreende de onde vem a simetria dos anticorpos que são moléculas compostas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas pesadas idênticas entre si e duas leves idênticas entre si, compondo a simetria da molécula.

Na recombinação somática para a produção de TCRs também ocorre exclusão alélica, porém de maneira diferente daquela vista na recombinação somática para a produção de Igs. O arranjo funcional da seqüência VDJ β (que codificará para a produção de cadeias polipeptídicas

beta), em um dos cromossomos (paterno ou materno), causará a inativação da recombinação somática para a produção do arranjo VDJ no outro cromossomo. No entanto, a recombinação somática para a produção das cadeias polipeptídicas alfa dos TCRs não produz exclusão alélica no outro cromossomo. Assim, até 30% dos linfócitos T do tipo $\alpha\beta$ maduros expressam TCRs com diferentes cadeias alfa mas com a mesma cadeia beta. Evidências experimentais indicam que o fenômeno da exclusão alélica pode acontecer tanto durante a recombinação somática que gera seqüências funcionais para γ , quanto para δ nos linfócitos T com TCR do tipo $\gamma\delta$.

Vamos para mais uma atividade que tem como objetivo consolidar o aprendizado do fenômeno da exclusão alélica.



ATIVIDADES

3. O quadro a seguir mostra cromossomos maternos e paternos com as informações para a produção de imunoglobulinas em um indivíduo da espécie humana, com códigos fictícios para os cromossomos maternos e paternos. Utilize as informações deste quadro e demais informações desta aula para responder às perguntas.

Origem	Código dos cromossomos com as informações para cadeias pesadas	Código dos cromossomos com as informações para cadeias leves káppa	Código dos cromossomos com as informações para cadeias leves lambda
Materna	MH	MK	ML
Paterna	PH	PK	PL

a) Quantos cromossomos, em cada célula, contêm as seqüências gênicas funcionais rearranjadas VJ e VDJ para a produção de cadeias leves e pesadas?

b) Quantas e quais as combinações possíveis de acontecer em cada célula? Para compor sua resposta, considere inclusive a possibilidade de exclusão de todos os alelos maternos ou paternos em uma única célula. Discrimine quais as combinações possíveis em caso de exclusão alélica de todos os cromossomos maternos e paternos.

RESPOSTAS COMENTADAS

a) Apenas dois cromossomos, um para a cadeia leve e outro para a cadeia pesada.

b) São 8 combinações possíveis.

Combinações possíveis em caso de exclusão de todos os alelos paternos:

1) MH, MK e 2) MH, ML; (cadeias pesadas de origem materna com cadeias leves de origem materna ou κ ou λ)

Combinações possíveis em caso de exclusão de todos os alelos maternos:

3) PH, PK e 4) PH, PL (cadeias pesadas de origem paterna com cadeias leves de origem paterna ou κ ou λ)

Outras combinações possíveis: 5) MH, PK; 6) MH, PL; 7) PH, MK; 8) PH, ML (cadeias pesadas de origem materna com cadeias leves de origem paterna ou κ ou λ ; e cadeias pesadas de origem paterna com cadeias leves de origem materna ou κ ou λ).

4. Em caso de haver exclusão alélica de todos os cromossomos paternos ou maternos, conforme descrito na Atividade 3, você acredita que os linfócitos B que carregariam uma destas combinações seriam idênticos, isto é, produziriam anticorpos idênticos aos de seu pai ou de sua mãe?

RESPOSTA COMENTADA

Não, por causa do caráter aleatório da recombinação somática. Para que fossem idênticos deveria haver coincidência em todas as 10^{11} possibilidades de recombinação que geram a diversidade das imunoglobulinas, conforme vimos no **Quadro 9.4**. Isto faz com que aquela possibilidade seja um fato praticamente impossível, certo?

Chegamos ao final de mais uma aula de nossa disciplina, cujo assunto resume muitos anos de pesquisas intensas de diferentes gerações de cientistas. No entanto, conforme você viu há ainda muito que pesquisar principalmente sobre os processos envolvidos no controle gênico da recombinação somática! Vamos fazer nossa atividade final com uma situação simulada mas que deve lhe ser familiar.

ATIVIDADE FINAL

Você se lembra da novela *O Clone*? Naquela novela um cientista, o Dr. Albieri clonou um indivíduo (o Léo) a partir da retirada de suas células. Vamos nós como o Dr. Albieri clonar o Léo nesta atividade? Para isto não vamos usar células-tronco, que seriam as recomendadas para a produção de qualquer clone (sem considerar os aspectos éticos é claro, mas apenas a título de exercitar os conceitos), vamos pegar um clone de linfócito B maduro do Léo para cloná-lo como indivíduo. Então, considerando que nosso experimento de clonagem terá sucesso, o bebê Leozinho nascerá saudável. Perguntamos: a) como será o repertório dos linfócitos B?; e b) como será o repertório dos linfócitos T do Leozinho?

RESPOSTAS COMENTADAS

a) O repertório dos linfócitos B do Leozinho será limitado, pois apenas um tipo de imunoglobulina será possível de ser formado. Isto ocorre porque clonamos o Leozinho a partir de um linfócito B maduro, o qual já havia sofrido recombinação somática. Assim todas as células do Leozinho (inclusive os linfócitos B) terão as informações dos segmentos gênicos V(D)J já rearranjados. Portanto, todo o restante do DNA que codificava para os vários segmentos gênicos V J e VDJ foi eliminado. Mas, para que nossa resposta esteja correta, precisamos assumir que a exclusão alélica eliminou para sempre as possibilidades de rearranjo gênico nos cromossomos que tiveram os genes alelos para cadeia pesada e cadeias leves, inativados pelo processo de exclusão alélica no linfócito B do Léo que deu origem ao Leozinho.

b) O repertório dos linfócitos T do Leozinho será diverso, pois não ocorreu a recombinação somática completa dos genes que codificam para as cadeias polipeptídicas α , β , γ e δ dos TCRs. Veja que mencionamos “recombinação somática completa”. Porque, na verdade, durante o processo de recombinação somática que vai dar origem aos linfócitos B maduros, observa-se que pode haver recombinação somática DJ nos cromossomos que contêm a informação para a síntese de cadeias polipeptídicas do TCR. O contrário também é verdadeiro, ou seja, durante o processo de recombinação somática que vai dar origem aos linfócitos T maduros, observa-se a ocorrência de recombinação do tipo DJ nos cromossomos que têm a informação para a síntese de Igs. Mas estas recombinações param e no curso da recombinação somática dos linfócitos T, apenas os genes que codificam para as cadeias polipeptídicas dos TCRs são completadas, o mesmo sendo verdadeiro para os linfócitos B.

RESUMO

A geração de diversidade e anticorpos e dos receptores antigênicos dos linfócitos T (TCRs) intrigou durante muitos anos geneticistas e imunologistas. Apenas em meados dos anos 1970, é que foi possível vislumbrar que se estava diante de uma situação absolutamente nova e inusitada de organização de material genômico que proporcionava a geração de diversidade dos anticorpos (e mais tarde dos TCRs) com economia de material genético. Estes conhecimentos revolucionaram a Imunologia e tiveram forte impacto em diversas áreas da Biologia e das Ciências da Saúde. Muitas pesquisas ainda nesta área do conhecimento serão necessárias para que se possa compreender melhor os mecanismos moleculares que controlam a geração de diversidade de anticorpos e TCRs.

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, estudaremos o complexo principal de histocompatibilidade e o processamento e apresentação de antígenos. Lembra-se de que comentamos, nesta aula, que outras moléculas são necessárias para que os linfócitos T reconheçam antígenos? O complexo principal de histocompatibilidade (que é um complexo gênico) codifica para proteínas que são essenciais para nossa identidade imunológica, bem como para que os linfócitos T com o TCR do tipo alfa beta reconheçam antígenos. Aguarde!

**Atividade presencial
obrigatória:
Estudo dirigido referente às
Aulas 1-9**

AULA

10

Imunologia

Referências

Aula 1

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

CDC. Smallpox vaccination and adverse events training module. Disponível em: <<http://www.bt.cdc.gov/training/smallpoxvaccine/reactions/smallpox.html>>. Acesso em: 29 nov. 2004.

KUBY, Janis. *Immunology*. 4.ed. New York: WH Freeman and Company, 2000. 664p.

O PORTAL dos imunobiológicos: vacinas, soro, imunoglobulinas. Disponível em: <<http://www.vacinas.org.br>>. Acesso em: 19 jan. 2005.

PAUL, William E. *Fundamental immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. 1589p.

Sobre a história de Frankenstein

FRANKENSTEIN. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/hmd/frankenstein>>. Acesso em: 20 nov. 2004.

História de transplantes na Medicina:

REVISTA Prática Hospitalar. [Online]. Disponível em: <<http://www.praticahospitalar.com.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2004.

Aula 2

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

BORREGAARD, Niels. *Antibiotic molecules: intracelular*. In: *ENCYCLOPEDIA of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group, 2001

KUBY, Janis. *Immunology*. 4.ed. New York: Freeman, 2000. 664p.

LEER, Robert I. Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology*, New York, v. 2, p. 727-738, sept. 2004.

TAKEDA, Kiyoshi; KAISHO, T.; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors. Japan, *Annu. Rev Immunol*, v. 21, p. 335-76, 2003.

Aula 3

BORROR, Donald J.; DELONG, Dwight M. *Introdução ao estudo dos insetos*. São Paulo: Edgard Blücher, 1988.

BUZZI, Zundir José; MIYAZAKI, Rosina D. *Entomologia didática*. 3.ed. Paraná: Ed. UFPR, 1999.

DALY, Howell V.; DOYEN, John T.; PURCELL, Alexander H. *Introduction to Insect biology and diversity*. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1998.

ROSS, Herbert H.; ROSS, Charles A.; ROSS, June R. P. *A textbook of entomology*. 4.ed. Singapore: John Wiley & Sons Publishing, 1982.

STRONG, Donald R.; LAWTON, Juhn H.; SOUTHWOOD, Richard. *Insects on plants: community patterns and mechanisms*. London: Blackwell Scientific Publications, 1984.

Aula 4

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

BRENNER, M. B et al. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*, v. 322, n. 6075, p. 145-149, jul. 1986

CALICH, Vera Lucia; VAZ, Celidéia. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

GOLDSBY, Richard A. et al. *Immunology*. 5.ed New York: Freeman, 2000. 664p.

KUBY Immunology. Disponível em: <<http://www.whfreeman.com/kuby/>>. Acesso em: 04 abr. 2005.

WEINTRAUB, B. C, HEDRICK, S. M. The enigmatic specificity of gamma delta T cells. *Immunol Res.*, v. 14, n. 3, p. 163-75, 1995.

Aula 5

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. *Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças*. Brasília: MS/SPS, 1999. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/guia_trat_crianca.htm>. Acesso em: 29 abr. 2005.

CALICH, Vera Lucia; VAZ, Celideia. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FUBINI, B; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, v. 34; n. 12; p. 1507-16, jun. 2003.

KUBY, Janis. *Immunology*. 4.ed. New York: Freeman, 2000. 664p.

SILVA, Wilmar Dias da; LEPOW, I. H. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J. Exp. Med.* v. 125, p. 921-946.

SITES RECOMENDADOS

ANTI-HIPERTENSIVO. Disponível em: <<http://inventabrasilnet.t5.com.br/hiper.htm>>. Acesso em: 29 abr. 2005.

NATIONAL Library of Medicine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=MeSH&term=Neuropeptides>>. Acesso em: 29 abr. 2005.

POLONSKY, Judith. et al. Release of 1-O-alkylglyceryl 3-phosphorylcholine, O-deacetyl platelet-activating factor, from leukocytes: chemical ionization mass spectrometry of phospholipids. *Pub. Med.* [Online]. Abstract. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=350432&blobtype=pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

Aula 6

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5o edição. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

CALICH, Vera; VAZ, Celidéia. *Imunologia*. Revinter, 2001. 260p.

KUBY, Janis. *Immunology*. 5.ed. New York: Freeman, 2003. 551p.

PAUL, William E. *Fundamental Immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. 1589p.

CASTLE, Marbug. Emil von Behring: the founder of serum therapy. Disponível em: <<http://nobelprize.org/medicine/articles/behiring>>. Acesso em 19/04/2005

Shibassaburo Kitasato. Disponível em: <<http://www.historiadelamedicina.org/kitasato.html>>. Acesso em 19/04/2005

Aula 7

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

CALICH, Vera; VAZ, Celidéia. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 260p.

JANEWAY, Charles A. et al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5.ed. Artmed, 2001. 634p.

KUBY, Janis. *Immunology*. 5.ed. New York: Freeman, 2003. 551p.

PAUL, William E. *Fundamental immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. 1589p.

PARSLOW, Tristram et al. *Imunologia médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 684p.

TAMBOURGI, D.V. et al. A partial DNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infection Immunity*, v. 61, n. 9, p. 3656-3663, 1993.

Aula 8

CALICH, Vera; VAZ, Celidéia. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 260p.

FOOD and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cdrh/ode/848.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2005.

KUBY, Janis. *Immunology*. 5.ed. New York: Freeman, 2003. 551p

PARSLOW, Tristram G.; STITES, Daniel P.; TERR, AI; IMBODEN, John B. *Imunologia médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 684p.

Aula 9

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562p.

BATISTA, F. D; EFREMOV; D. G; BURRONE, O. R. Characterization of a second secreted IgE isoform and identification of an asymmetric pathway of IgE assembly. *Proc Natl Acad Sci*, v. 93, n. 8, p. 3399-3404, Apr. 16, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=39620&blobtype=pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

BERNARD, O.; HOZUMI N.; TONEGAWA, S. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell.*, v. 15, n. 4, p. 1133-1144, Dec. 1978.

CALICH, Vera; VAZ, Celidéia. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 260p.

COUEDEL, Chrystelle. et al. Allelic exclusion at the TCR delta locus and commitment to gamma delta lineage: different modalities apply to distinct human gamma delta subsets. *Immunol*, v. 172, n. 9, p. 5544-5552, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/172/9/5544>>. Acesso em: 10 maio 2005.

DREYER, W. J; BENNETT, J. C. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci*, v. 54, n. 3, p. 864-869, Sep. 1965. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=219756&blobtype=pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

HAYMAN, J. Russell; LOBB, Craig J. Heavy Chain Diversity Region Segments of the Channel Catfish: structure, organization, expression and phylogenetic implications.

The Journal of Immunology, v. 164, p. 1916-1924, 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/164/4/1916>>. Acesso em: 10 maio 2005.

HELLMAN, L. Characterization of four novel epsilon chain mRNA and a comparative analysis of genes for immunoglobulin E in rodents and man. *Eur J. Immunol*, v. 23, n. 1, p. 159-67. Jan. 1993.

HOOD, Leroy. E; GRAY, William R; DREYER, William J. On the mechanism of antibody synthesis: a species comparison of L-chains. *Proc Natl Acad Sci*, v. 55, n. 4, p. 826-832, abr. 1966. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=224236&blobtype=pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

HOZUMI, Nobumichi; TONEGAWA, Susumu. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci*, v. 73, n. 10, p. 3628-32, Oct. 1976. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=431171&blobtype=pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

KUBY, Janis. *Immunology*. 5.ed. New York: Freeman, 2003. 551p.

LYCZAK, Jeffrey. B. et al. Expression of novel secreted isoforms of human immunoglobulin and proteins. *J Biol Chem*. v. 271, n. 7, p. 3428-36, Feb. 16, 1996. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/content/full/271/7/3428>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

OKAZAKI, K.; DAVIS, D. D; SAKANO, H. T. Cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell*. v. 49, n. 4, p. 477-85, May 22, 1987.

PEAK, M. M; ARBUCKLE, J. L, RODGERS, K. K. The central domain of core RAG1 preferentially recognizes single-stranded recombination signal sequence heptamer. *J Biol Chem*, v. 278, n. 20, p. 18235-40, May 16 2003.

PENG, C. et al. A new isoform of human membrane-bound IgE. *Eur J. Immunol*, v. 148, n. 1, p. 129-36, jan. 1992.

TONEGAWA, Susumu. Autobiography. Disponível em: <<http://nobelprize.org/medicine/laureates/1987/tonegawa-autobio.html>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

Serviço gráfico realizado em parceria com a Fundação Santa Cabrini por intermédio do gerenciamento laborativo e educacional da mão-de-obra de apenados do sistema prisional do Estado do Rio de Janeiro.



Maiores informações: www.santacabrini.rj.gov.br

ISBN 85-7648-170-7



9 788576 481706



UENF
Universidade Estadual
do Norte Fluminense



Universidade Federal Fluminense
uff



Provedora de acesso à Cidadania



Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro



**GOVERNO DO
Rio de Janeiro**

SECRETARIA DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Ministério
da Educação

