

# DESENVOLVIMENTO E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS

PROF. UDERLEI

# DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS

A maturação dos linfócitos B e T envolve uma série de eventos nos órgãos linfoideos geradores.

Estes eventos incluem os seguintes itens:

- 1º ) *Comprometimento de células progenitoras* com linhagem linfoide B ou T.
- 2º) *Proliferação* de progenitoras e células imaturas comprometidas nos estágios iniciais
- 3º) *Recombinação e expressão dos genes dos receptores de抗ígenos*
- 4º) *Eventos de seleção* que preservam as células produtoras de proteínas receptoras de antígeno funcionais.
- 5º) *Diferenciação das células B e T em subpopulações funcionalmente e fenotipicamente distintas.*

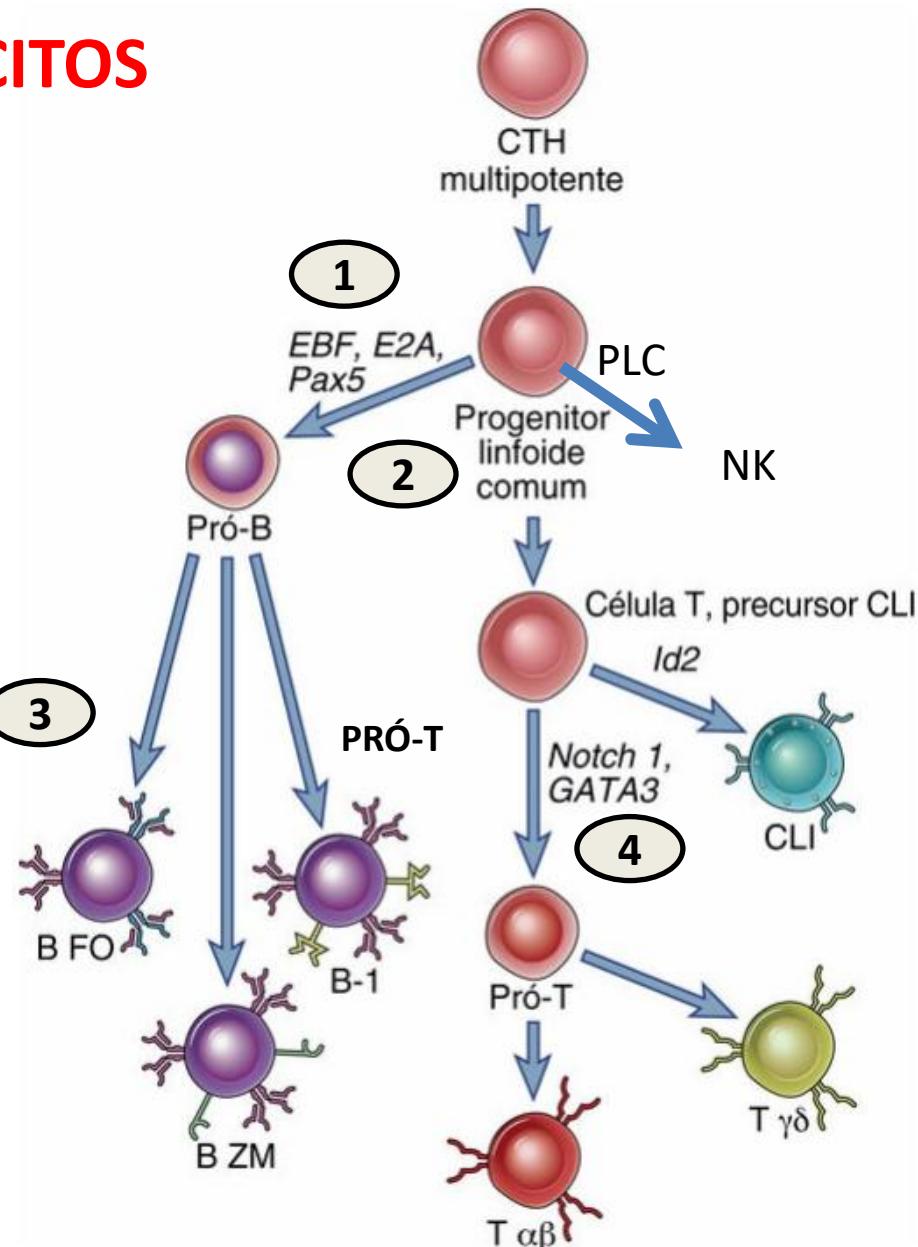
# DESENVOLVIMENTO LINFÓCITOS

1) Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) originam Progenitores Linfoide Comum (PLC).

2) PLCs originam células B e T, além da NK.

3) Células pró-B diferenciam-se em LB Foliculares (FO), LB da Zona Marginal (ZM) e LB-1.

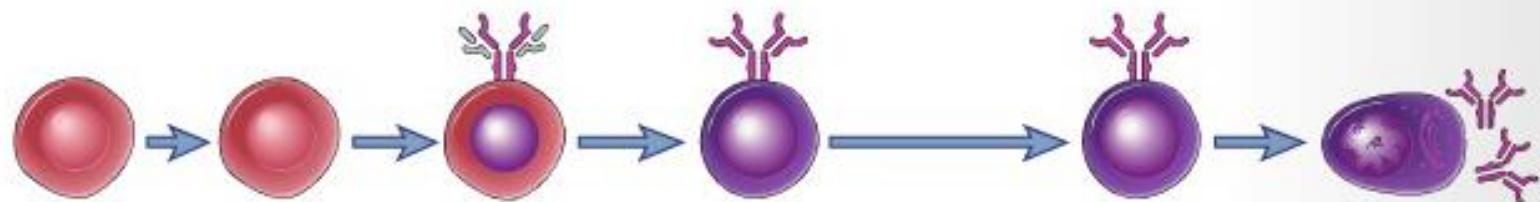
4) As células pró-T podem transformar em células T  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  ou CLI (Células Linfóides Inatas).



O comprometimento com diferentes linhagens é conduzido por vários fatores de transcrição, indicados em itálico.

# Estágios da maturação de linfócitos

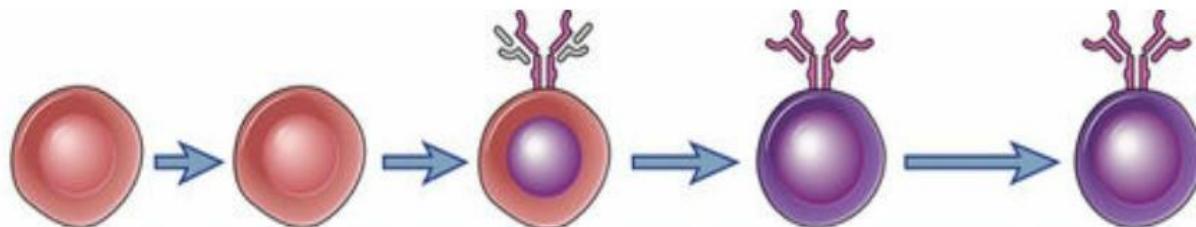
B



Estágio de Maturação	Célula-tronco	Pró-linfócito	Pré-linfócito	Linfócito imaturo	Linfócito maduro	Linfócito efetor diferenciado
Principais Efeitos	Comprometimento e expansão mediados por fatores de crescimento; início do rearranjo dos genes de receptores de抗igenos	Seleção de células que expressam pré-receptores de抗igenos	Seleção do repertório e aquisição de competência funcional	Respostas iniciais	Desempenho das funções efetoras	
Local Anatômico		Órgão produtor (medula óssea ou timo)			Órgão ou tecido linfoide periférico	
Dependência de Antígeno	Não	Antígeno próprio	Antígeno estranho			

Estágios de maturação de Linfócitos B e T. A ilustração mostra a maturação das células B, mas os estágios básicos da maturação das células T são semelhantes.

# DESENVOLVIMENTO LINFÓCITOS



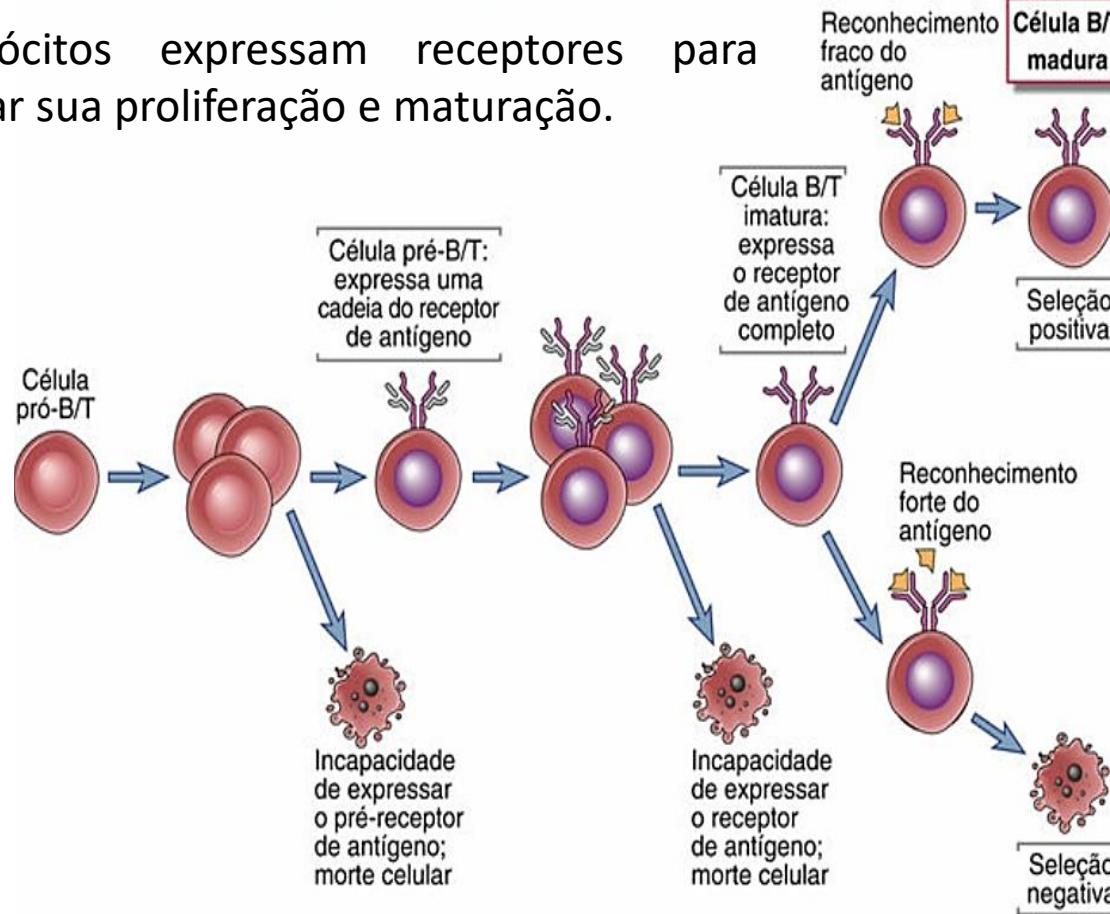
Estágio de Maturação	Célula-tronco	Pró-linfócito	Pré-linfócito	Linfócito imaturo	Linfócito maduro
Eventos Principais		Comprometimento e proliferação mediados pelo fator de crescimento; início do rearranjo do gene do receptor de antígeno	Seleção das células que expressam receptores pré-antígenos	Seleção do repertório e aquisição de competência funcional	
Local Anatômico			Órgão gerador (medula óssea ou timo)		Órgão ou tecido linfoide periférico
Dependência de Antígeno		Não		Antígeno próprio	

Desenvolvimento ou maturação de linfócitos: processo onde os progenitores dos linfócitos no timo e na medula óssea se diferenciam em linfócitos maduros localizados em tecidos linfoideos periféricos.

# Pontos de controle na maturação dos linfócitos

Proliferação	Expressão do receptor de antígeno pré-B/T	Proliferação	Expressão do receptor de antígeno	Seleção positiva e negativa
--------------	---	--------------	-----------------------------------	-----------------------------

1 Os linfócitos expressam receptores para continuar sua proliferação e maturação.



3 A seleção positiva/negativa preserva células com especificidades úteis.

2 Células que não expressam receptores funcionais ou que ligam-se fortemente ao antígeno morrem por apoptose.

# Questão

A seleção positiva e negativa dos linfócitos são processos que ocorrem no timo e que determinam quais células amadurecerão e serão liberadas para o sistema imunológico. Descreva como são selecionados esses LT?

Direcionamento:

- Expressão de pré e de receptores.
- Ligação receptor com antígeno.

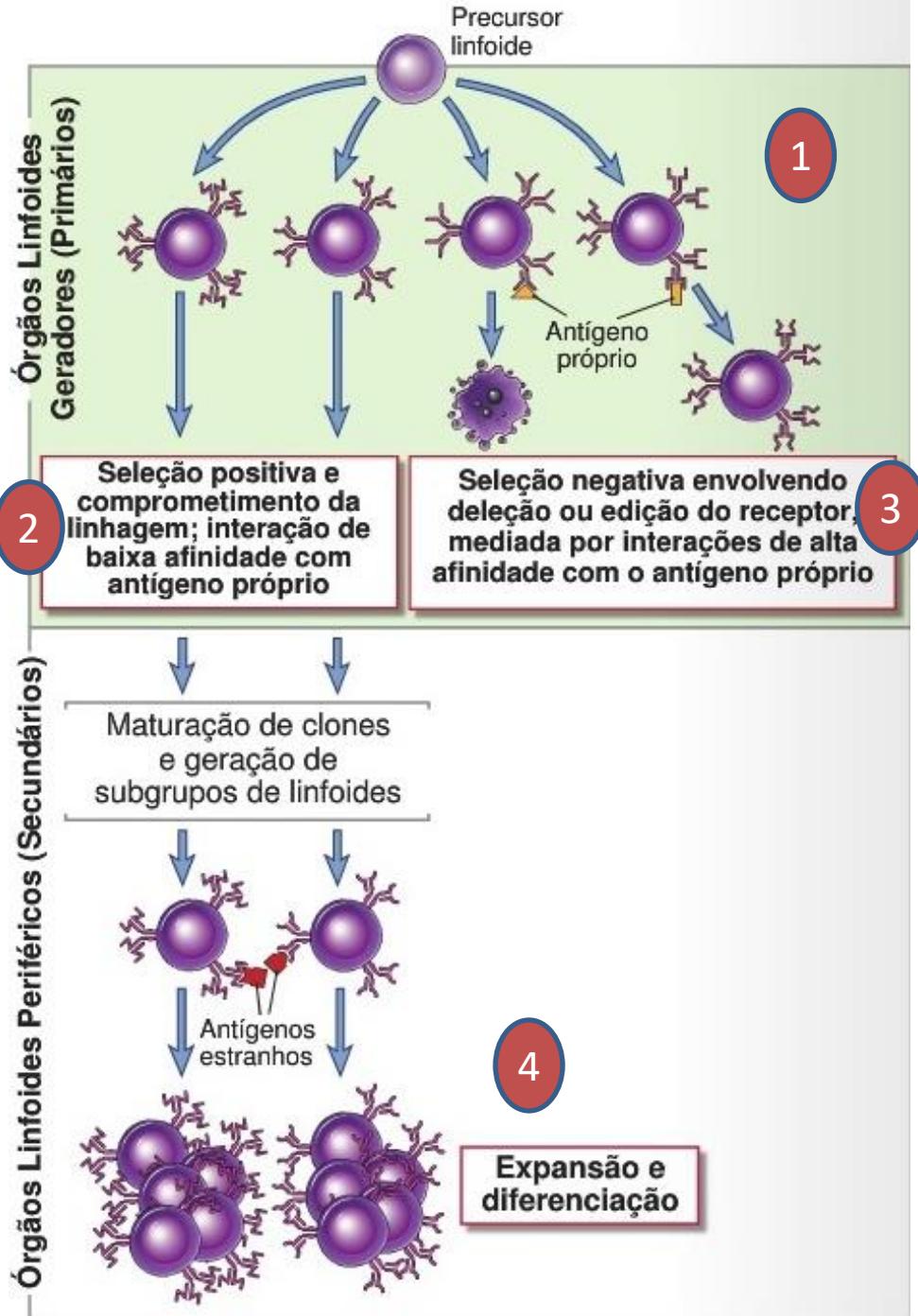
# Seleção positiva/negativa durante a maturação dos linfócitos

1) As células que expressam receptores de antígenos, sofrem seleção positiva ou negativa nos órgãos linfóides geradores.

2) **Seleção positiva:** precursores se ligam a ligante próprio com baixa afinidade (sobrevivem e continuam maturação).

3) **Seleção negativa:** Se ligam com alta afinidade aos抗ígenos (morte celular)

4) Linfócitos selecionados entram em tecidos linfóides respondendo a抗ígenos estranhos



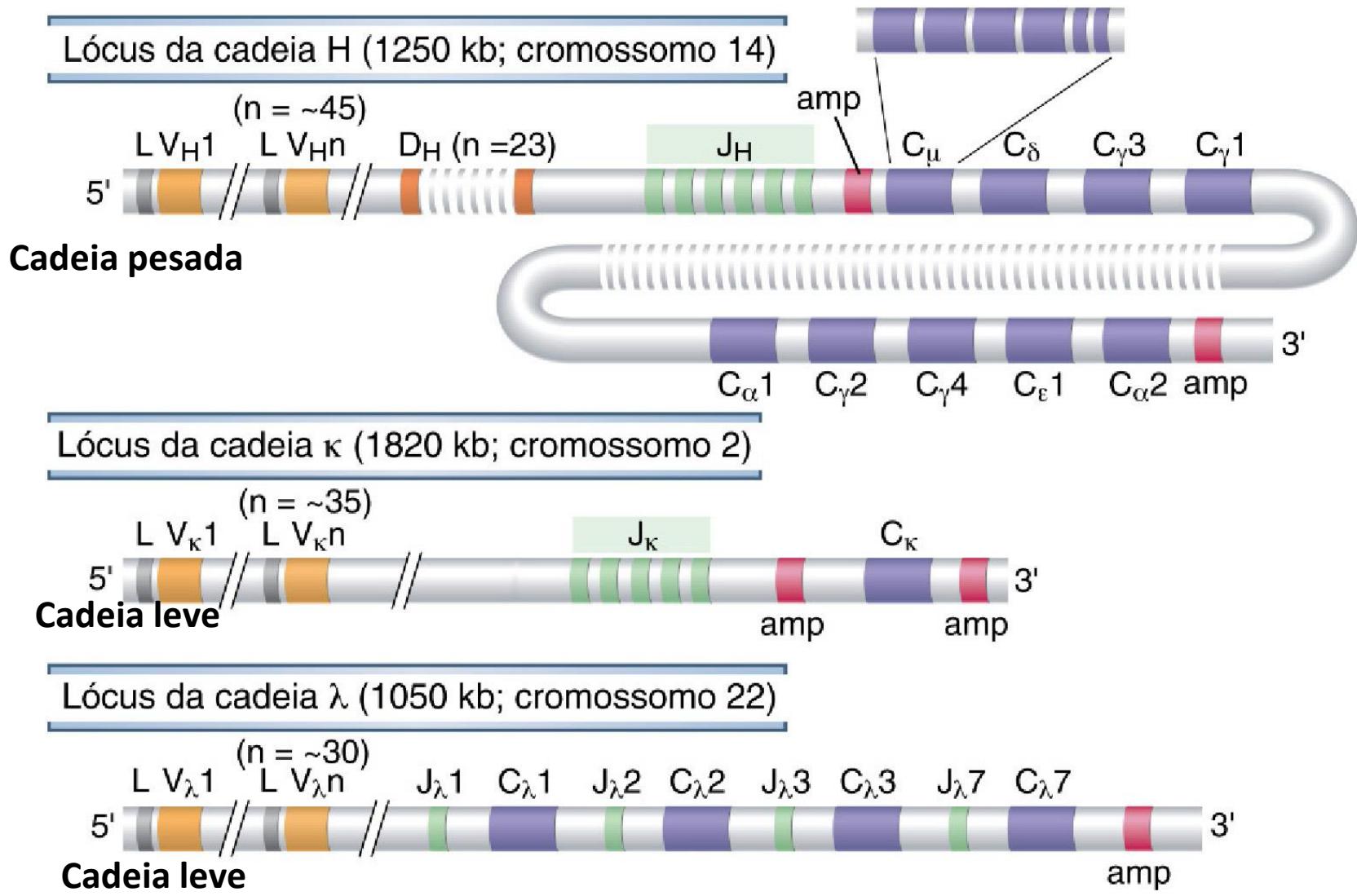
# Questão

Qual a importância da seleção desses linfócitos acontecer nessa etapa a partir do reconhecimento de antígenos próprios?

# Rearranjos Gênicos dos receptores de antígenos: Ig (Imunoglobulina) e do TCR (Receptor de Célula T)

- Genes da Ig em linfócitos B (BCR) e genes do TCR nas células T
- RECOMBINAÇÃO GÊNICA (no DNA)
- Os genes dos receptores de antígeno são gerados pelo rearranjo dos segmentos gênicos: região comum (**C**), região variável (**V**), diversidade (**D**) e junção (**J**).
- Na Ig, ocorre a formação de novos exons pelo rearranjo do gene. Acontece a fusão de um segmento gênico **V**, distante e específico, com outro segmento. Este processo especializado de rearranjo de genes em locais específicos é denominado **recombinação V(D)J**.

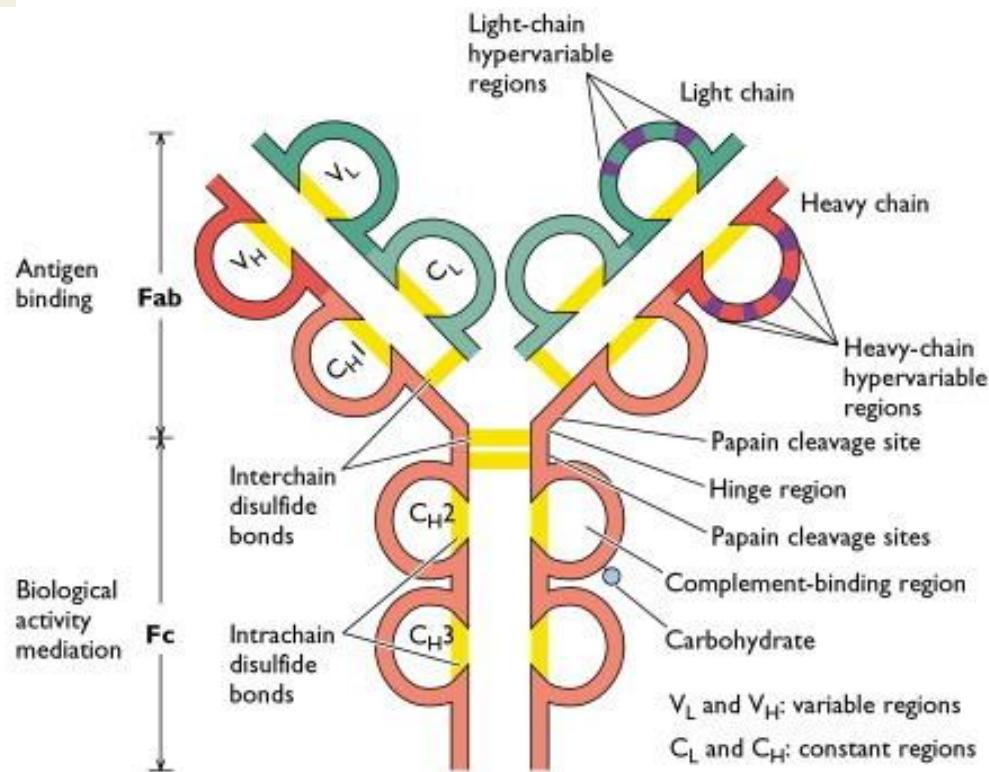
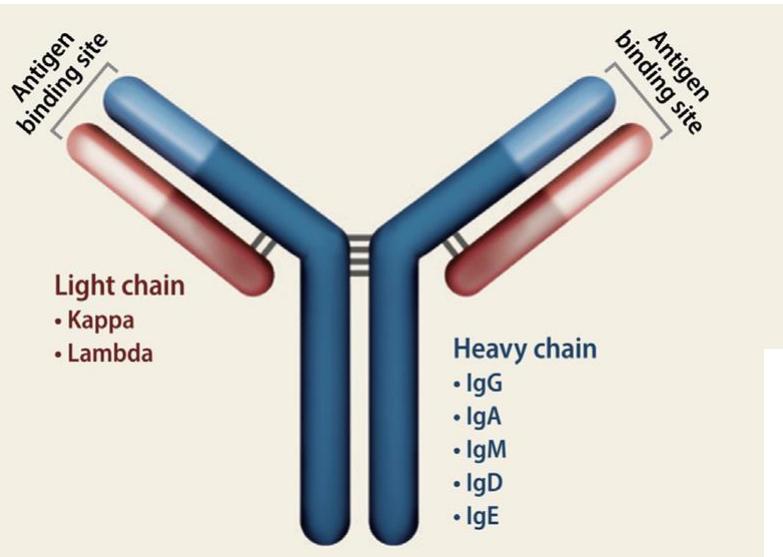
# Imunoglobulina (Ig)

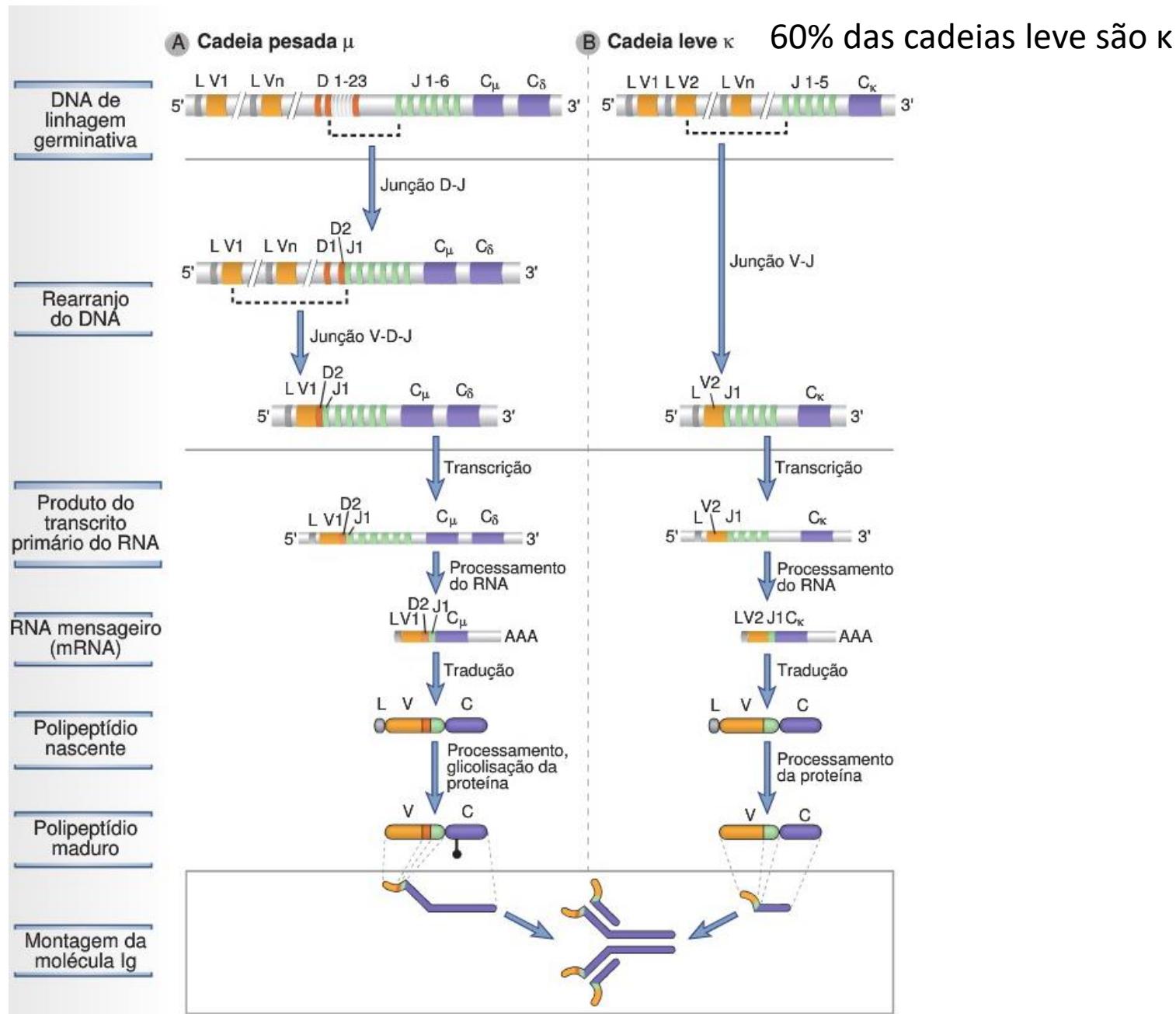


Os *loci* da cadeia pesada (H) e da cadeia leve (K) da Ig humanas

Onde Domínios: V= variável, D= diversidade, J= junção, C= constante e amp= amplificador (enhancer)

# Estrutura da imunoglobulina





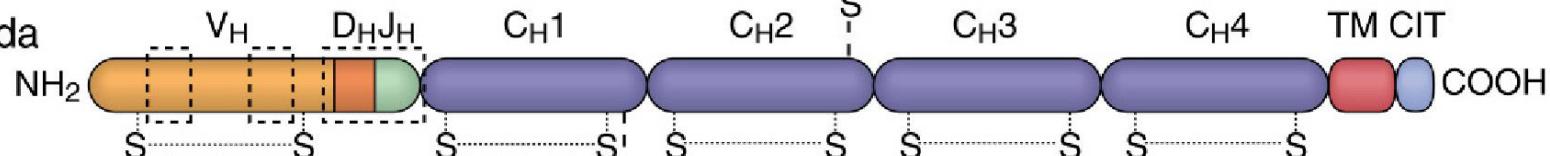
Recombinação e expressão dos genes das cadeias pesadas e leves das Ig



A

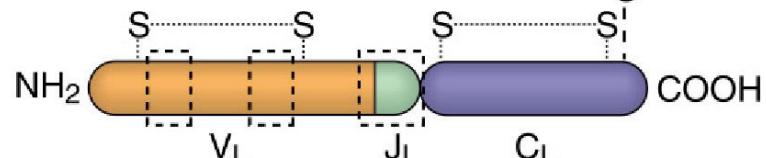
### Ig BCR

Cadeia ( $\mu$ ) pesada  
da Ig (forma  
de membrana)



Outra cadeia H

Cadeia leve  
da Ig

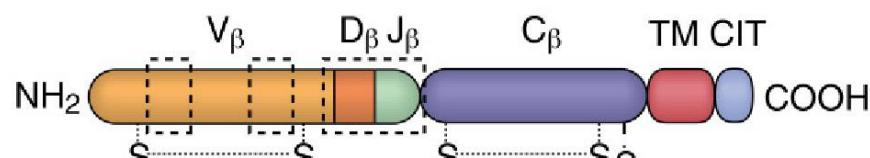


Células B

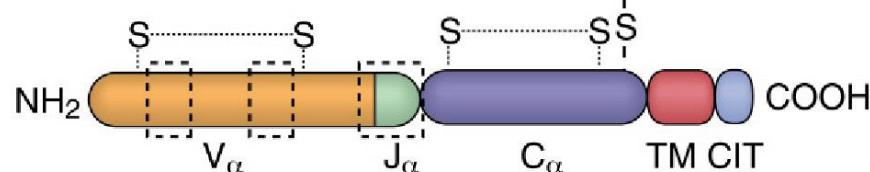
B

### TCR

Cadeia  $\beta$   
do TCR



Cadeia  $\alpha$   
do TCR



Células T

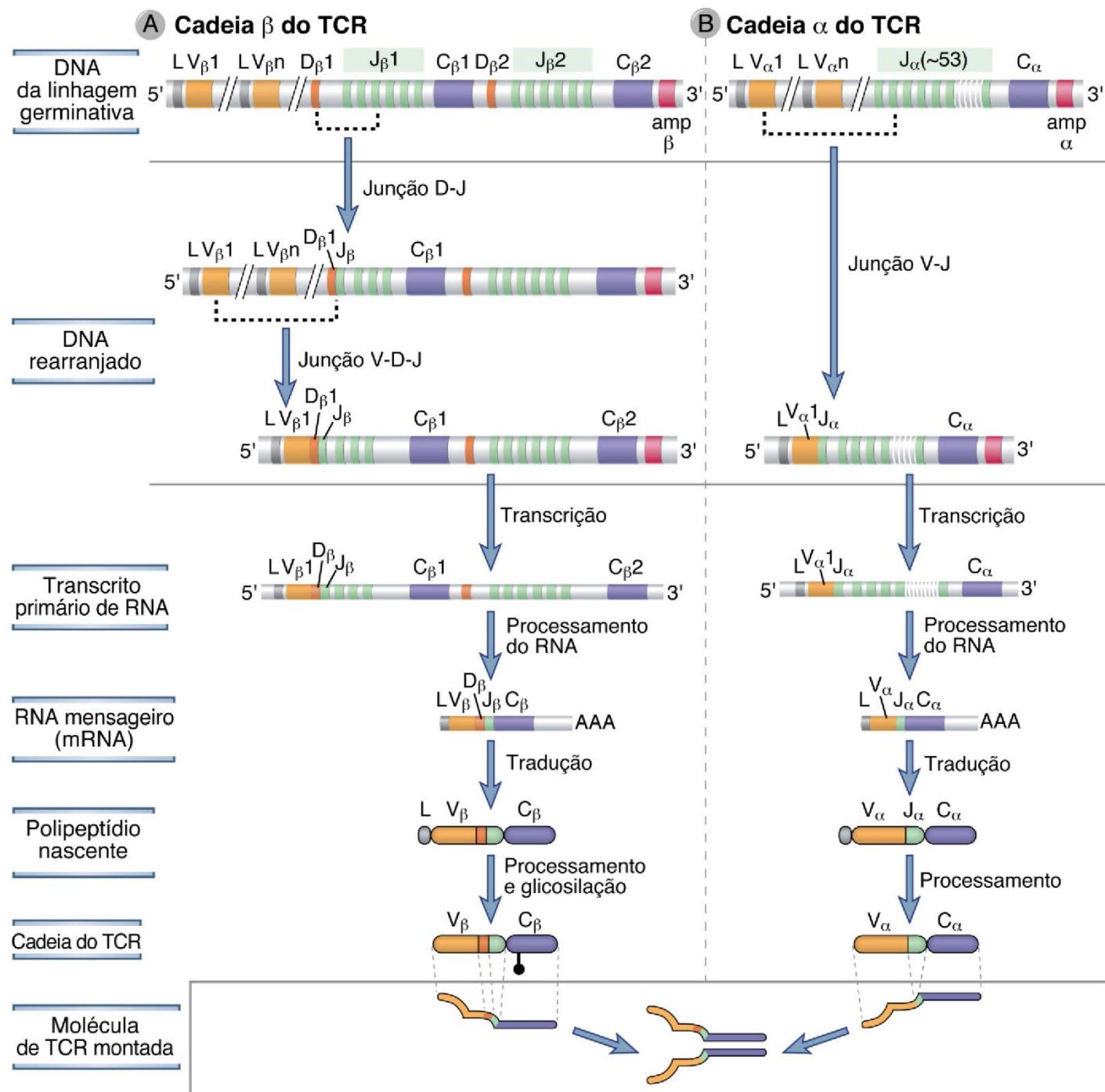
Domínios: V= variável, D= diversidade, J= junção, C= constante, TM= transmembrana  
e CIT= citoplasmático

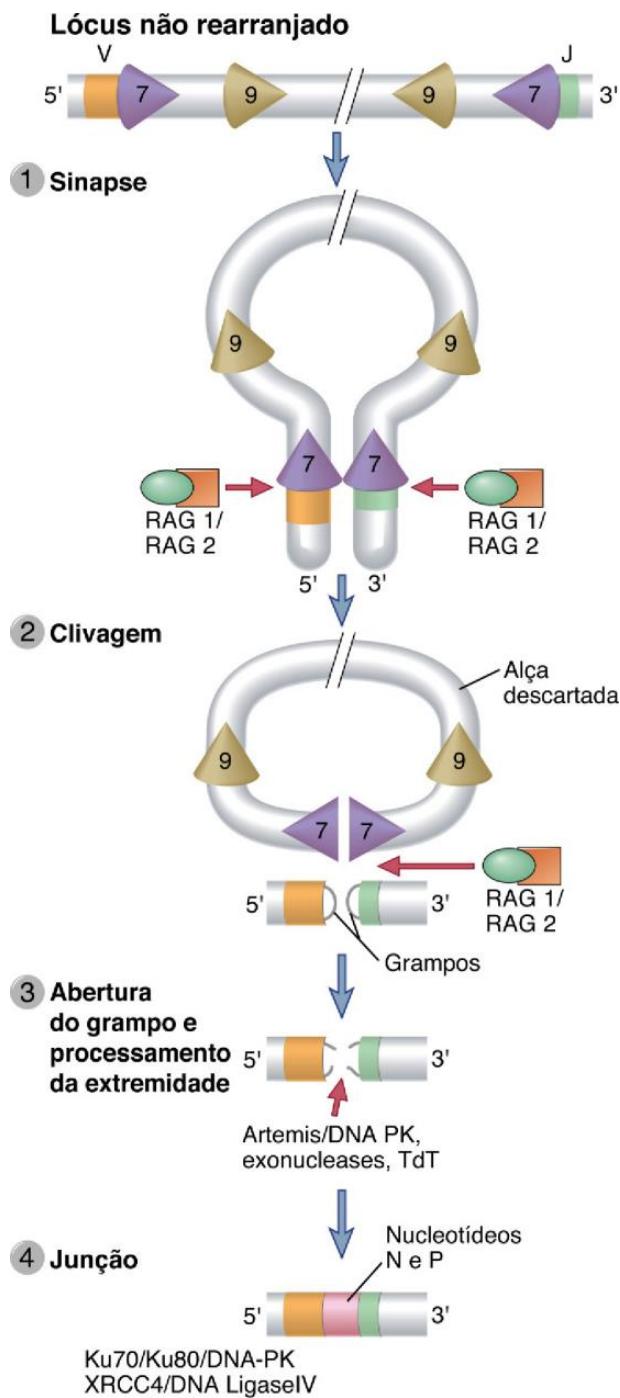
# Domínios das proteínas das Ig e do TCR

A: Os domínios das cadeias pesada e leve das Ig (Cél B)

B: Os domínios das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR (Cel T)

- Os domínio das cadeias polipeptídicas do receptor de antígeno estão indicadas.
- As regiões V e C de cada polipeptídio estão codificadas por diferentes segmentos gênicos.
- As localizações das pontes dissulfeto (S-S) intracadeias e intercadeias são aproximadas.
- As áreas nos retângulos tracejados são regiões hipervariáveis (determinadoras de complementariedade).



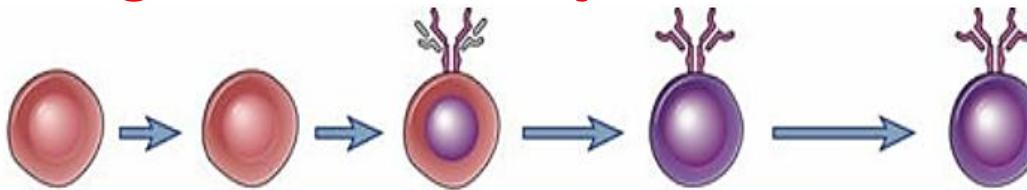


- As proteínas Rag são expressas nos estágios G0 e G1 do ciclo celular
- Os genes *RAG* são específicos de células linfoides e somente são expressos nas células B e T em desenvolvimento.
- A deficiência de Rag-1 ou Rag-2 também é uma causa rara de Síndrome Congênita Imuno Deficiência (ausência de linfócitos)
- Camundongos sem genes *Rag1* ou *Rag2* funcionais (camundongos *knockout* *Rag*) não desenvolvem linfócitos B ou T.

# Questão

Qual a importância da recombinação genética que acontece durante o desenvolvimento dos linfócitos (recombinação V(D)J)?

# Estágios de maturação da célula B



Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-B	Pré-B	B imaturo	B maduro
Proliferação	[ ]		[ ]		
Expressão de RAG		[ ]		[ ]	
Expressão de TdT		[ ]			
DNA, RNA das Ig	DNA não recombínado (da linhagem germinativa)	DNA não recombínado (da linhagem germinativa)	Gene da cadeia H recombínado (VDJ); mRNA $\mu$	Gene da cadeia H recombínado (VDJ), genes $\kappa$ ou $\lambda$ (VJ); mRNA $\mu$ , $\kappa$ ou $\lambda$ .	Processamento ( <i>splicing</i> ) alternativo do RNA VDJ-C (transcrito primário), para formar o mRNA $C_{\mu}$ e $C_{\delta}$
Expressão das Ig	Nenhuma	Nenhuma	$\mu$ citoplasmático e $\mu$ associado ao receptor pré-B	IgM de membrana (cadeia leve $\kappa$ ou $\lambda$ , $\mu$ +)	IgM e IgD de membrana
Marcadores de superfície	CD43 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup>	CD43 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup>	B220 <sup>lo</sup> CD43 <sup>+</sup>	IgM <sup>lo</sup> CD43 <sup>-</sup>	IgM <sup>hi</sup>
Local anatômico	Medula óssea			Periferia	
Resposta ao antígeno	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Seleção negativa (deleção), edição do receptor	Ativação (proliferação e diferenciação)

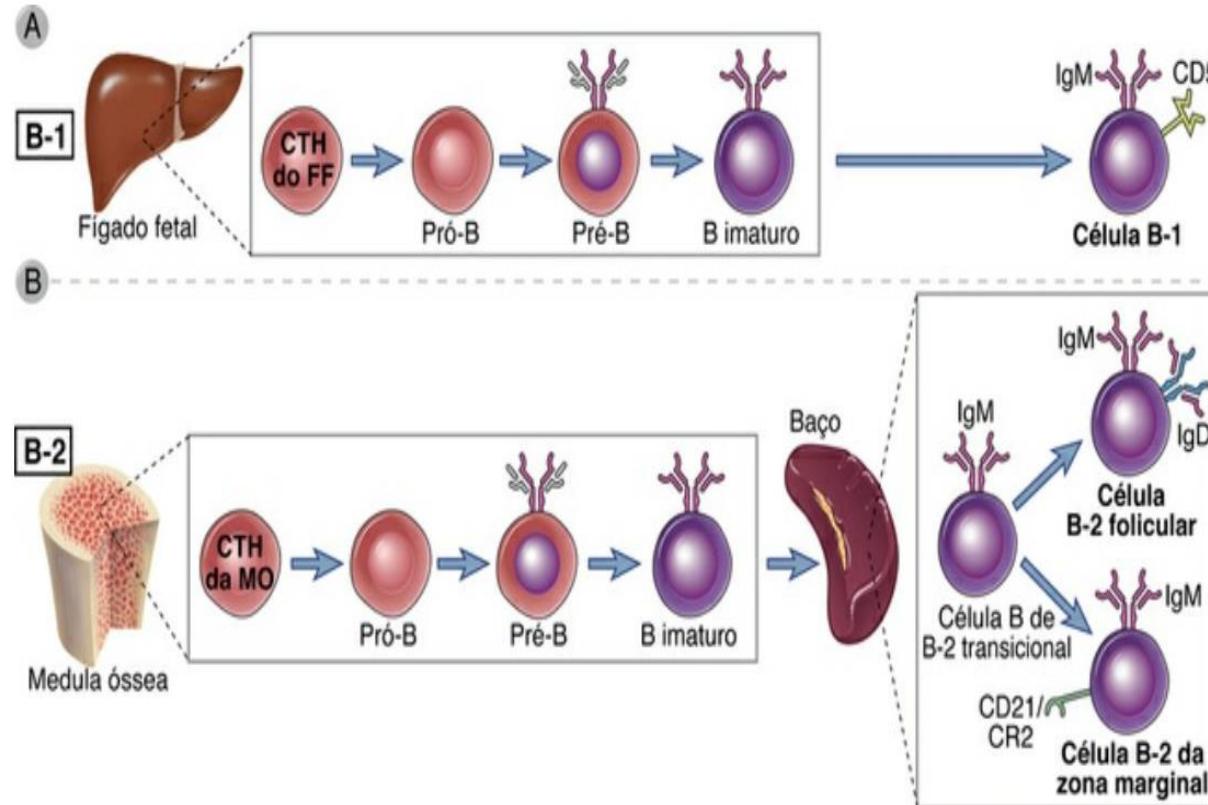
RAG: gene ativador da recombinação 1 e 2 (*RAG1* e *RAG2*)

(TdT): enzima desoxinucleotidil transferase terminal (adiciona novos nucleotídeos)

# DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS B

B1 - Células B das células tronco do fígado fetal produzem a linhagem B-1 - IgM.

B2 - Células B da medula óssea (pós nascimento) originam à linhagem B-2.



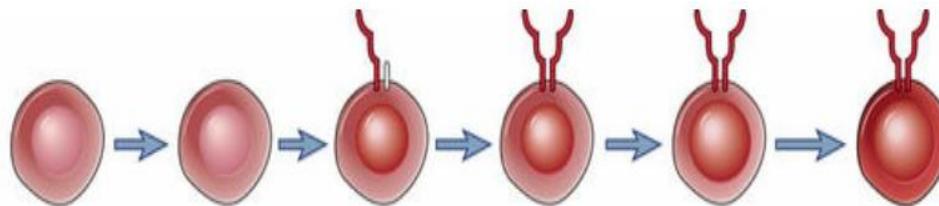
Os LB amadurecem em LB foliculares no baço (expressam IgM e IgD na superfície) e adquirem a capacidade de recircular e ocupar todos os órgãos linfoides periféricos.

Antes do nascimento, os LB se desenvolvem a partir de precursores comprometidos no fígado fetal, e após o nascimento, as células B são geradas na medula óssea.

# DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS B

- As células B-1 contribuem para a produção rápida de anticorpos contra micro-organismos em tecidos particulares, tais como o peritônio.
- As células B foliculares são linfócitos recirculantes.
- As células B da zona marginal são abundantes no baço e também podem ser encontradas nos linfonodos em humanos.

# DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS T



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

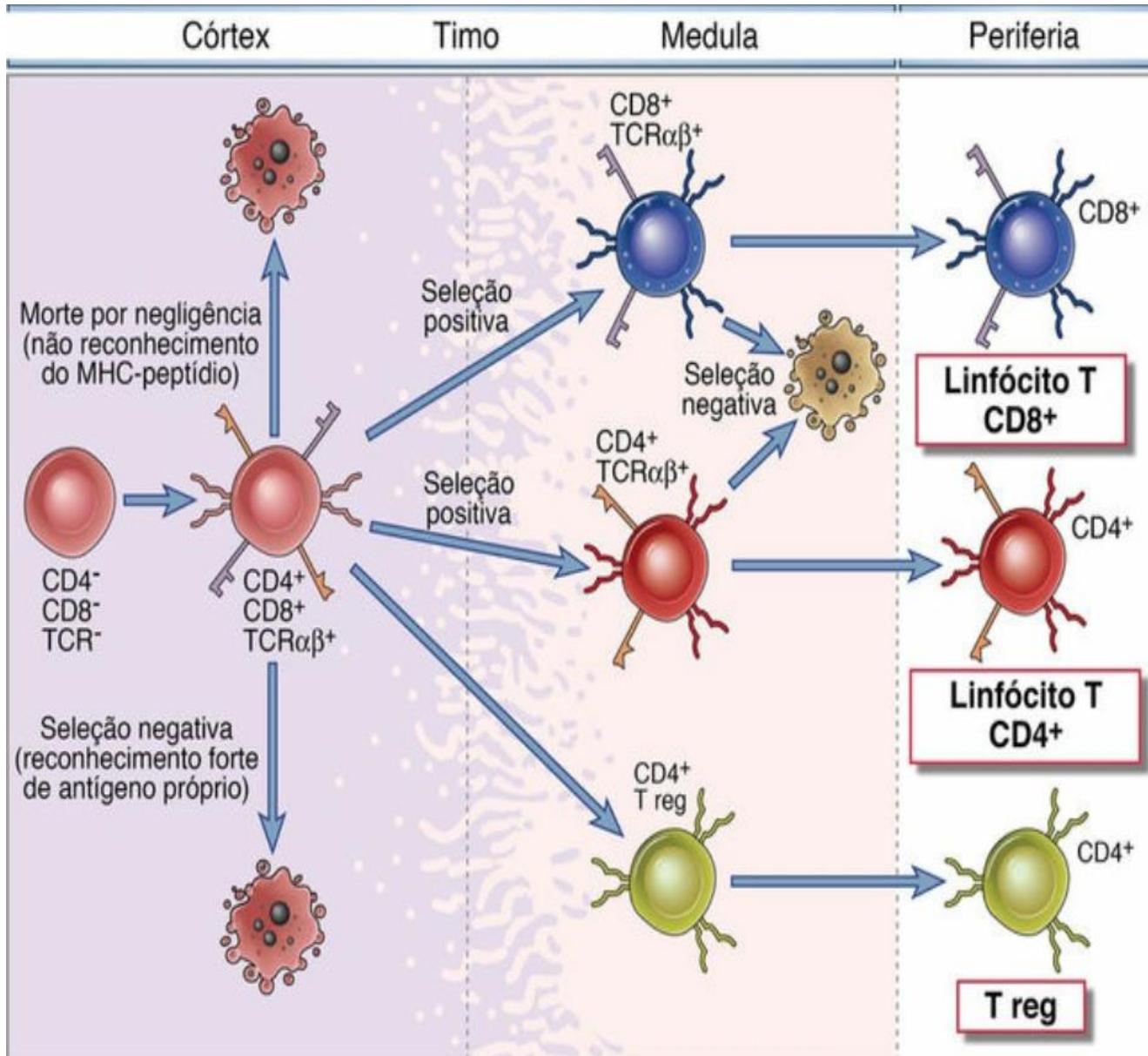
Maturação da célula-tronco da medula óssea até o linfócito T maduro.

Marcadores de superfície são produzidos para definir diferentes estágios de maturação.

# **Estágios da maturação da célula T**

- Os eventos correspondentes a cada estágio da maturação da célula T a partir da célula-tronco da medula óssea até o linfócito T maduro.
- **1º) Envolve o rearranjo sequencial e a expressão de genes do TCR.**
- **2º) Proliferação celular.**
- **3º) Seleção induzida por antígeno.**
- **4º) Comprometimento com subgrupos fenotipicamente e funcionalmente distintos.**

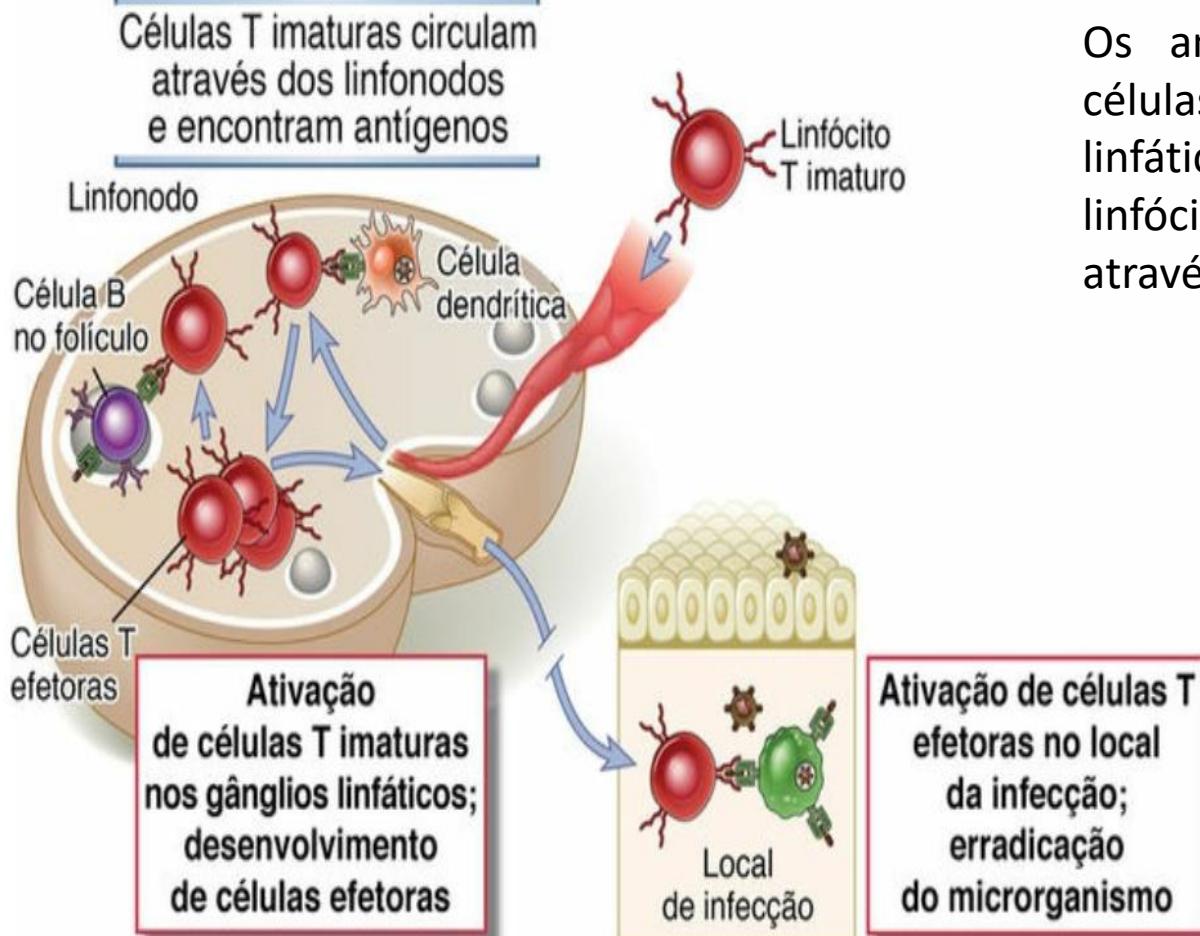
# Maturação das células T no timo



# Maturação das células T no timo

- Os precursores das células T viajam da medula óssea até o timo através da corrente sanguínea.
- No córtex do timo, os progenitores das células T  $\alpha\beta$  expressam TCRs e os correceptores CD4 e CD8.
- Os processos de seleção eliminam as células T autorreativas no córtex. Eles promovem a sobrevivência dos timócitos cujos TCRs se ligam a moléculas de MHC com baixa afinidade.
- A diferenciação funcional e fenotípica para células T CD4+CD8- ou CD8+CD4- ocorre na medula, e as células T maduras são liberadas na circulação.

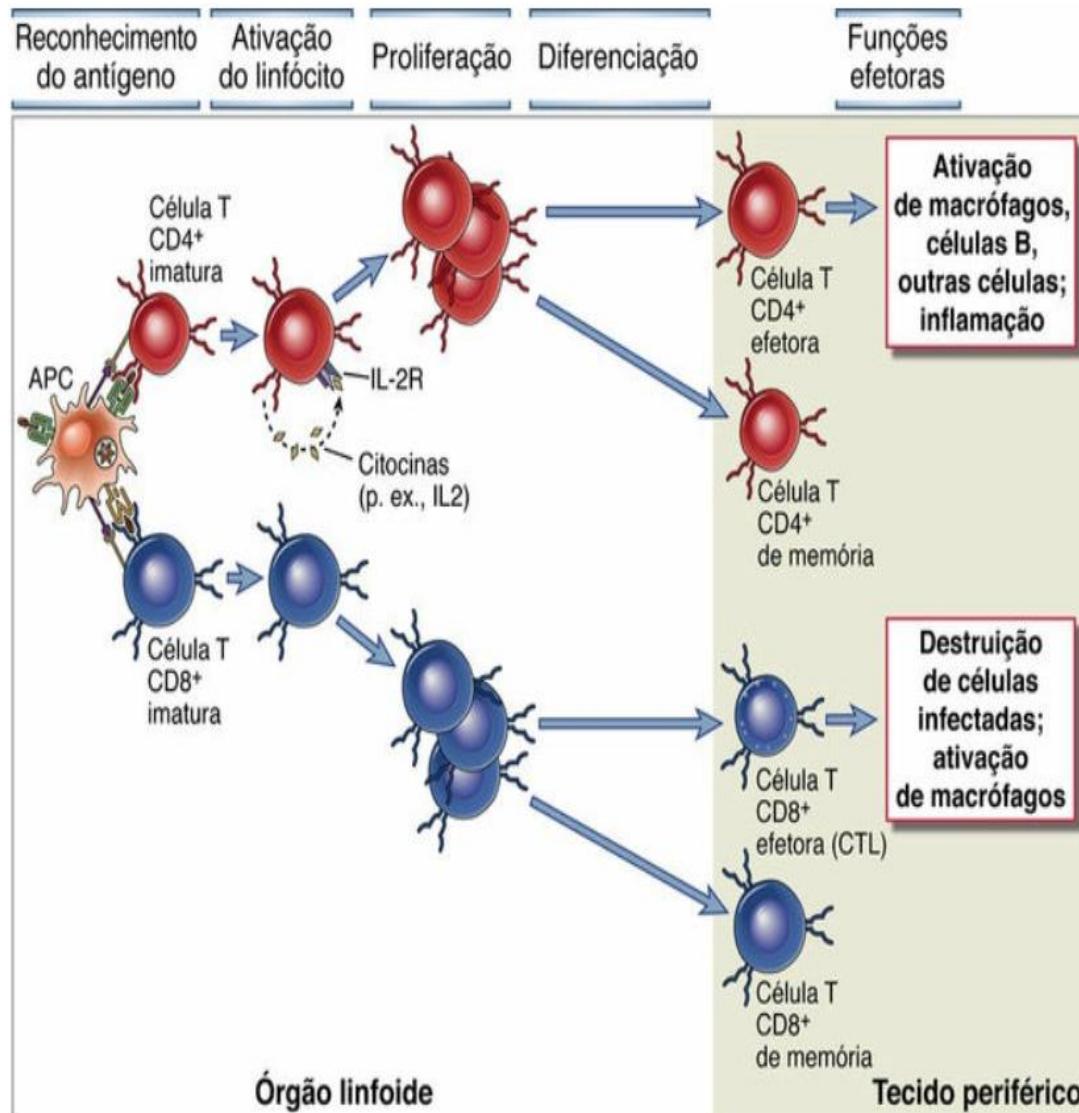
# ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T IMATURAS E EFETORAS PELO ANTÍGENO



Os抗原os transportados pelas células dendríticas para os gânglios linfáticos são reconhecidos pelos linfócitos T imaturos que recirculam através destes gânglios linfáticos.

As células T são ativadas em células efetoras, que podem permanecer nos órgãos linfoide para auxiliar os linfócitos B ou migrar para os locais de infecção.

# ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T IMATURAS E EFETORAS PELO ANTÍGENO

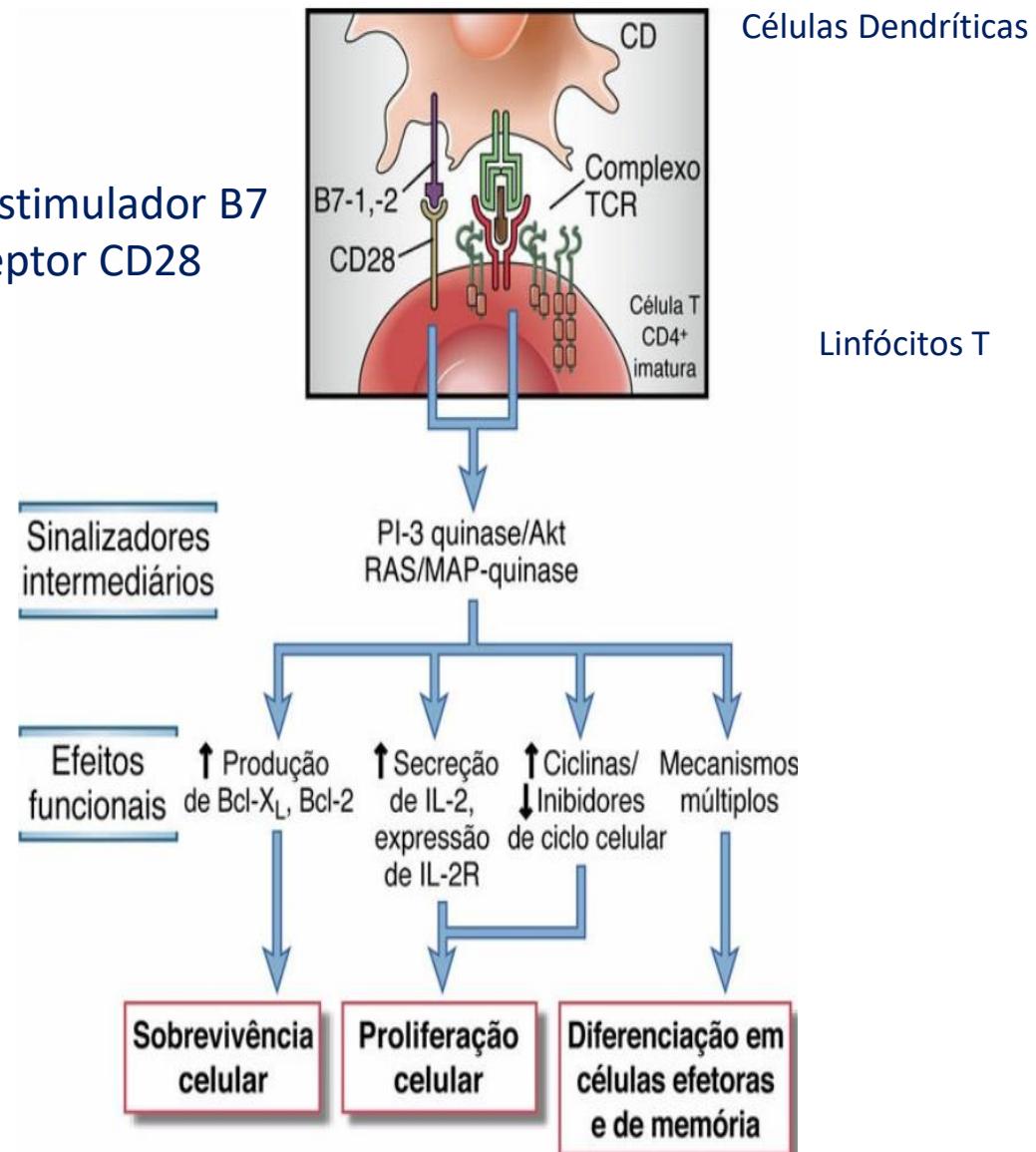


1º) O reconhecimento do antígeno pelos LT induz a secreção de citocinas (IL-2) por células T CD4+, expansão clonal (proliferação celular e diferenciação de células T) em células efetoras e de memória.

2º) As CTLs CD8+ respondem destruindo outras células.

# COESTIMULAÇÃO LINFÓCITOS T

Coestimulador B7  
Receptor CD28



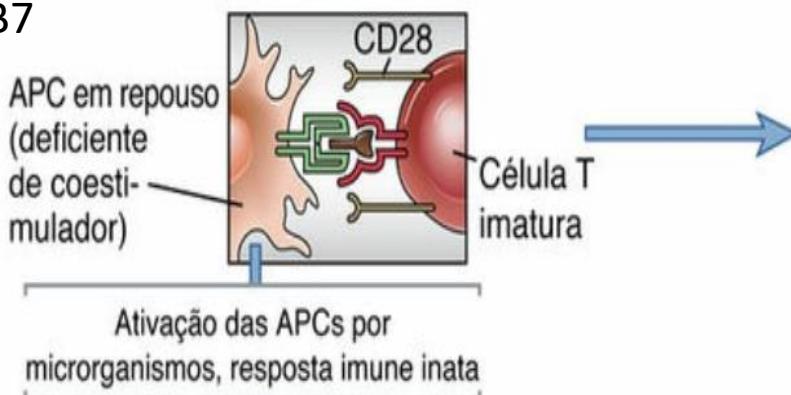
O acoplamento de CD28 induz vias de sinalização que aumentam os sinais de TCR para estimular a expressão de proteínas de sobrevivência, citocinas e receptores de citocinas; para promover a proliferação celular; e para induzir a diferenciação em células efetoras e de memória

# COESTIMULAÇÃO LINFÓCITOS T

A

## Reconhecimento do antígeno

Sem B7

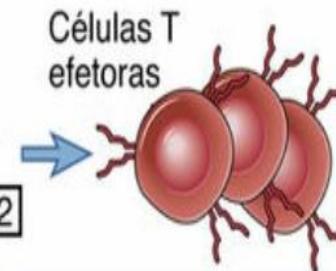
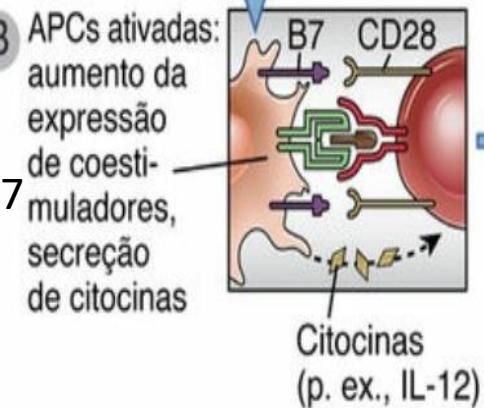


## Resposta da célula T

A: As APCs em repouso (CD) expressam poucos ou não expressam coestimuladores B7, não ativando LT imaturos.

B

Com B7



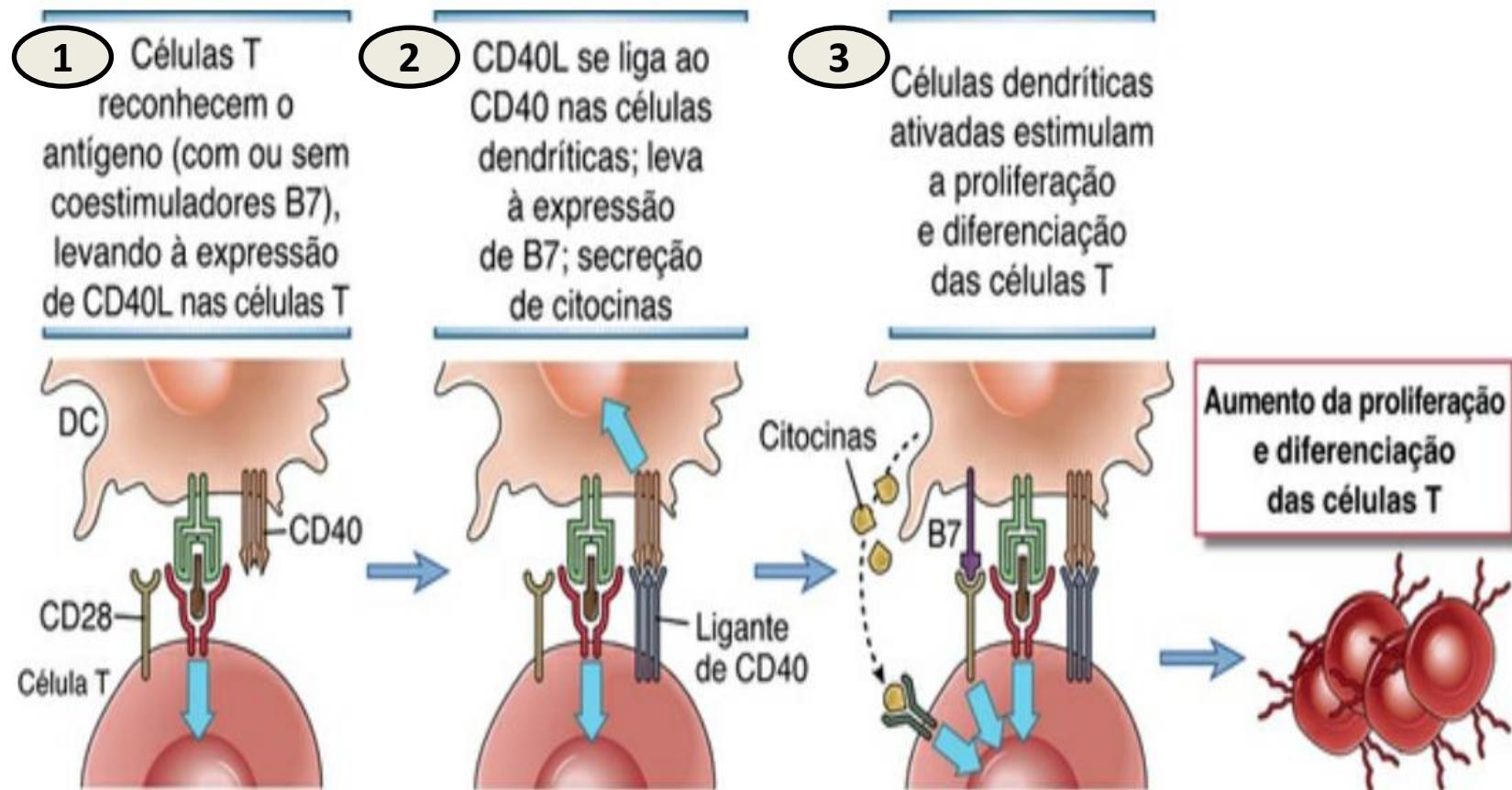
Células T efetoras

IL-2

Sobrevivência da célula T, proliferação e diferenciação

B: Micro-organismos e citocinas da resposta imune inata ativam as APCs a expressarem coestimuladores B7. As APCs ativadas produzem citocinas (IL-12), que estimula a diferenciação de LT imaturas em células efetoras.

# COESTIMULAÇÃO LINFÓCITOS T



# Papel do CD40 na ativação de células T

- As células T imaturas são ativadas por complexos MHC-peptídios nas APCs
- O reconhecimento do antígeno pelas células T em conjunto com alguma coestimulação induz a expressão do ligante de CD40 (CD40L) em células T ativadas. O CD40L acopla o CD40 nas APCs e pode estimular a expressão de várias moléculas B7 e a secreção de citocinas que ativam as células T. Assim, o CD40L nas células T torna as APCs melhores em promover e ampliar a ativação das células T.

# Questão

Explique a importância das interações entre CD e LT.

- TCR e MHC
- LCD40 e CD40
- CD 28 e B7

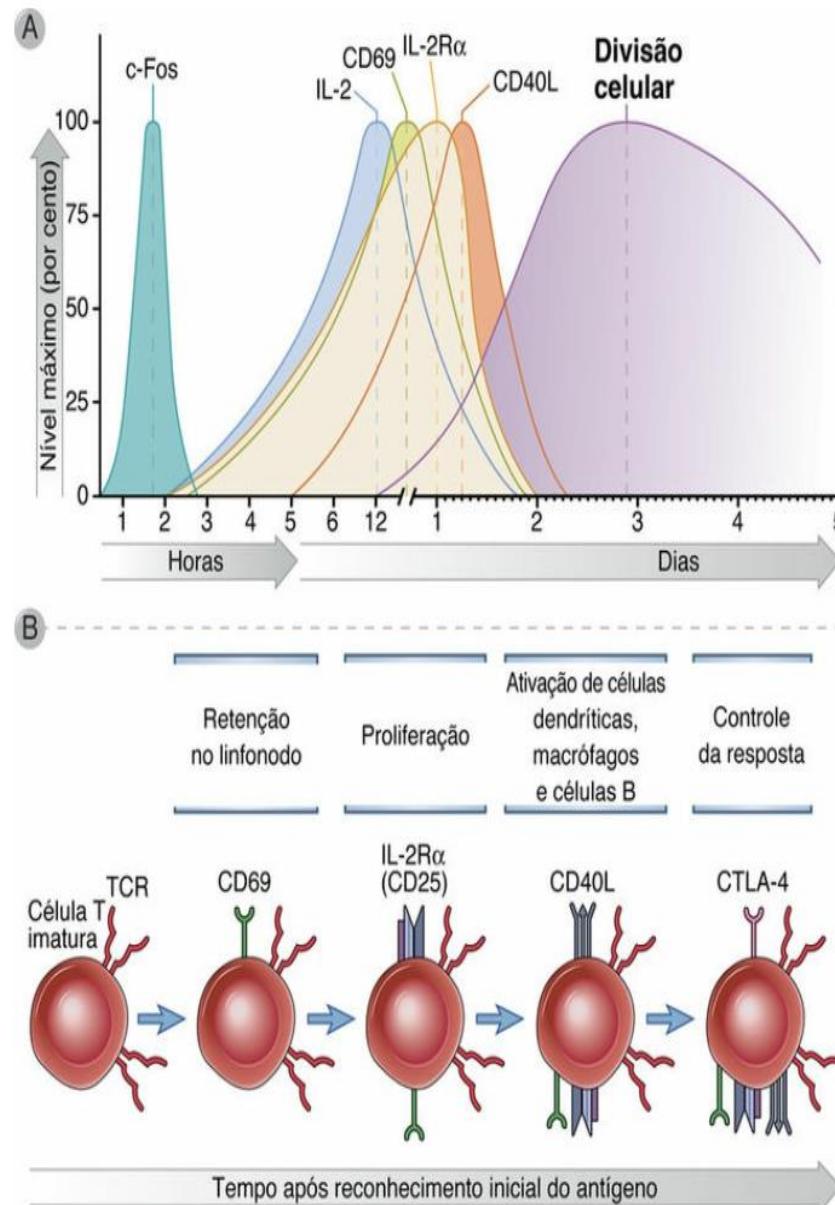
# Moléculas de Superfície e Ativação da Célula T

**CD69:** reduz a expressão do receptor S1PR1, que medeia a saída das células T de órgãos linfoideos.

**CD25 (IL-2R $\alpha$ ):** receptor de citocina permite que células T ativadas respondam à citocina promotora de crescimento IL-2.

**Ligante do CD40 (CD40L):** Nos LT ativa células dendríticas a se tornarem melhores APCs.

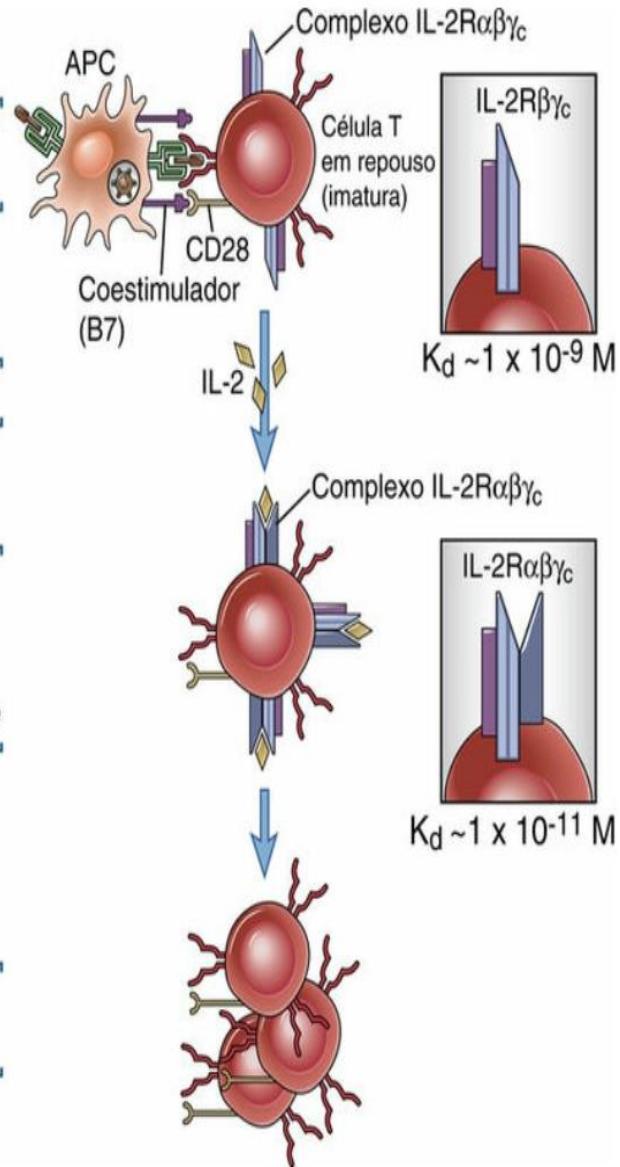
**CTLA-4:** inibidor da ativação da célula T. É induzido 1 a 2 dias depois da ativação inicial.



# CITOCINAS NAS RESPOSTAS IMUNES ADAPTATIVAS

## (Produção do receptor da IL-2)

Ativação das células T por antígeno + coestimulador



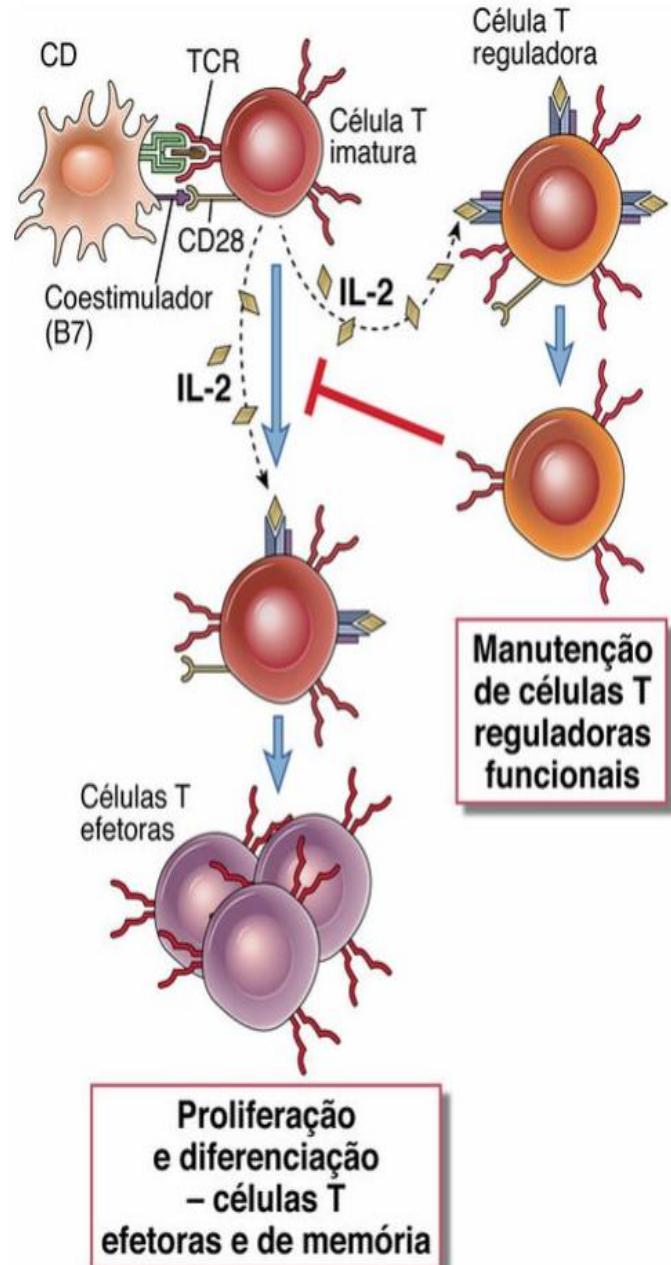
1º) Expressão do receptor de IL-2. Os LT em repouso (imáturos) expressam o complexo IL-2R $\beta\gamma_c$ , que tem uma afinidade moderada para IL-2.

2º) A ativação das células T por antígeno, coestimuladores e pela própria IL-2 leva à expressão de altos níveis do complexo IL-2R $\alpha\beta\delta_c$  de alta afinidade.

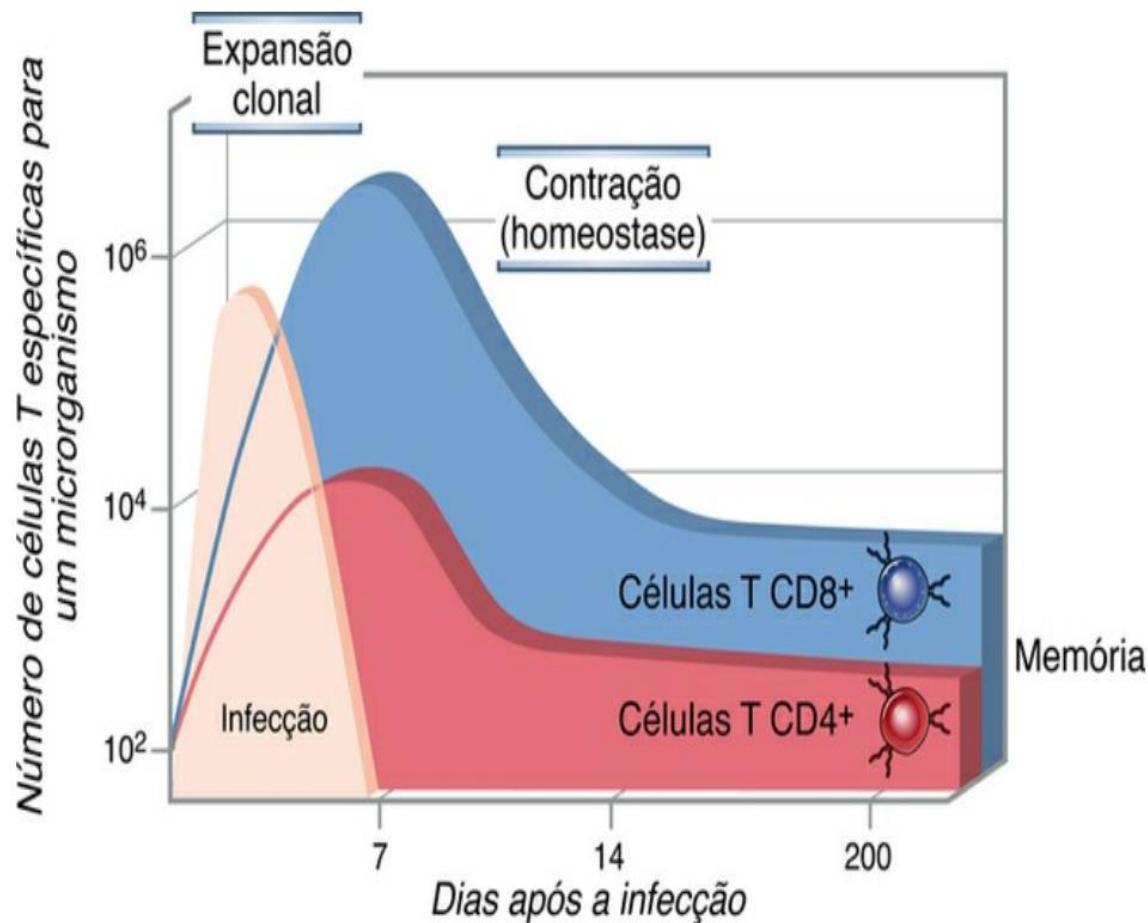
# CITOCINAS NAS RESPOSTAS IMUNES ADAPTATIVAS

**Papel biológico da IL-2:** Estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de linfócitos T, atuando como um fator de crescimento autócrino.

A IL-2 também mantém as células T reguladoras funcionais e, assim, controla as respostas imunes



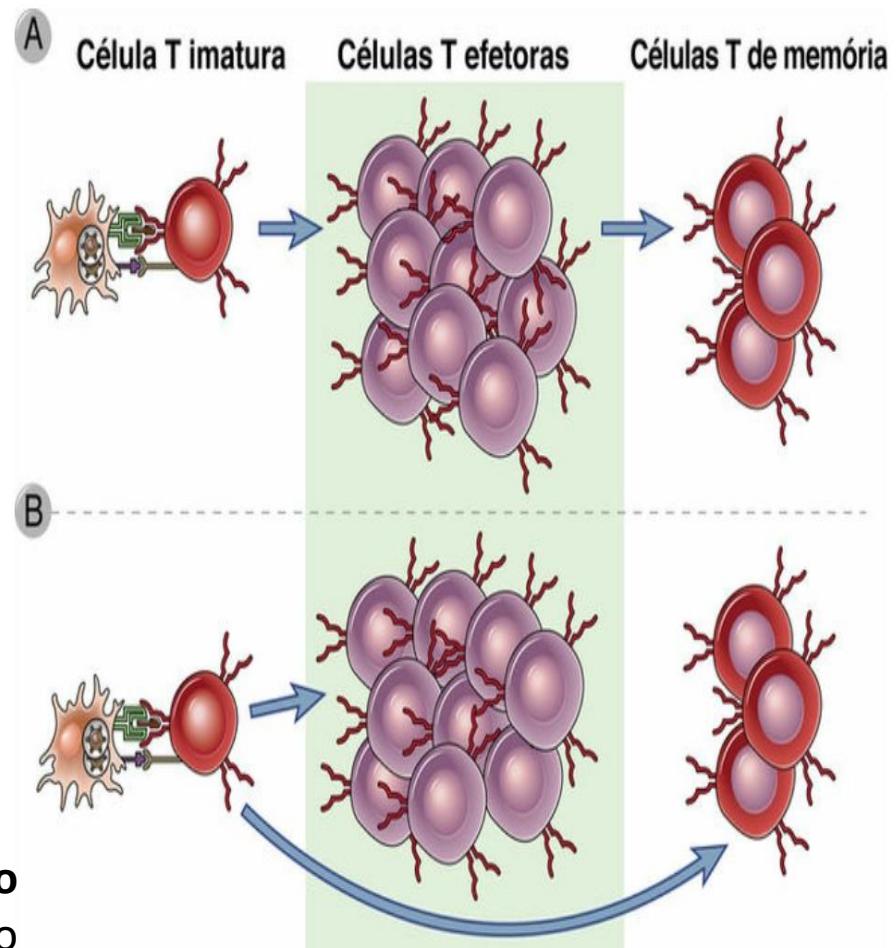
# EXPANSÃO CLONAL DAS CÉLULAS T



Os números de células T CD4+ e CD8+ específicas para抗原os microbianos e a expansão e declínio das células durante as respostas imunes.

# MODELO DE EXPANSÃO CLONAL DAS CÉLULAS T

**A: Modelo linear de diferenciação de células T de memória,** a maioria das células efetoras morre e algumas sobreviventes evoluem para a população de memória.



**B: Com base no modelo de diferenciação ramificada,** células efetoras e de memória são os destinos alternativos de células T ativadas