

Ontogenia do sistema imune e imunoglobulinas e suas funções, resposta imune humoral

ONTOGENIA DO SISTEMA IMUNE

As células sangüíneas, continuamente produzidas na medula óssea de indivíduos adultos, são derivadas de células-tronco hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*). As HSCs, geradas durante o desenvolvimento embrionário, seqüencialmente colonizam o fígado fetal, o baço e, por último, a medula óssea. Por definição, as HSCs são células não diferenciadas capazes de se dividir indefinidamente, dando origem a células-filha que podem seguir dois caminhos distintos: manter-se como célula-tronco em um processo de auto-renovação ou diferenciar-se nas múltiplas linhagens hematopoiéticas.

Durante o processo de diferenciação vários tipos celulares intermediários são formados, definidos pela expressão de diferentes antígenos de superfície. Tradicionalmente, os pesquisadores assumem que a primeira etapa do desenvolvimento hematopoiético consiste na diferenciação das HSCs em precursores *mielóides* e *linfóides*. Os precursores mielóides se diferenciam em eritrócitos, megacariócitos e na linhagem granulocítica/monocítica (GM), enquanto os precursores linfóides dão origem aos linfócitos T, B e células NK.

No entanto, este modelo dicotomizado tem sido cada vez mais questionado, principalmente devido à complexa diferenciação das células dendríticas (DC), que possuem precursores linfóides, mielóides e mistos linfóide/mielóide. Além disso, recentemente foi isolado um precursor com potencial de se diferenciar em células tanto das linhagens GM como linfóide, mas incapaz de se diferenciar em eritrócitos e megacariócitos, sugerindo a existência de um terceiro precursor.

Embora ainda controverso, atualmente o modelo mais aceito para a maturação de células hematopoiéticas humanas é o seguinte: as HSCs (CD34⁺) se diferenciam na medula em precursores linfóides (CD34⁺CD45RA⁺CD7⁺CD10⁺; CLP: *common lymphoid precursor*), precursores mielóides (CD34⁺CD45RA⁺; CMP: *common myeloid precursor*) e em progenitores megacariócito/eritrócito (MEP: *megakaryocyte/erythrocyte progenitor*). Os linfócitos T, B, células NK e DCs se diferenciam a partir dos CLPs, enquanto os CMPs dão origem aos monócitos, granulócitos e também a alguns subtipos de DCs.

Cristina Caldas Ramos

Graduação em Ciências Biológicas (Universidade de Brasília). Mestrado em Biologia Molecular (Universidade de Brasília). Doutorado em Imunologia pela USP. Atua principalmente nos seguintes temas: imunologia dos transplantes e humanização dos anticorpos.

Com relação ao desenvolvimento de linfócitos T, precursores linfóides saem da medula óssea, entram no timo e passam por etapas de maturação que envolvem principalmente a perda do marcador CD34 e a expressão dos marcadores CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8 e receptor de IL-7. Além disso, ocorre também o rearranjo do receptor de célula T. A citocina IL-7 é fundamental para a sobrevivência e proliferação dos precursores linfóides. Vale ressaltar que pacientes com mutações genéticas em uma das cadeias do receptor de IL-7 apresentam uma imunodeficiência severa combinada caracterizada pela drástica redução de linfócitos T. Os fatores de transcrição Notch1, GATA3 e HEB regulam o desenvolvimento de linfócitos T no timo.

É importante destacar que o equilíbrio entre fatores de transcrição regula a diversificação das linhagens hematopoiéticas. Partindo do CLP, a expressão de Notch1 leva a diferenciação de linfócitos T e células NK; proteína E e Spi-B direcionam o desenvolvimento para DC plasmocitóides e os fatores de transcrição E2A, EBF e Pax-5 determinam a diferenciação de CLP em linfócitos B.

Diferentemente dos linfócitos T, o desenvolvimento dos linfócitos B ocorre na medula óssea. Os principais precursores intermediários são: célula Pró-B (CD34⁺CD19⁺CD20⁻Ig⁻); Pré-B (CD34⁻CD19⁺CD20⁺Ig⁻); célula B imatura (CD34⁻CD19⁺CD20⁺IgM⁺) e célula B madura (CD34⁻CD19⁺CD20⁺IgM⁺IgD⁺). Atualmente, acredita-se que dentro da medula óssea existem nichos especializados localizados próximos aos osteoblastos, células endoteliais e células reticulares, onde ocorre a expressão diferencial de quimiocinas, receptores de quimiocinas e citocinas, principalmente a IL-7. Os precursores intermediários “caminham” entre um nicho e outro ao longo do processo de desenvolvimento dos linfócitos B. Além disso, existem nichos de sobrevivência na medula óssea para manutenção de linfócitos B de memória.

Durante o processo de maturação ocorre o rearranjo de genes de imunoglobulinas (Ig) que resulta na expres-

são de imunoglobulina na superfície do linfócito B. Esta etapa de maturação é independente de antígeno e gera um repertório altamente diversificado de linfócitos B maduros. Estes linfócitos B maduros saem da medula óssea e vão para órgãos linfóides secundários onde encontram os antígenos se ativam e se diferenciam em células de memória e em plasmócitos, células que secretam grandes quantidades de imunoglobulinas. Além da diversidade do repertório criada pelo processo de rearranjo gênico descrito acima, diversidade adicional pode ser criada por hipermutação somática dos anticorpos nos órgãos linfóides, levando à maturação por afinidade e também por troca da cadeia variável leve através de um mecanismo chamado editoração de receptores.

IMUNOGLOBULINAS E SUAS FUNÇÕES

As imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B são glicoproteínas encontradas em todos os vertebrados superiores. Em humanos, cinco diferentes classes de Ig foram identificadas: IgG (subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA (subclasses IgA1 e IgA2), IgE e IgD (Tabela 1). Apesar de compartilharem estruturas similares, compostas de domínios de imunoglobulina (*Ig domain*), as cinco classes de Ig variam tanto na localização quanto no número de sítios de glicosilação. As Ig IgM, IgD e IgE são mais fortemente glicosiladas, sendo que os carboidratos correspondem a 12%-14% do peso destas moléculas. Várias são as funções desta glicosilação: ligação a lectinas do soro, como MBL, *mannose binding lectin*; manutenção da solubilidade e da conformação; facilitação do transporte subcelular, secreção e *clearance*; manutenção das funções efetoras, garantindo a ligação da porção Fc aos receptores de Fc. Vale ressaltar que padrões aberrantes de glicosilação das Ig foram descritos em diferentes doenças, como a artrite reumatóide (RA) e nefropatia por IgA.

O tipo principal de imunoglobulina encontrada no soro humano normal pertence à classe G, IgG. Vale ressaltar que a maioria dos anticorpos com potencial terapêutico é da classe G. As IgGs possuem uma estrutura tetramérica, consistindo de duas cadeias pesadas idênticas, glicosiladas, de 55 kDa, e duas cadeias leves idênticas, normalmente não glicosiladas, de 25kDa, ligadas covalentemente por ligações dissulfeto. Cada cadeia da molécula de anticorpo é dividida em domínios de cerca de 110 resíduos de aminoácidos. A cadeia leve possui dois destes domínios, enquanto a pesada possui quatro domínios.

A comparação da seqüência polipeptídica de várias moléculas de IgG revelou que os domínios N-terminal de cada cadeia são mais variáveis em seqüência do que os outros domínios. Os domínios N-terminal são chamados domínios variáveis, enquanto os outros são denominados domínios constantes. A cadeia leve é constituída de um domínio N-terminal variável (V_L) e um domínio constante (C_L), e a cadeia pesada de um domínio N-terminal variável (V_H), seguido de três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}).

Quando uma molécula de IgG é submetida a proteólise, a cadeia pesada é clivada na região espaçadora liberando o fragmento Fab (fragmento de ligação ao antígeno) e o fragmento Fc (fragmento cristalizável). O fragmento de anticorpo contendo a V_L associada à V_H é denominado Fv (fragmento variável), e pode ser obtido da digestão do Fab com pepsina. Os fragmentos Fab e Fv carregam a atividade de ligação ao antígeno, enquanto o fragmento Fc contribui para as funções efetoras como ligação ao receptor Fc, meia-vida no soro e fixação do complemento.

Os domínios V_H e V_L não são uniformemente variáveis em toda sua extensão. Existem três pequenas regiões que apresentam uma variabilidade muito maior do que o resto da cadeia. Estas são as chamadas regiões hipervariáveis ou Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs). Os CDRs variam em tamanho e em seqüência

Tabela 1 - Propriedades e atividades biológicas de imunoglobulinas humanas

Propriedade/atividade	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgM	IgE	IgD
Cadeia pesada	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	μ	ϵ	δ
Nível sérico normal (mg/mL)	9	3	1	0.5	3	0.5	1.5	0.0003	0.03
Meia-vida no soro (dias)	23	23	8	23	6	6	5	2.5	3
Ativa via clássica do complemento	+	+/-	++	-	-	-	+++	-	-
Transferência placentária	+	+/-	+	+	-	-	-	-	-
Membrana de linfócitos B maduros	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Ligação a receptores Fc de fagócitos	++	+/-	++	+	-	-	?	-	-
Transporte pela mucosa	-	-	-	-	++	++	+	-	-
Indução degranulação de mastócitos	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Adaptado de Kuby, 2000. Atividade: ++ = alta; + = moderada; +/- = mínima; - = nenhuma.

IgG, IgE e IgD: monômeros; IgA: monômero, dímero, trímero ou tetrâmero; IgM de membrana: monômero; IgM sérica: pentâmero.

entre os diferentes anticorpos e determinam a especificidade da interação antígeno-anticorpo. Os resíduos dos domínios variáveis que não fazem parte dos CDRs constituem o arcabouço (*framework*) da região variável.

Os trabalhos pioneiros que analisaram a estrutura da molécula de anticorpo mostraram que todos os domínios, tanto variáveis quanto constantes, formam estruturas globulares compactas com um dobramento característico denominado *Immunoglobulin Fold*. Cada domínio consiste no arranjo estável de fitas β antiparalelas ligadas por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura de bicamada estabilizada por ponte dissulfeto entre as duas camadas. Nos domínios variáveis, a bicamada é formada por nove fitas, enquanto que nos domínios constantes são sete as fitas que formam a bicamada.

O sítio de ligação ao antígeno é formado por seis *loops* polipeptídicos, três da V_L e três da V_H , denominados L1, L2, L3 e H1, H2 e H3, respectivamente. Dentro de cada domínio variável, os *loops* são conectados ao arcabouço de fitas β descrito acima. As seqüências polipeptídicas destes *loops* são, em sua grande maioria, correspondentes às seqüências dos CDRs.

Os principais determinantes da especificidade e afinidade do anticorpo por um antígeno são: conformação tridimensional da região hipervariável, tamanho, forma e caráter químico dos resíduos da superfície do anticorpo. Os conhecimentos estruturais são fundamentais não só para o entendimento dos mecanismos moleculares do reconhecimento imune, mas também para o desenho e modelagem de domínios variáveis de anticorpos para aplicação terapêutica, como a humanização de anticorpos. Vários anticorpos utilizados clinicamente no tratamento de doenças auto-imunes foram produzidos através desta engenharia de anticorpos, como, por exemplo, o anticorpo humanizado Epratuzumab (anti-CD22) e o anticorpo quimérico Rituximab (anti-CD20).

RESPOSTA IMUNE HUMORAL

O amplo repertório de linfócitos B e de anticorpos, gerado após o processo de maturação descrito anteriormente, participa da resposta imune humoral através de diferentes mecanismos efetores, como neutralização de antígenos, opsonização, ativação do complemento e ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo). Além disso, linfócitos B são também células apresentadoras de antígenos, fornecem sinais de co-estímulo para linfócitos T e produzem citocinas. Todos estes mecanismos conferem proteção contra uma enorme variedade de patógenos.

Por outro lado, este repertório altamente diversificado de anticorpos e de linfócitos B pode também ser patogênico, acarretando o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Historicamente, a participação dos linfócitos B nas doenças auto-

imunes tem sido relacionada com a produção de auto-anticorpos patogênicos, que se ligam a auto-antígenos, culminando em uma patologia auto-imune. Vários mecanismos estão envolvidos nesta patologia, como, por exemplo:

1. Anticorpos agonistas: anticorpos contra o receptor do hormônio TSH mimetizam a ativação do receptor levando a uma produção prolongada de TSH e hipertireoidismo;
2. Anticorpos neutralizantes: anticorpos contra o receptor de acetilcolina bloqueiam o receptor, desencadeando miastenia grave;
3. Anticorpos que ativam complemento: deposição de auto-anticorpos contra colágeno tipo IV nos rins e pulmões induzem ativação do complemento e conseqüente glomerulonefrite e pneumonite desencadeando a síndrome de Goodpasture;
4. Formação de imunocomplexos: anticorpo anti-DNA (lúpus).

A auto-imunidade patológica mediada por linfócitos B pode ser também independente de anticorpo, uma vez que estas células apresentam antígenos e modulam a atividade de linfócitos T e DC, tanto através da expressão de moléculas co-estimuladoras quanto através da produção de citocinas e quimiocinas.

As intervenções terapêuticas que visam regular a participação dos linfócitos B no desencadeamento de patologias auto-imunes são baseadas em duas estratégias: 1) anticorpos que depletam populações de linfócitos B, usando antígenos preferencialmente ou especificamente expressos em linfócitos B, como CD20 (Rituximab), CD22 (Epratuzumab) e CD52 (Campath-1H); 2) bloqueio de sinais e fatores essenciais para a ativação e sobrevivência de linfócitos B, como as moléculas co-estimuladoras CD40/CD40L e a via BLys/BR3 (Belilumab).

O sucesso na utilização destes tratamentos tem colaborado na elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos no complexo desencadeamento das patologias auto-imunes.

LITERATURA SUGERIDA

1. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*. Volume 25, Apr 2007.
2. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annual Review of Immunology*. Volume 24, Page 287-320, Apr 2006.
3. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol*. 2006 Apr; 7(4):344-53.
4. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006 May;6(5):394-403.
5. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2000. 4 ed. 670p.
6. Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annual Review of Immunology*. Volume 24, Page 467-496, Apr 2006.
7. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* 6:107-116 (01 Feb 2006).