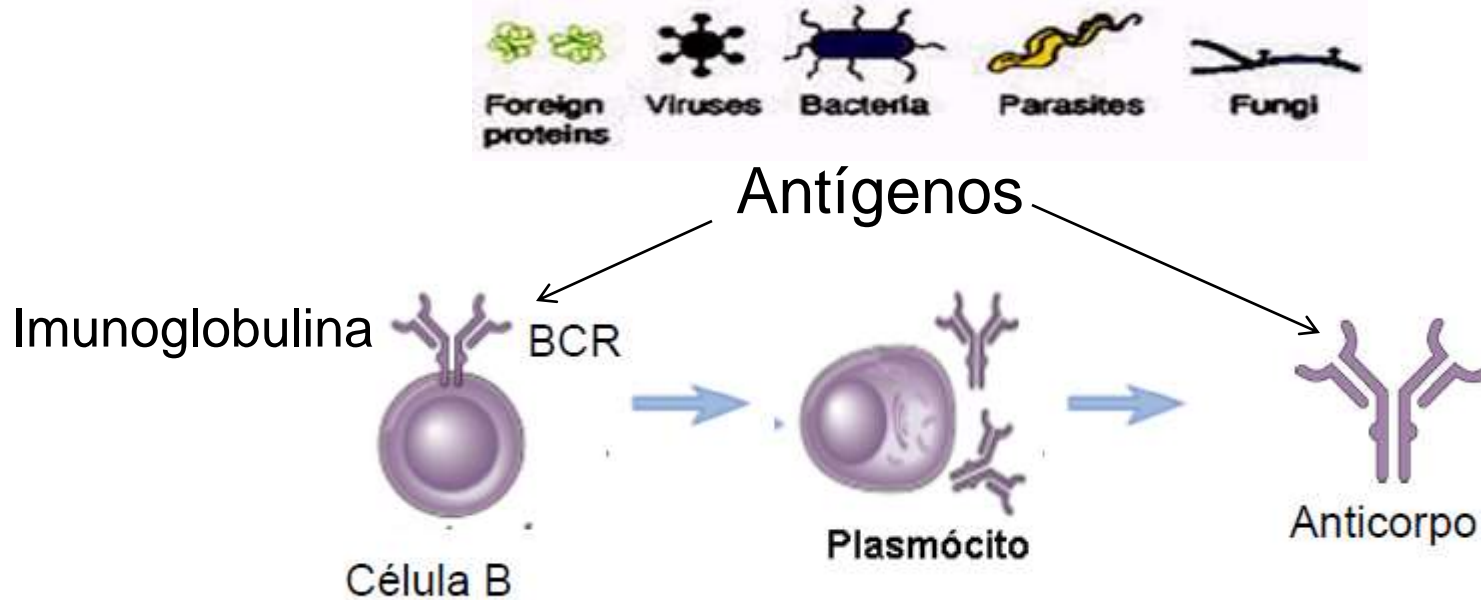


AULA: ANTICORPOS E IMUNOGLOBULINAS

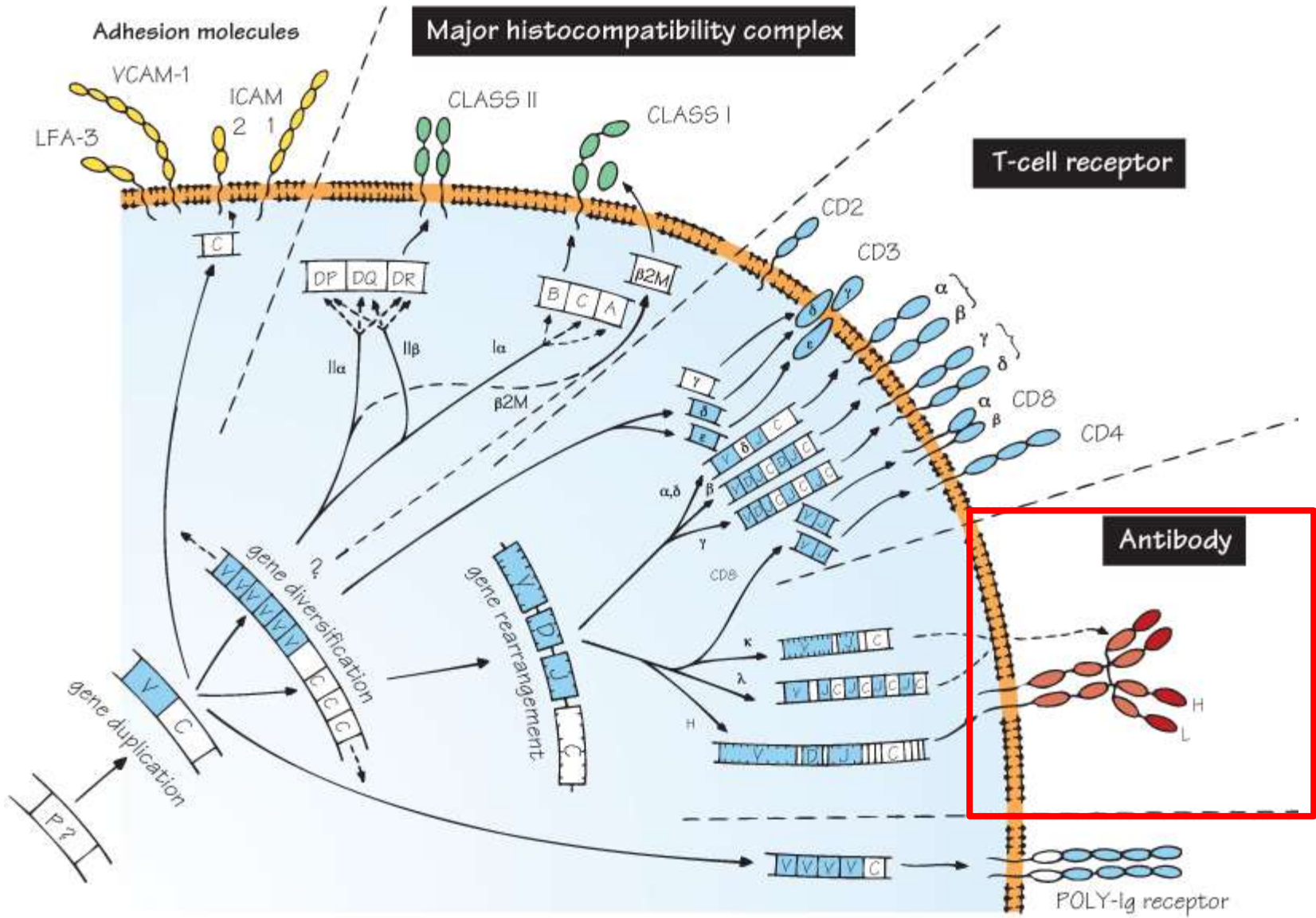
Prof. Helio José Montassier

1. **Imunoglobulinas** – são **Glico-Proteínas** de conformação globular (**Imunoglobulinas**) que são os principais mediadores da **Resposta Imune Adquirida Humoral (RIH)**, sendo nesse caso denominadas Anticorpos (**Acs**) e que reagem especificamente com os (**Ags**) que estimularam a sua produção.
2. **Imunoglobulinas** - podem ser encontradas sob a forma secretada em fluidos biológicos (plasma / soro sanguíneo, secreções mucosas), os chamados **Acs**, ou ancorados na membrana de Linfócitos B (= Receptores de Linfócitos B - BCR)

IMUNOGLOBULINAS e ANTICORPOS

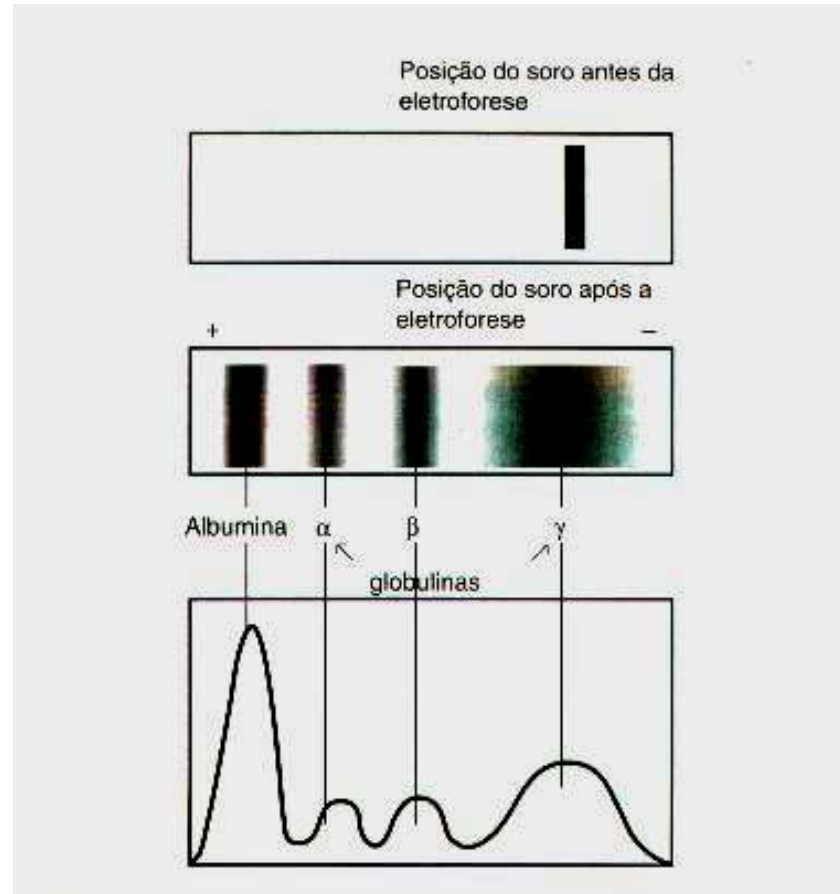


Correntemente, quando falamos em imunoglobulina referimo-nos tanto a imunoglobulina como a anticorpo. No entanto, *imunoglobulina* é aquela que está expressa na membrana do linfócito B, que lá está acoplada; já ouvimos falar da IgM de membrana bem como da IgD de membrana. No entanto, nós sabemos que por capacidade de mudança de isotipia a célula B vai conseguir produzir imunoglobulinas de isotipos diferentes. Quando estas são secretadas nós chamamos de anticorpos. Portanto *anticorpo* é a forma secretada da imunoglobulina de membrana.

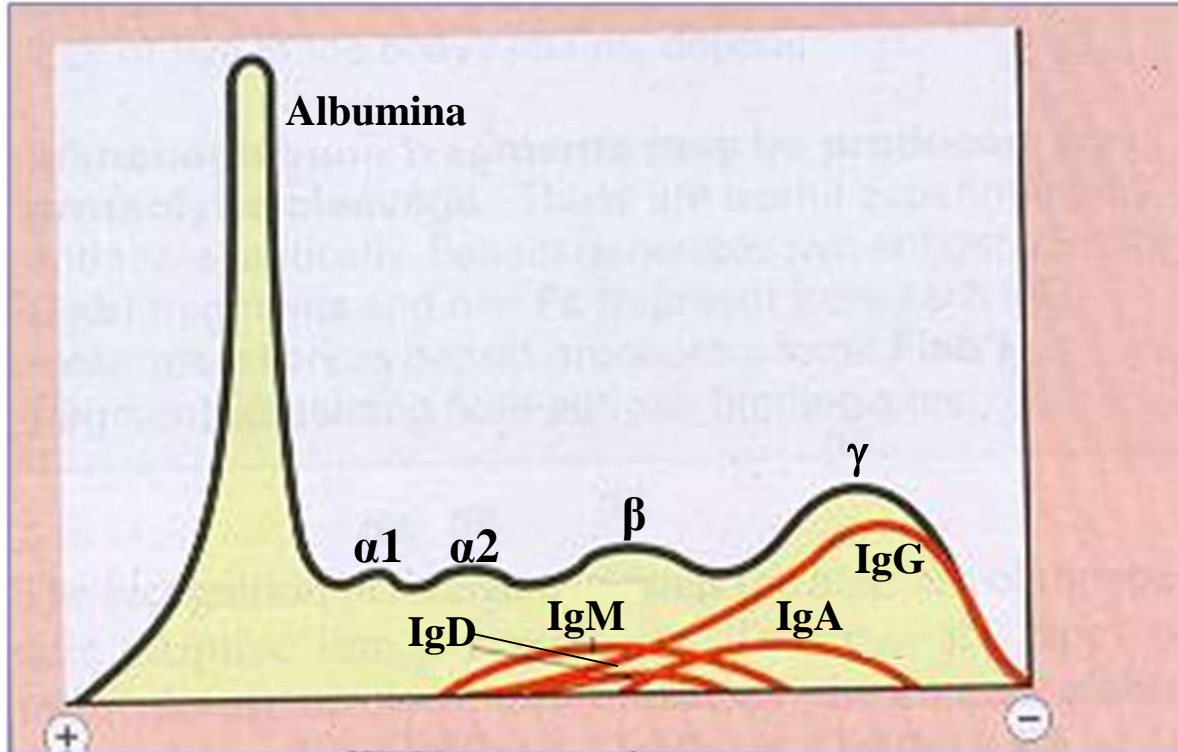


Evolution of Recognition Molecules: The Immunoglobulin Superfamily

Os anticorpos são conhecidos como gamaglobulinas por causa do seu comportamento de migração na eletroforese de proteínas do soro.



Eletroforese: processo de migração de proteínas em um campo elétrico



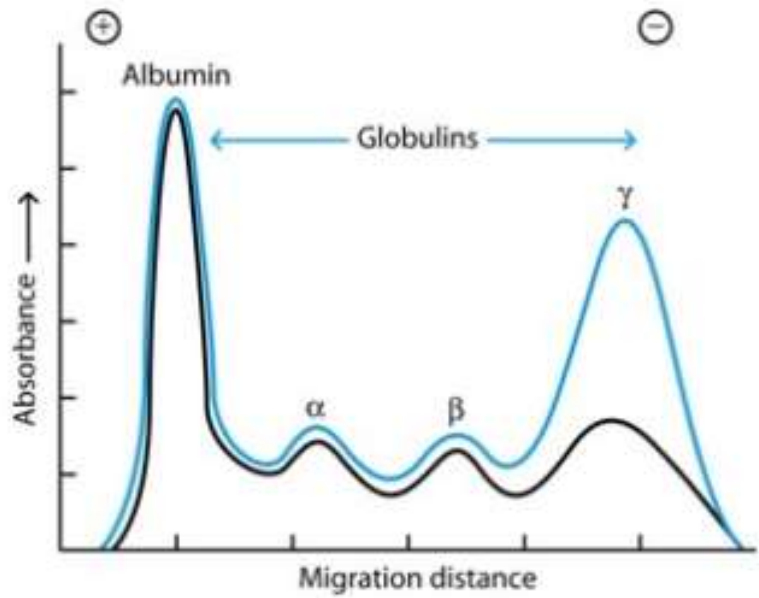
Separação por eletroforese em gel de agarose das principais frações de proteínas do soro sanguíneo, com destaque para as frações que contêm os principais isótipos de anticorpos (IgG, IgA, IgM e IgD).

Gel electrophoresis of serum proteins

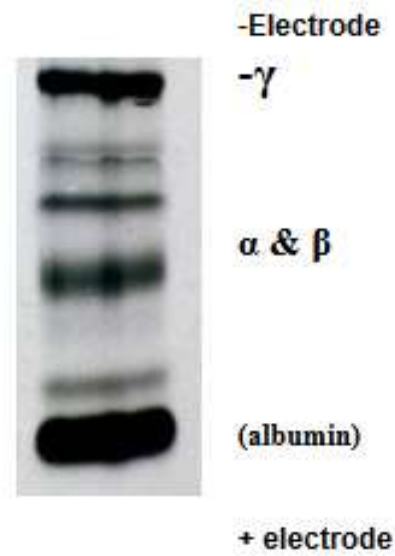
Ig -- called gamma globulin

Alpha and beta globulins
-- other major serum proteins

Albumin



Mouse immunized with OVA
Blue line: native serum
Black line: after removal of IgG



Anticorpos e Imunoglobulinas

2- Propriedades Físicas, Químicas e Antigênicas dos Acs e Igs.

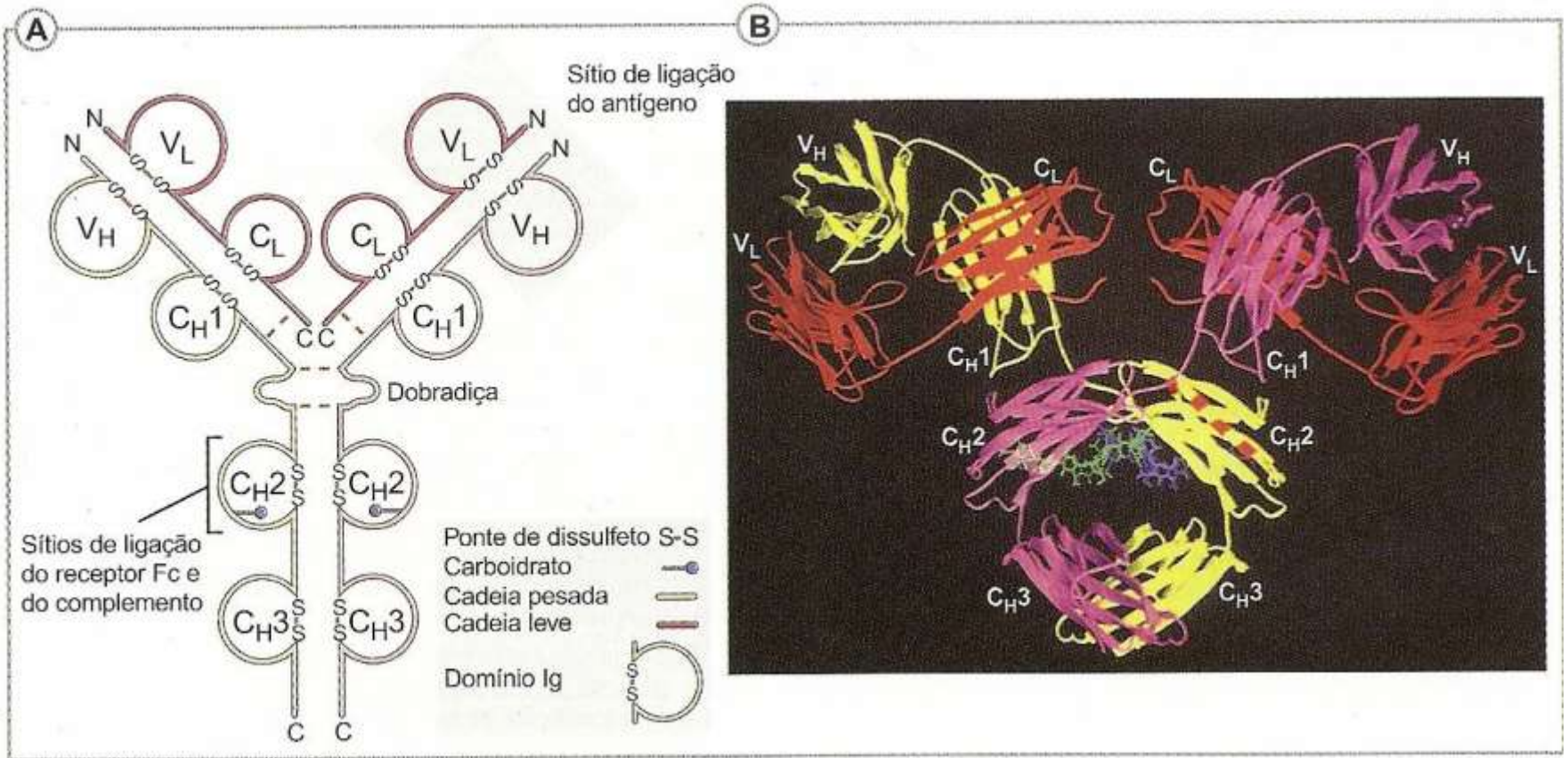
2.1.- Quanto à Solubilidade em Soluções Saturadas de Sais Neutros (Sulfato de Amônio e Sulfato de Sódio \Rightarrow Globulinas).

2.2.- Quanto à Carga Eletrostática \Rightarrow Acs e Igs tendem a apresentar cargas positivas, migrando na eletroforese na fração gama globulina.

2.3.- Quanto ao P.M. e ao Tamanho \Rightarrow Acs e Igs apresentam P.M. variando de 150 a 900 kda e coeficiente de sedimentação variando de 7 a 19S.

2.4.- Quanto à Estrutura Antigênica \Rightarrow Os Acs são proteínas e atuam como excelentes Ags e imunógenos entre diferentes espécies de animais, podendo ser usados na produção de antissoros, que servirão para caracterizar diferentes epítomos presentes em diferentes cadeias peptídicas e regiões que compõem as moléculas de Acs/Igs. Dessa forma, foi verificado que os Acs existem sob formas diferentes de classes ou subclasses/isótipos de Igs (*Ppais. Classes são IgG, IgM, IgA, IgD e IgE).

Estrutura básica de uma molécula de Anticorpo



Anticorpos e Imunoglobulinas

3- Estrutura Básica das Moléculas de Acs e Igs

3.1.-Organização molecular da Ig protótipo de modelo para estudo - IgG

3.2.-Fragmentos gerados por clivagem enzimática com Papaína e Pepsina e cadeias polipeptídicas liberadas por redução e alquilação das pontes dissulfeto das moléculas de Acs/Igs.

3.3.-A relação entre cadeias polipeptídicas liberadas por quebra das pontes dissulfeto ou dos fragmentos gerados por clivagem enzimática na montagem de uma molécula padrão de Ac/Ig.

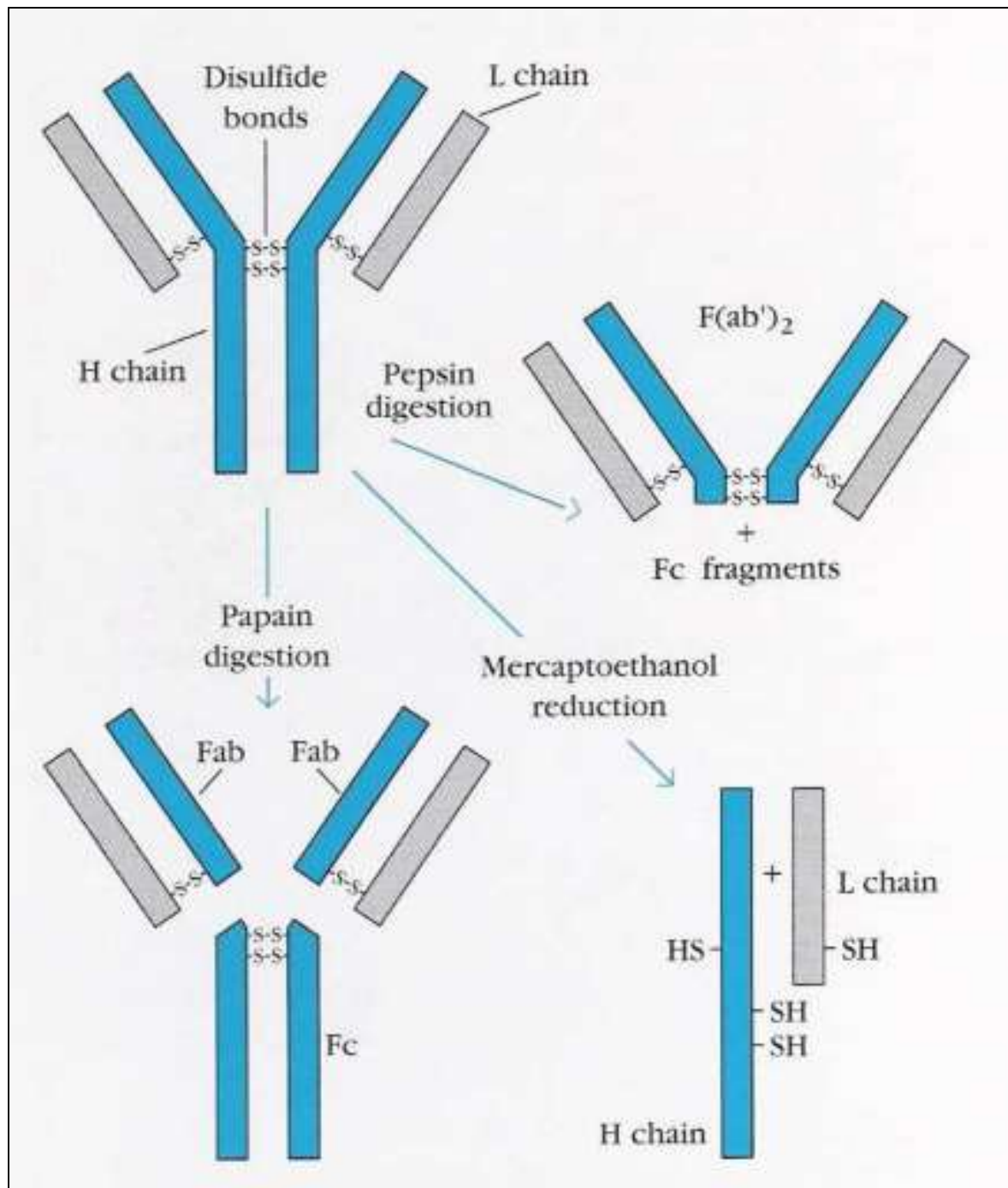
4.- Polimorfismo das Igs

- classes ou subclasses/isótipos de Igs (*Ppais. Classes são IgG, IgM, IgA, IgD e IgE).

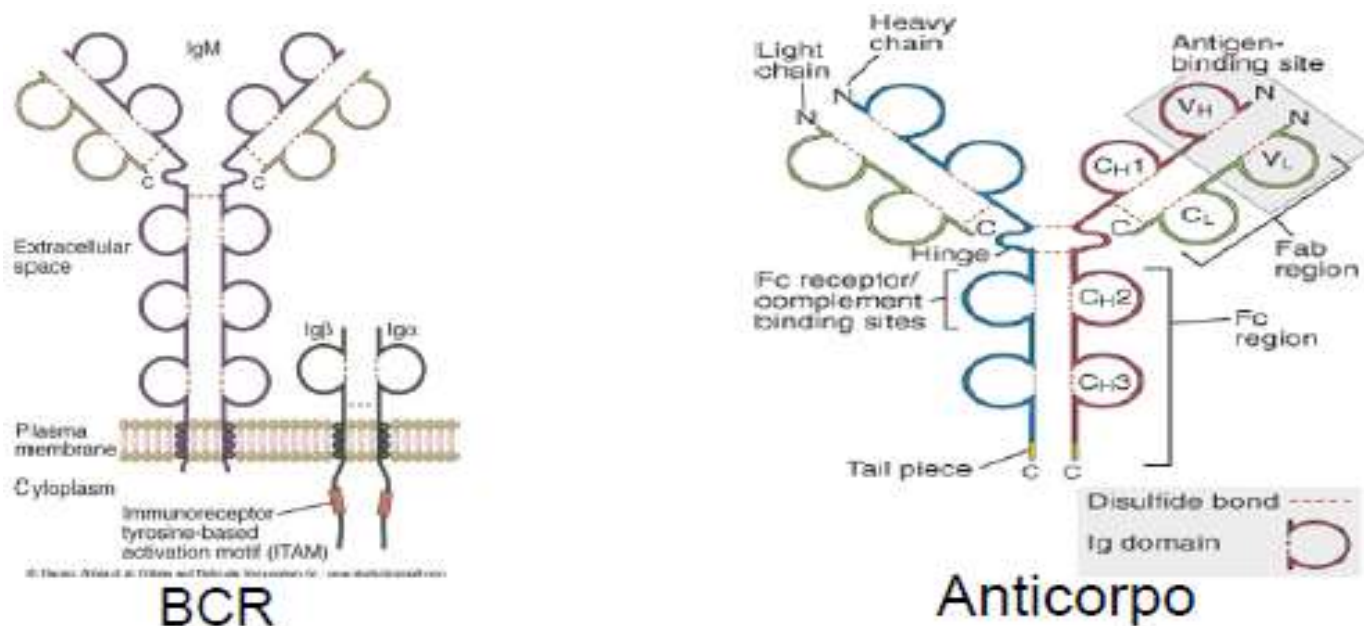
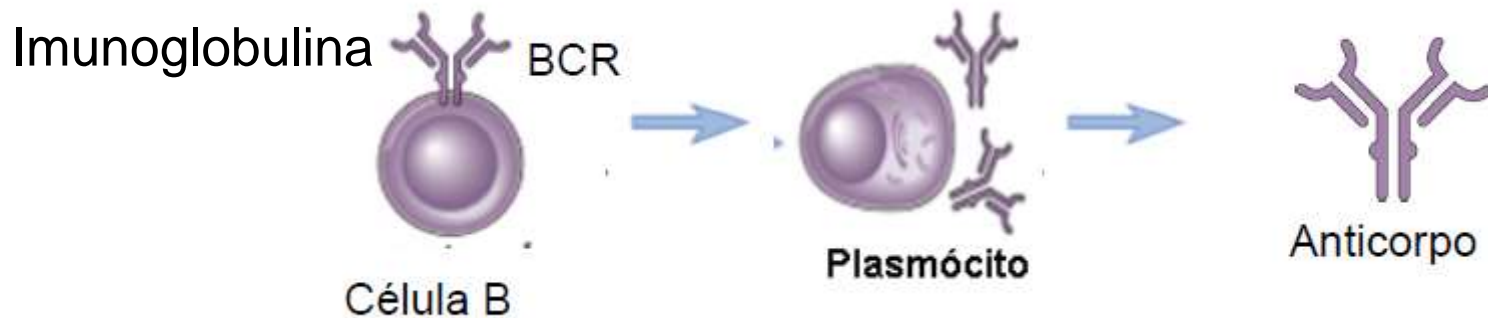
- Alótipos de Igs.

- Idiótipos de Igs.

Separação dos Principais Fragmentos por digestão com enzimas proteolíticas (Pepsina e Papaína) e separação de Cadeias Polipeptídicas das Imunoglobulinas / Anticorpos por redução das pontes dissulfeto com B-mercaptoetanol.

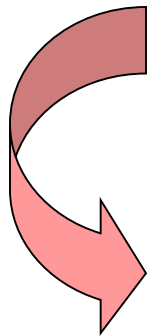


Relação entre Imunoglobulinas e Linfócitos B e Plasmócitos



Propriedades das Imunoglobulinas (BCRs) dos Anticorpos (Acs)

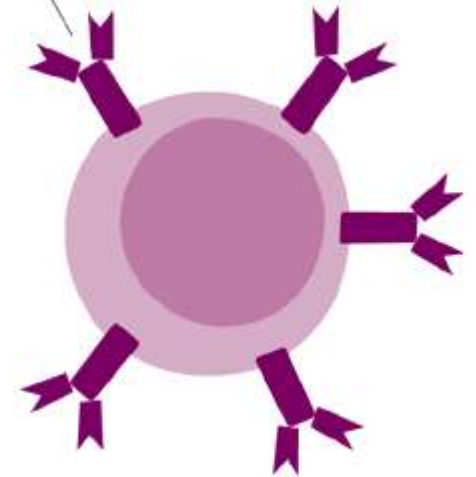
- Acs são sintetizados pelos linfócitos B após o estímulo antigênico
- BCRs são sintetizados durante o desenvolvimento de linfs. B e não dependem de estímulo antigênico



BCRs - Ligados à membrana

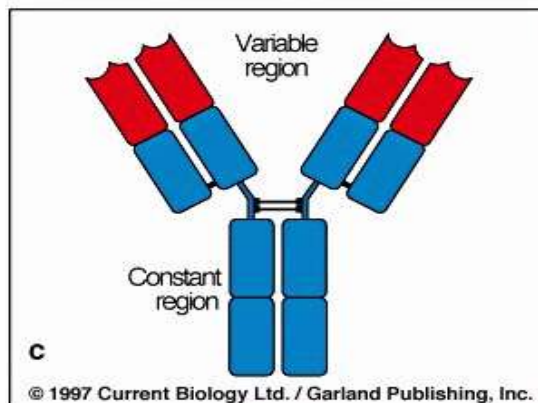
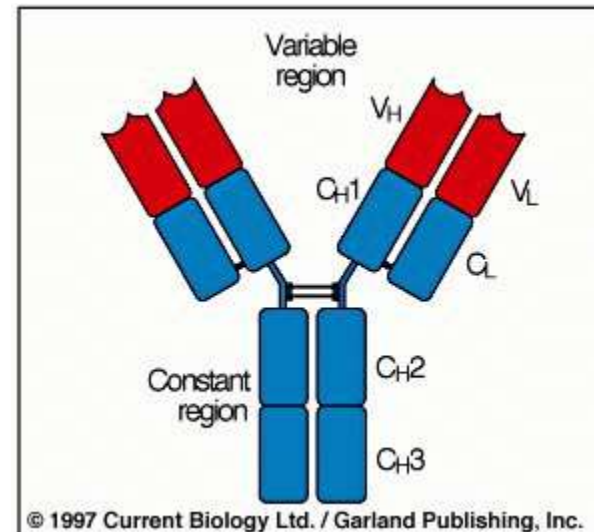
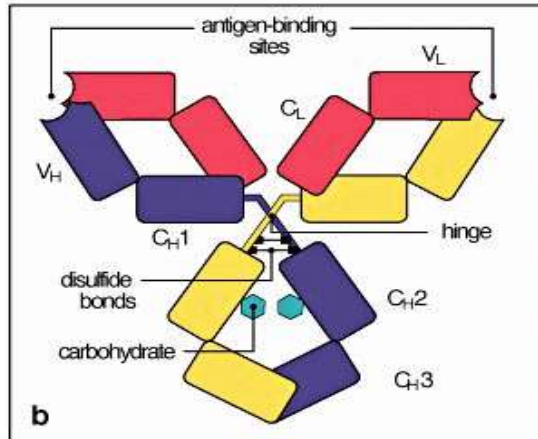
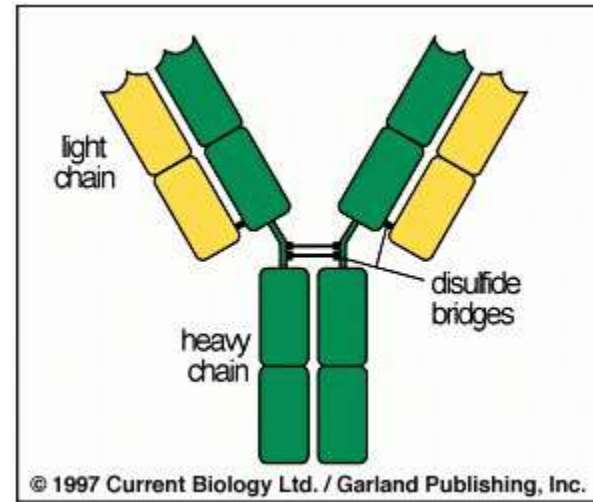
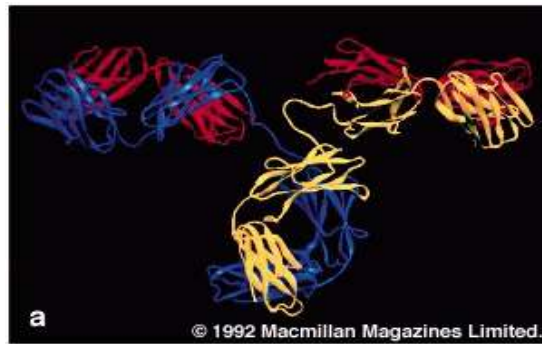
Acs-Secretados

Immunoglobulin

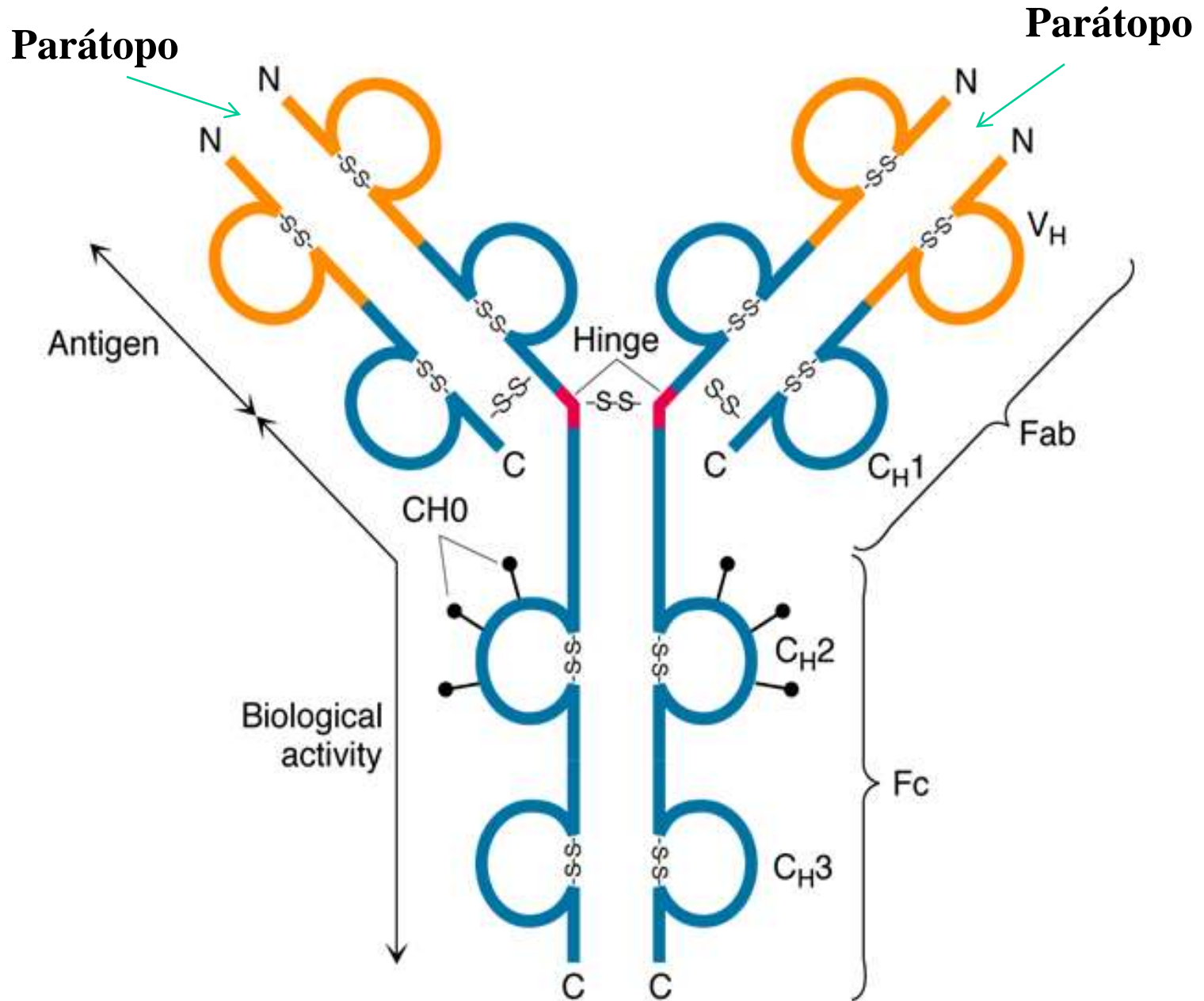


B lymphocyte

Fig. 1 Estrutura da Molécula de Anticorpo



Recapitulando - Estrutura do Ac



Região de dobradiça das Imunoglobulinas

Permite flexibilidade a ligação

Antígenos de superfície **distantes**

Antígenos de superfície **próximos**

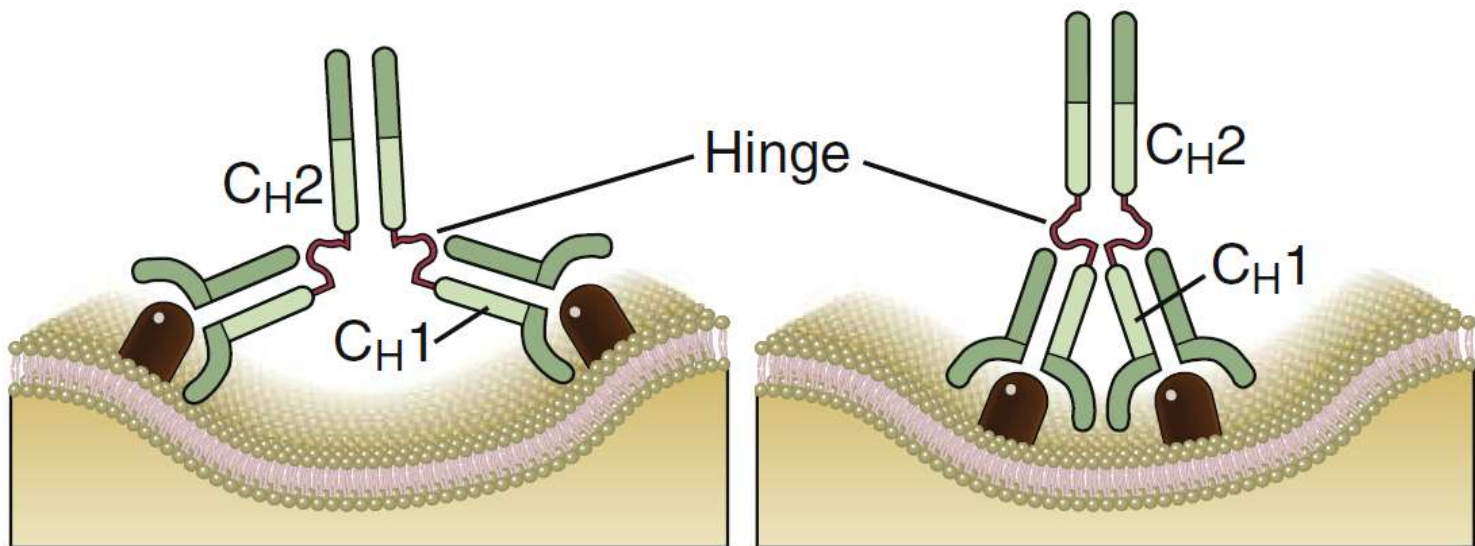
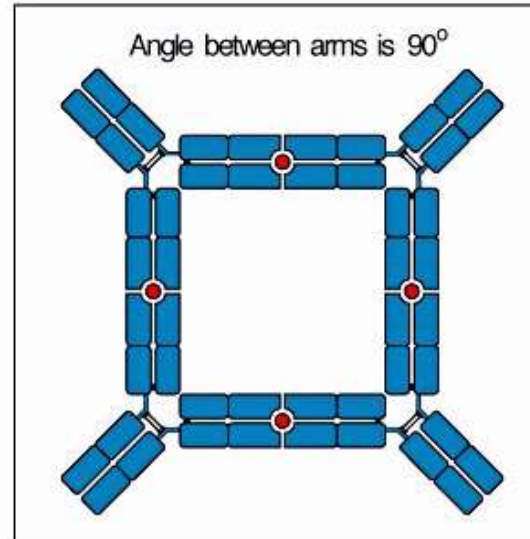
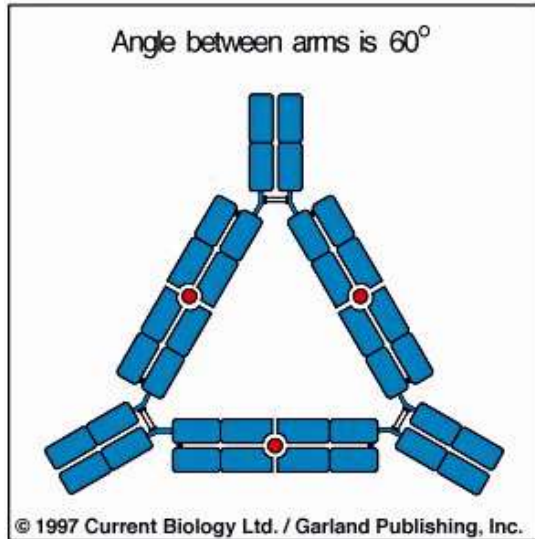
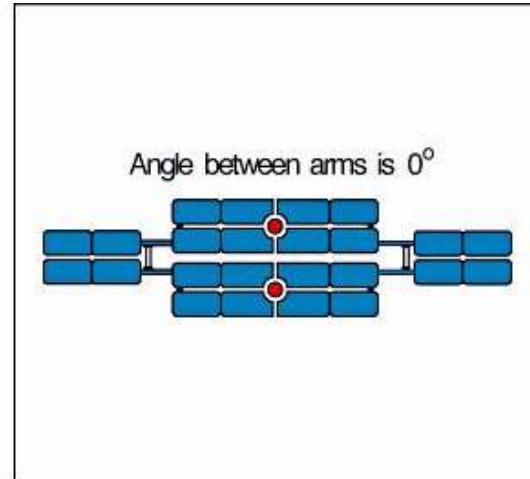
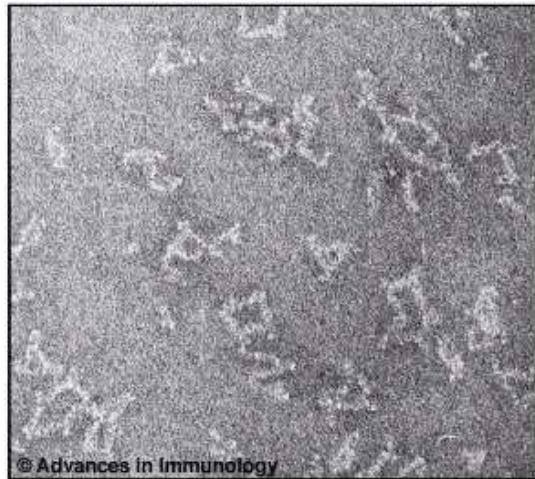


Fig.- A Região da Dobradiça e a Flexibilidade dos Sítios Combinatórios dos Anticorpos

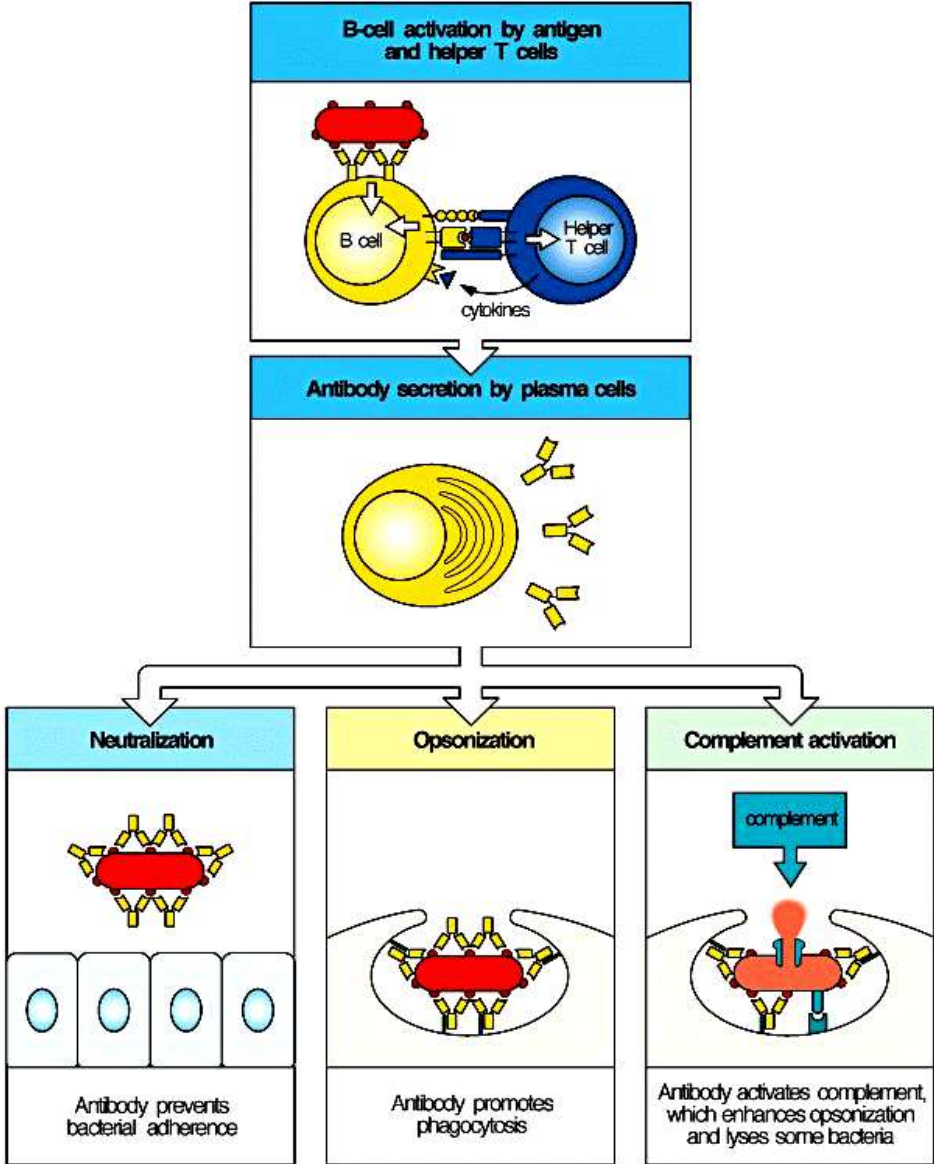


Anticorpos e Imunoglobulinas

9.1.- Conceito e Funções dos Domínios da Molécula de Imunoglobulinas ⇒

- a) **Domínio VL-VH**: Reconhecimento do Ag (Sítio combinatório / Parátopo)
- b) **Domínio CL e CH1**: Ligação não covalente entre as cadeias L e H; função de "espaçador" entre o sítio combinatório e Fc.
- c) **CH2-CH2**: Fixação do componente C1q do Sistema Complemento, interações com receptores de Imunoglobulinas da membrana de fagócitos (polimorfonucleares e mononucleares).
- d) **CH3-CH3**: Citotropia para Macrófagos, Monócitos, Células K e Linfócitos. Citotropia Heteróloga para Mastócitos. Ligação não covalente entre as cadeias H.
- e) **CH4-CH4**: Citotropia Específica para as Membranas de Mastócitos e Basófilos, (no caso de IgE).

Funções Biológicas dos Anticorpos

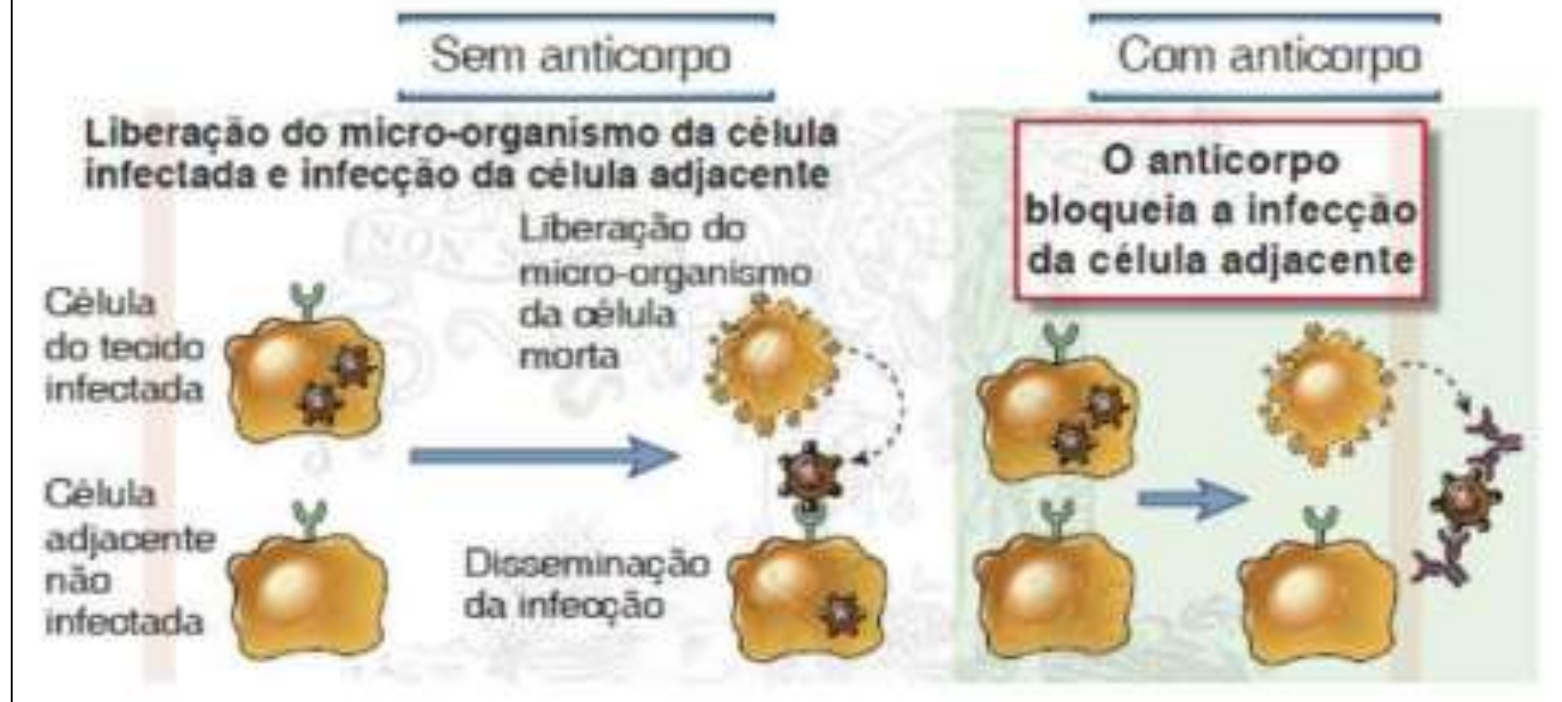


1- Neutralização de micróbios



➤ Inibe infecção

2- Inibe a disseminação do micro-organismo



3- Neutralização de toxinas

Ex: **Toxina tétano** – inibe transmissão neuromuscular – paralisia
Toxina diftérica – inibe síntese proteína – morte celular.



4- Opsonização e Fagocitose de Micro-organismos

Interação Fc IgG/receptor



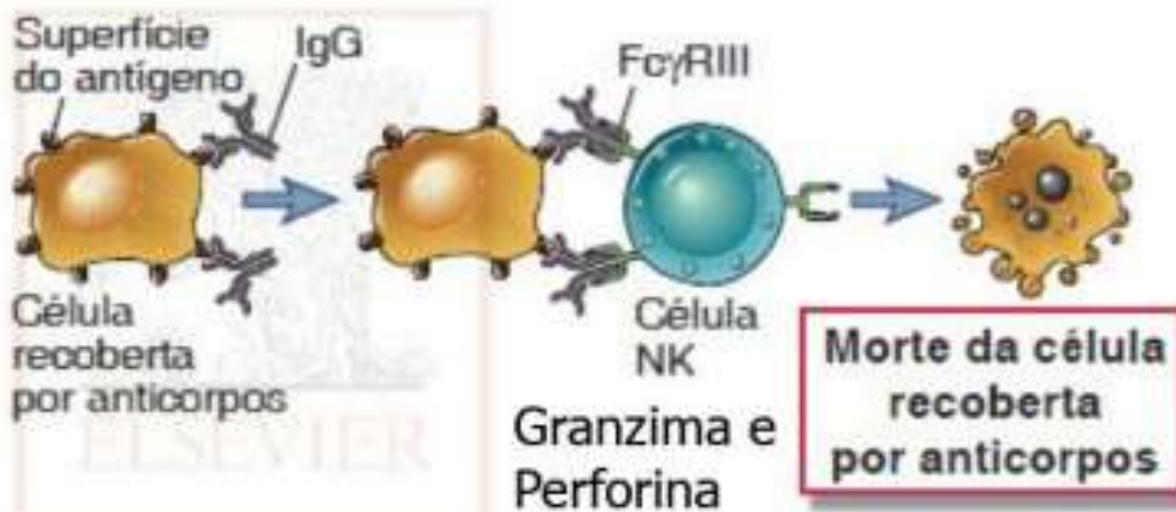
Degradação patógeno – eliminação
Macrófago/ neutrófilo

Apresentação peptídeos LT CD4
Macrófagos / células dendríticas

5.1- Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos (ADCC)

P. ex. Neutrófilos e NK

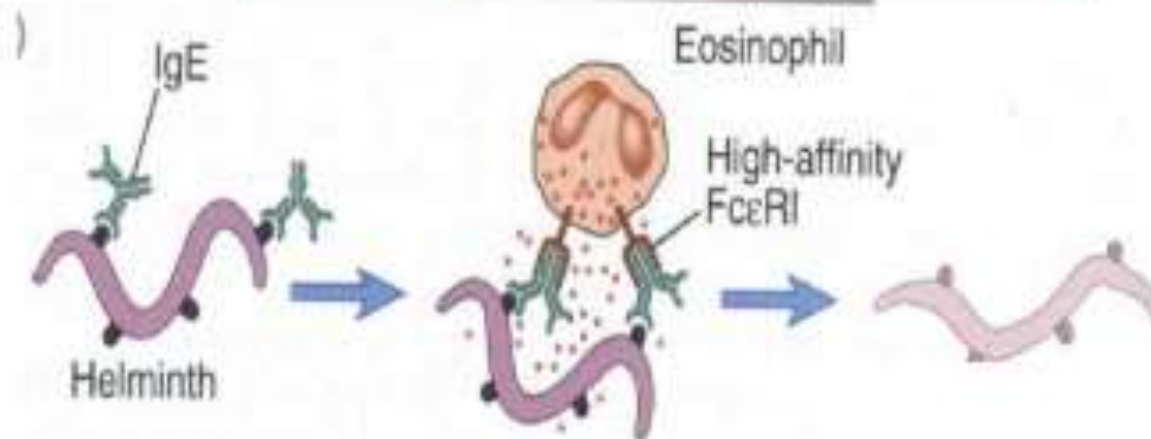
Interação Fc IgG/receptor



5.2- Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos

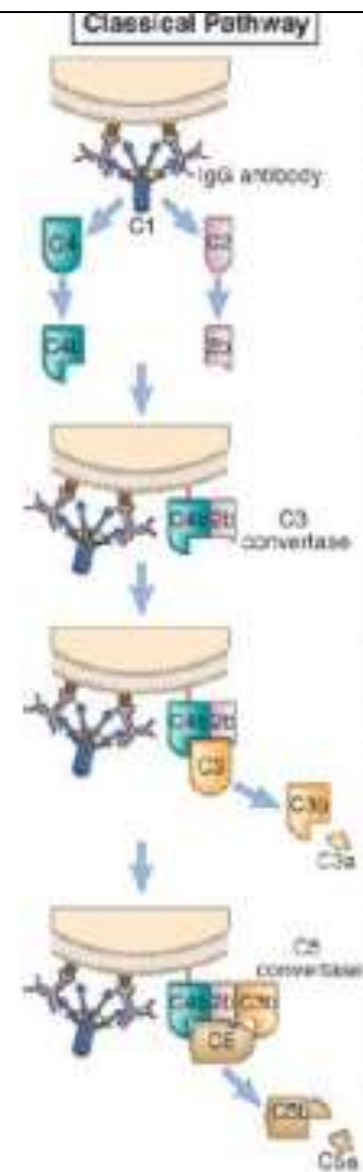
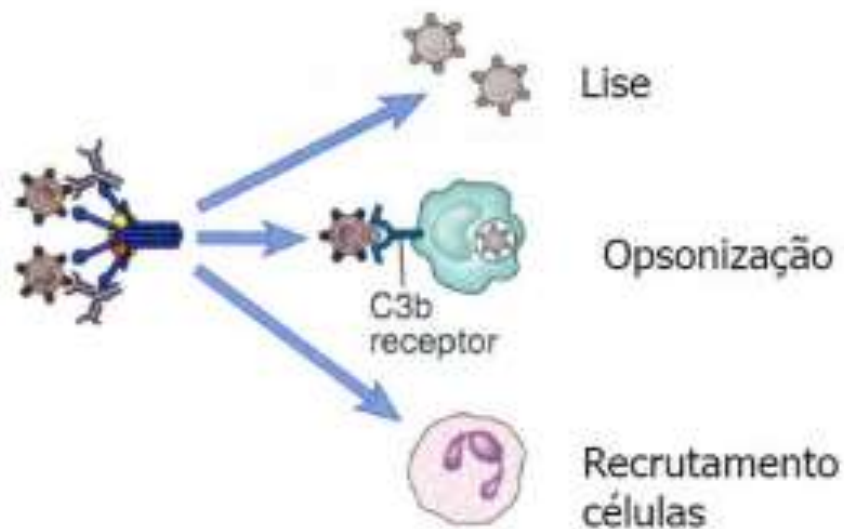
P. ex. Eosinófilos e Mastócitos

Interação Fc IgE/receptor



Grânulos: Proteína básica

6- Ativação Sistema Complemento

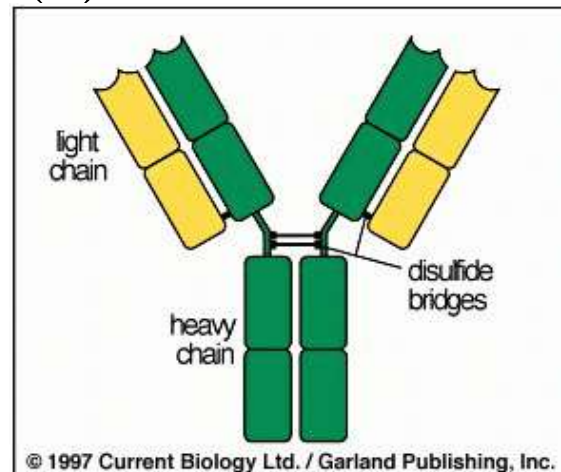
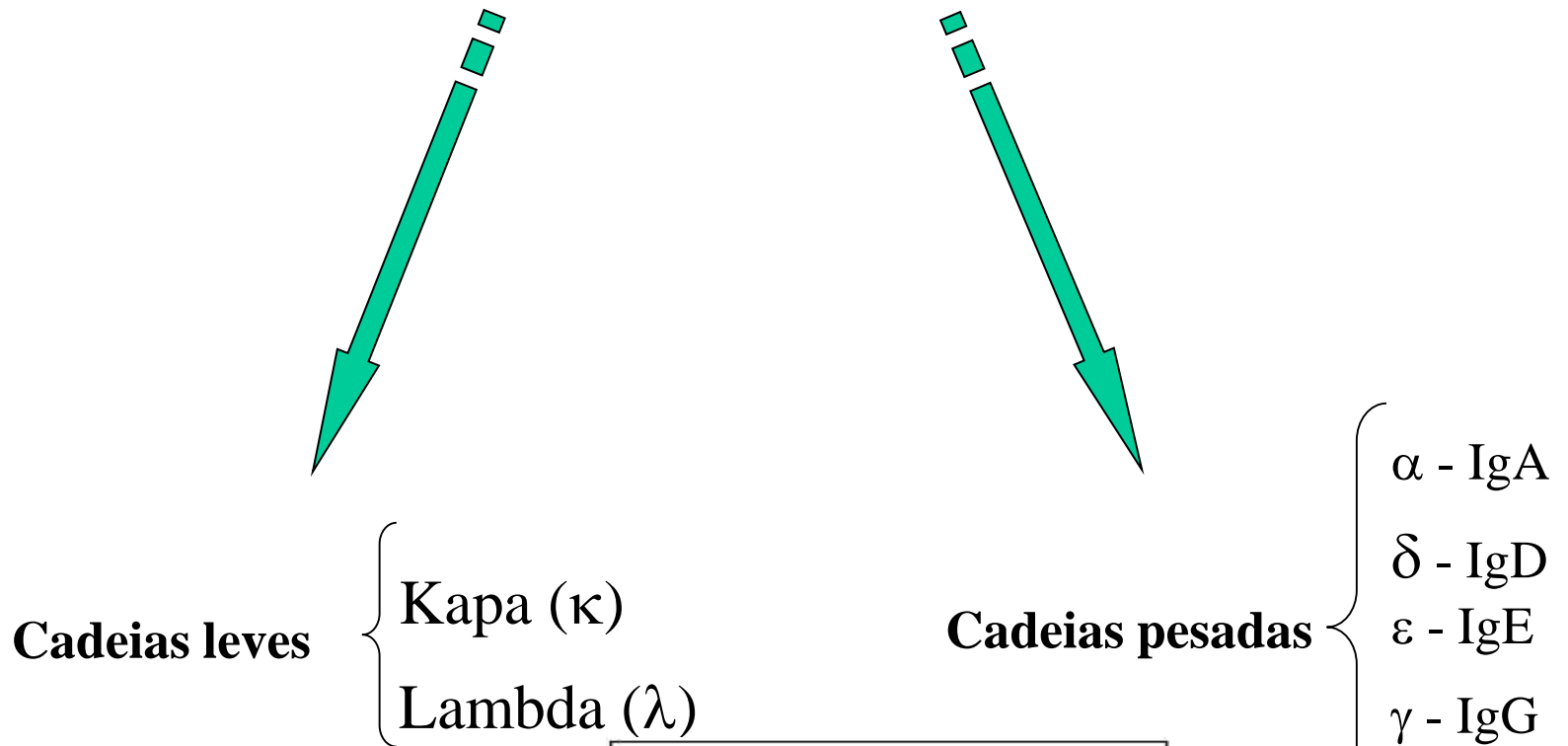


C5b inicia a formação do Complexo lítico da membrana
O CLM insere-se na membrana alvo
Rompimento das membranas por lise osmótica

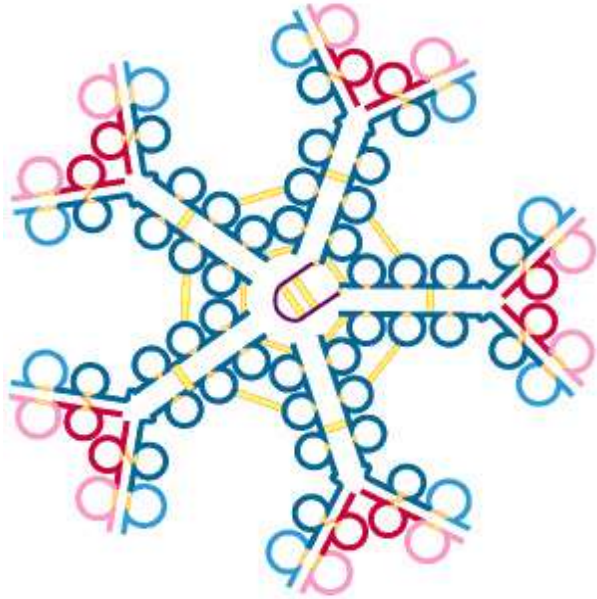
VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO DAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS DAS Igs / Acs:-

- Isótipos**
- Alótipos**
- Idiótipos**

Isótipos de Cadeias polipeptídicas de Igs / anticorpos



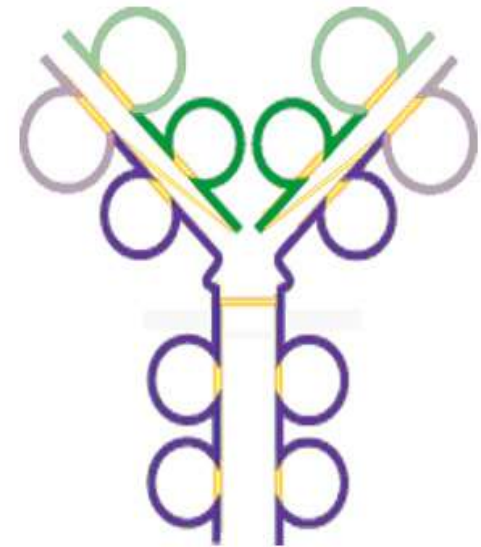
Principais Isótipos de Imunoglobulinas e de Acs



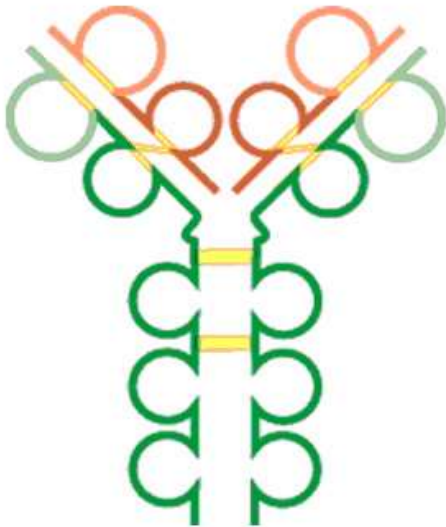
IgM



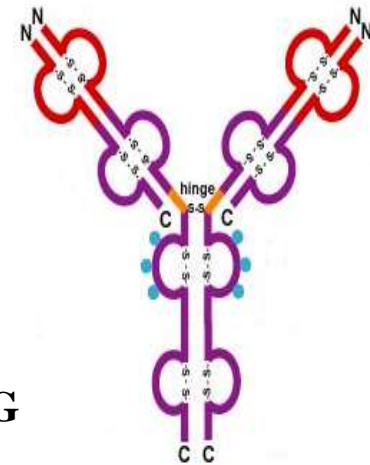
IgA



IgD



IgE



IgG

Estrutura da molécula de anticorpo

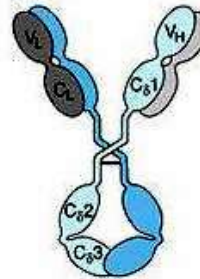
Os anticorpos se dividem em classes e subclasses de acordo com suas propriedades físico-químicas e antigênicas:

- Solubilidade;
- Carga eletrostática;
- Peso molecular;
- Estrutura antigênica.

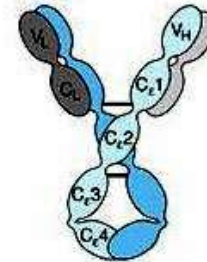
(a) IgG



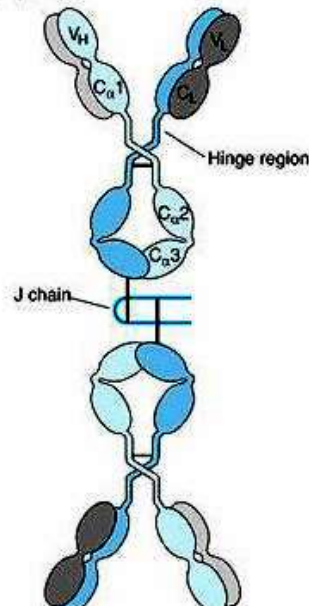
(b) IgD



(c) IgE



(d) IgA (dimer)



(e) IgM (pentamer)

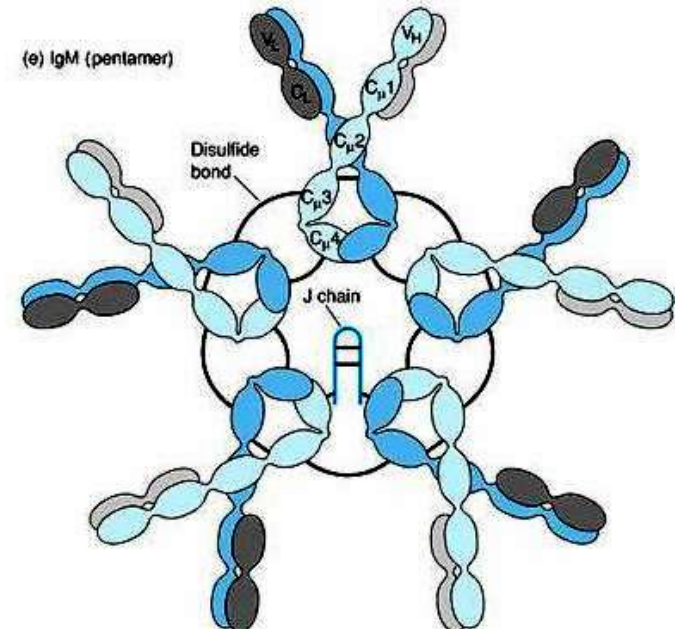
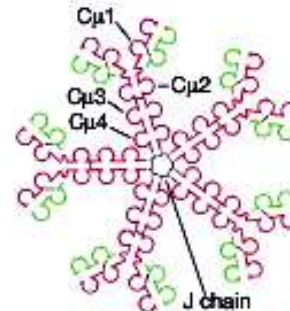
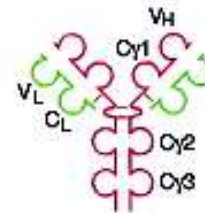
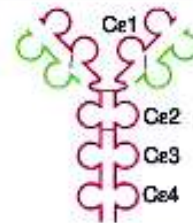
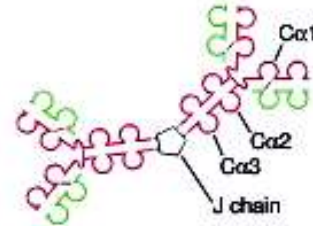


TABELA 5-2 Isótipos dos Anticorpos Humanos

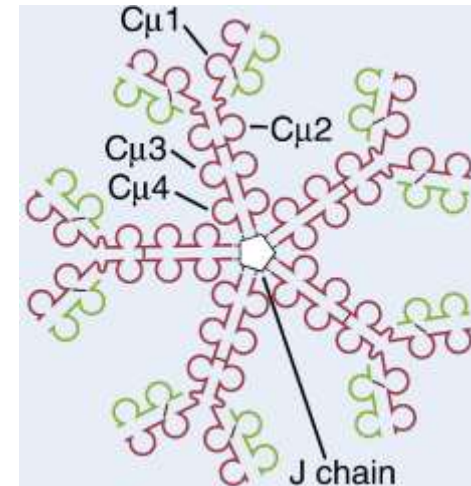
Isótipo do Anticorpo	Subtipos (Cadeia H)	Concentração Sérica (mg/mL)	Meia-vida Sérica (dias)	Forma Secretada	Funções
IgA	IgA1,2 (α 1 ou α 2)	3,5	6	IgA (dímero) Monômero, dímero, trímero	Imunidade de mucosa
IgD	Nenhum (δ)	Traço	3	Nenhuma	Receptor de antígeno do linfócito B virgem
IgE	Nenhum (ϵ)	0,05	2	IgE Monômero	Defesa contra parasitas helmintos, hipersensibilidade imediata
IgG	IgG1-4 (γ 1, γ 2, γ 3 ou γ 4)	13,5	23	IgG1 Monômero	Opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo, imunidade neonatal, autoinibição do linfócito B
IgM	Nenhum (μ)	1,5	5	IgM Pentâmero	Receptor de antígeno do linfócito B virgem, ativação do sistema complemento



Principais funções das classes de imunoglobulinas

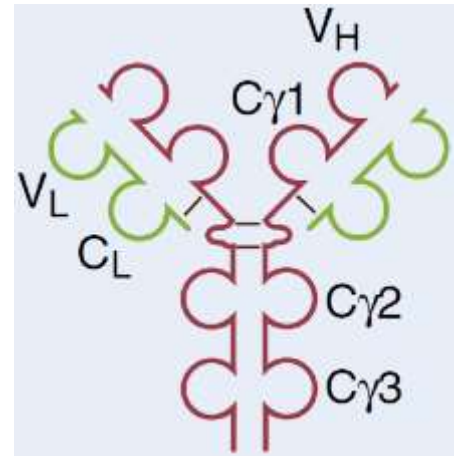
IgM

- Pentamérica Grande
- Cadeia J
- Componente secretor
- Funções
 - Ativação do sistema complemento
 - Neutralização
 - Aglutinação
 - Receptor de Ag do Linfs. B adultos (BCR)
- Primeira Ig a ser produzida



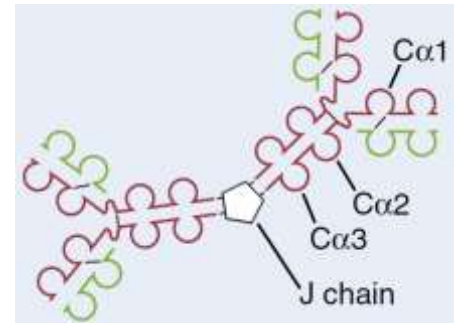
IgG

- Maior concentração no sangue
- Predomina nas respostas secundárias
- Funções
 - neutralização
 - opsonização
 - ADCC
 - Ativação do sistema complemento
- Presente no feto e recém-nascido



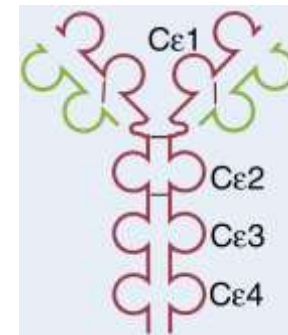
IgA

- Imunidade de mucosas – presente nas secreções (colostro, saliva, trato respiratório, gastrointestinal, urinário e genital)
- Monomérica, dimérica* (predominante)
- Função
 - neutralização
 - aglutinação



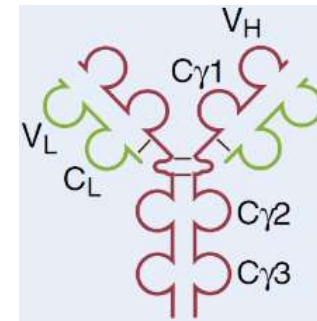
IgE

- Associada à receptores de mastócitos e basófilos
- Função
 - resposta anti-parasitária (helmintos)
- Envolvidos em processos alérgicos (reações de hipersensibilidade do tipo I ou anafilático)



IgD

- Presente na membrana de linfócitos imaturos
- Não é secretado
- Função desconhecida



□ **Tabela 16-2** | **Títulos de Imunoglobulina Sérica em Animais Domésticos e em Humanos**

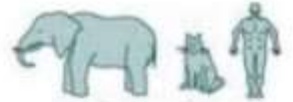
ESPÉCIES	NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS (mg/dl)			
	IgG	IgM	IgA	IgE
Equinos	1.000-1.500	100-200	60-350	4-106
Bovinos*	1.700-2.700	250-400	10-50	
Ovinos	1.700-2.000	150-250	10-50	
Suínos	1.700-2.900	100-500	50-500	
Caninos	1.000-2.000	70-270	20-150	2,3-4,2
Felinos [†]	400-2.000	30-150	30-150	
Galinhas	300-700	120-250	30-60	
Humanos	800-1.600	50-200	150-400	0,002-0,05

*Os bovinos mostram diferenças sazonais significativas nos títulos séricos de imunoglobulinas.

[†]Em gatos livres de patógenos, os títulos de imunoglobulinas são cerca de metade dos encontrados nos gatos de estimação.

Table 16-3 | Immunoglobulin Classes and Subclasses in Selected Mammals

IMMUNOGLOBULIN CLASSES					
SPECIES	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Horses	G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7	A	M	E	D
Cattle	G1, G2, G3	A	M	E	D
Sheep	G1, G2, G3	A1, A2	M	E	D
Pigs	G1, G2a, G2b, G3, G4	A	M	E	D
Dogs	G1, G2, G3, G4	A	M	E1, E2	D
Cats	G1, G2, G3, (G4?)	A	M	(E1, E2?)	?
Mice	G1, G2a, G2b, G3	A1, A2	M	E	D
Chimpanzees	G1, G2, G3,	A	M	E	D
Humans	G1, G2, G3, G4	A1, A2	M1, M2	E	D



Cartilaginous fish

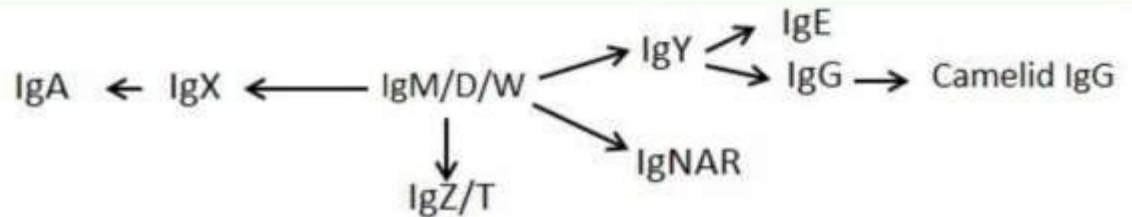
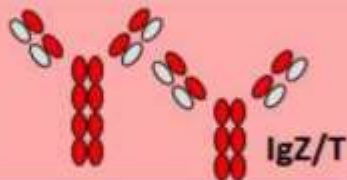
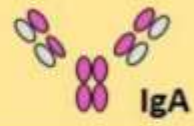
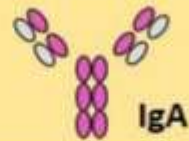
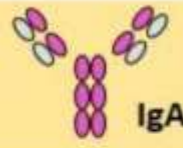
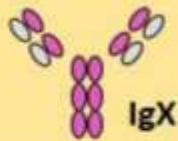
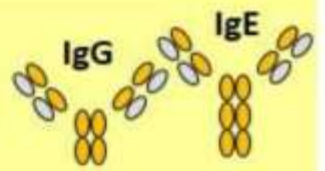
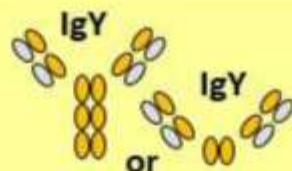
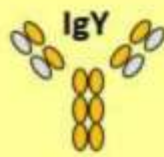
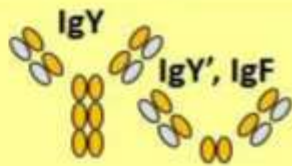
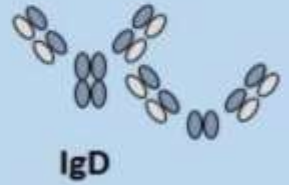
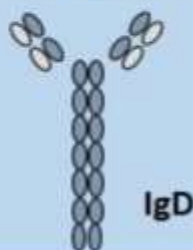
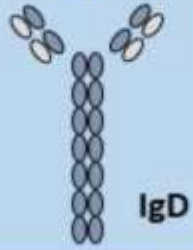
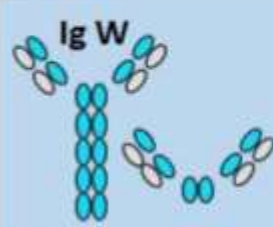
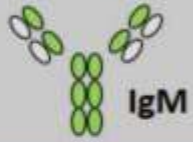
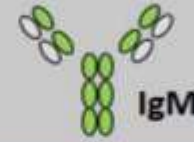
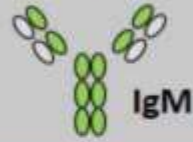
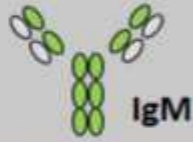
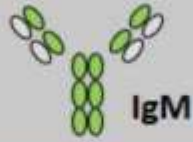
Bony fish

Amphibians

Reptiles

Birds

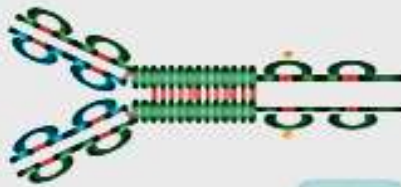
Mammals



IgG
 • Monômero (75)

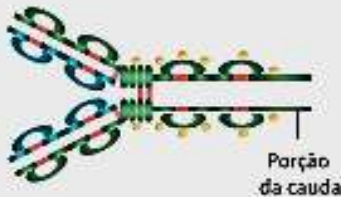


IgG1, IgG2 e IgG4

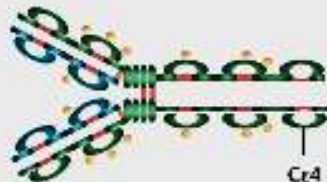


IgG3

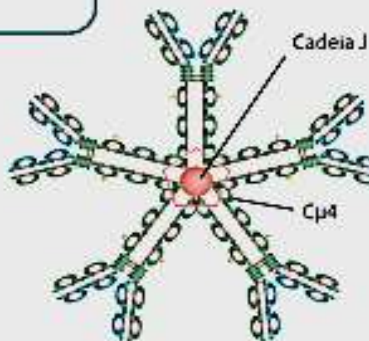
IgD
 • Monômero
 • Porção da cauda



IgE
 • Monômero
 • Domínio extra (C_μ4)



IgM
 • Pentâmero (195)
 • Domínio extra (C_μ4)
 • Cadeia J



IgA
 • Soro - monômero
 • Secreções (sIgA)
 Dímero (115)
 Cadeia J
 Componente secretor

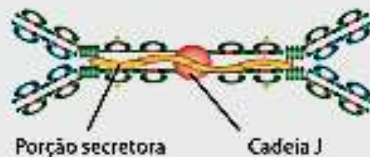
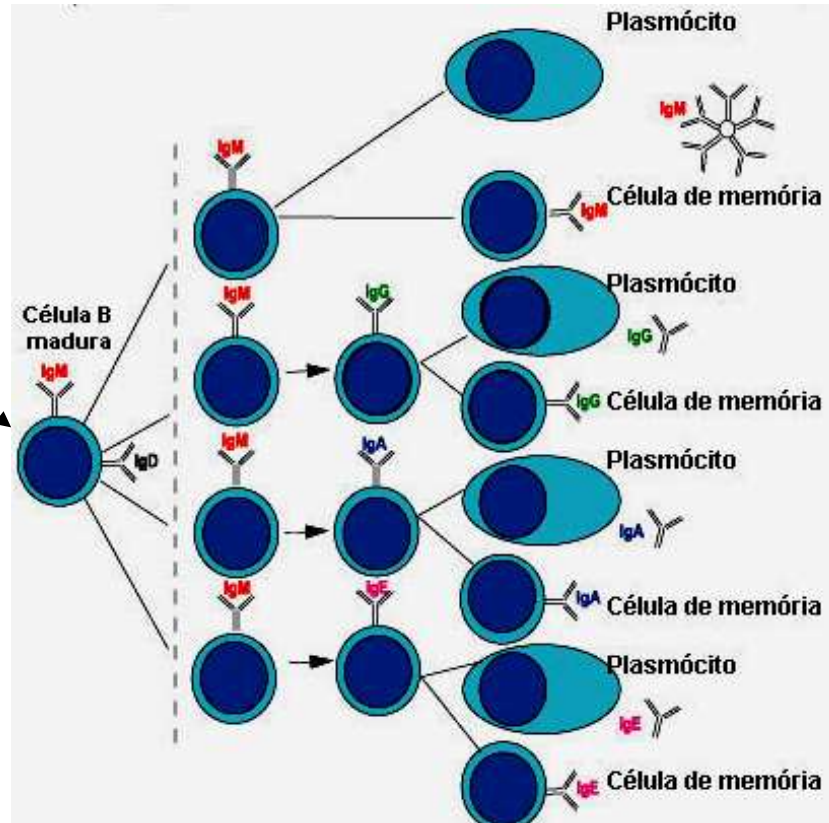
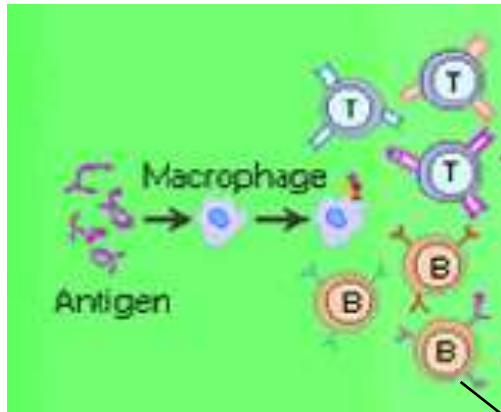


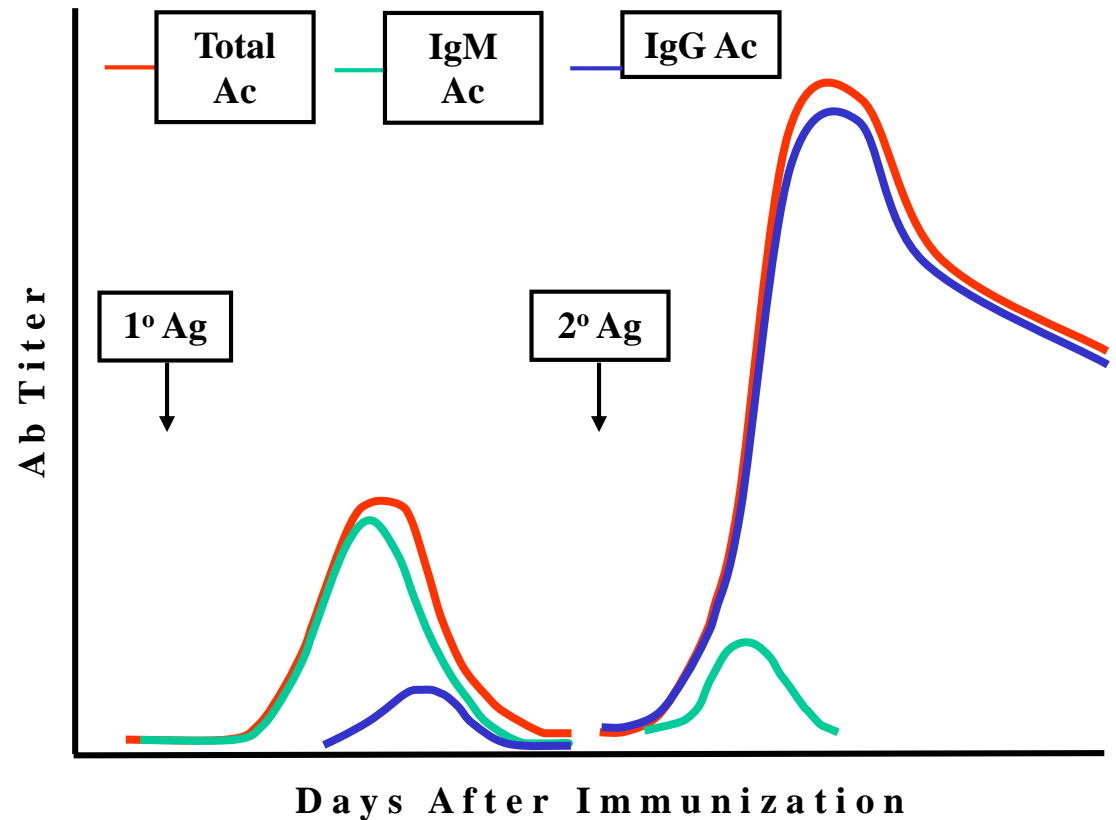
Figura – Resumo sobre a Estrutura de todas as classes de imunoglobulinas.

Indução da Produção de Anticorpos



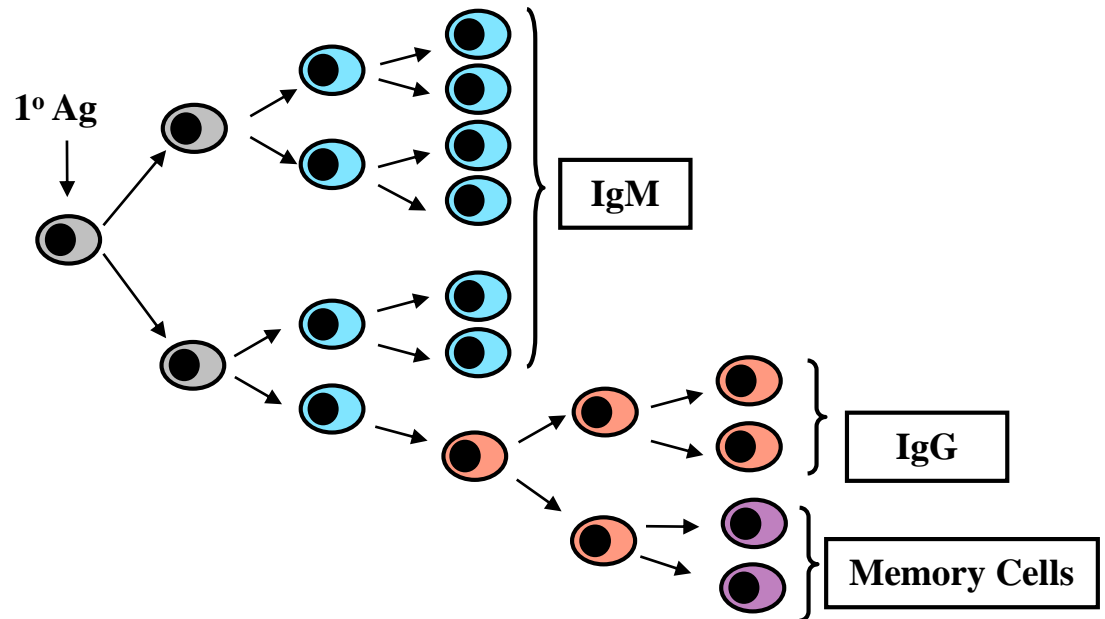
Mudanças Qualitativas na Produção de Acs durante as Respostas Imunes Humorais 1^a e 2^a

- Class variation
 - 1^o - IgM
 - 2^o - IgG, IgA or IgE



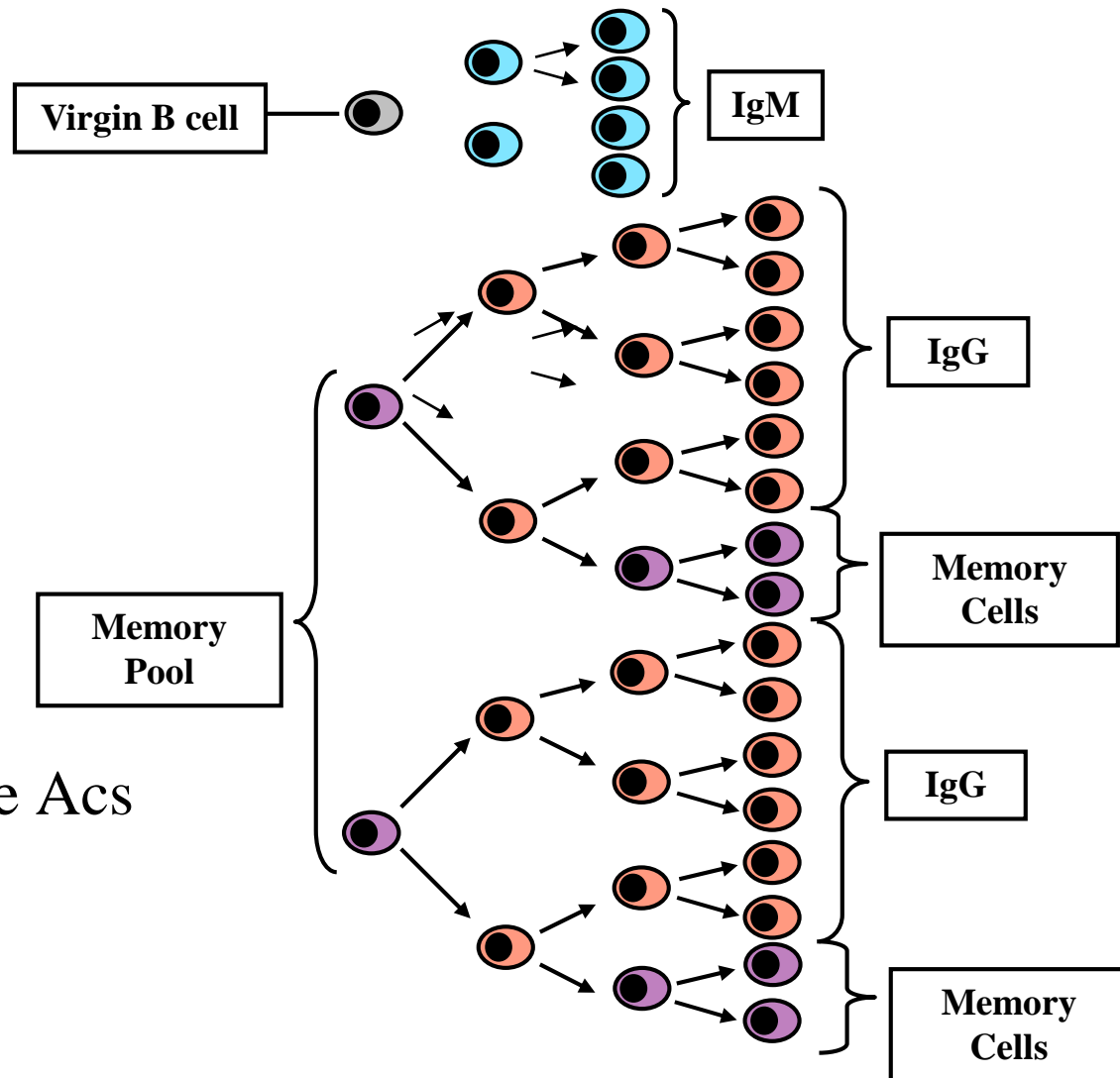
Eventos Celulares na RIH Primária aos Ags T-dependentes

- Lag
 - Clonal selection
- Log
 - IgM
 - Class switching
- Stationary
- Decline
- Memory Cell Pool



Eventos Celulares na RIH Secundária aos Ags T-dependentes

- Fase Refratária
 - Cels. Naïve (Virgem)
 - Cels. Memória
- Fase Logaritmica
 - Aumento do nº Linfs.
 - IgG, IgA ou IgE
- Fase Estacionária
- Fase de Declínio
 - Produção Sustentada de Acs



Memória

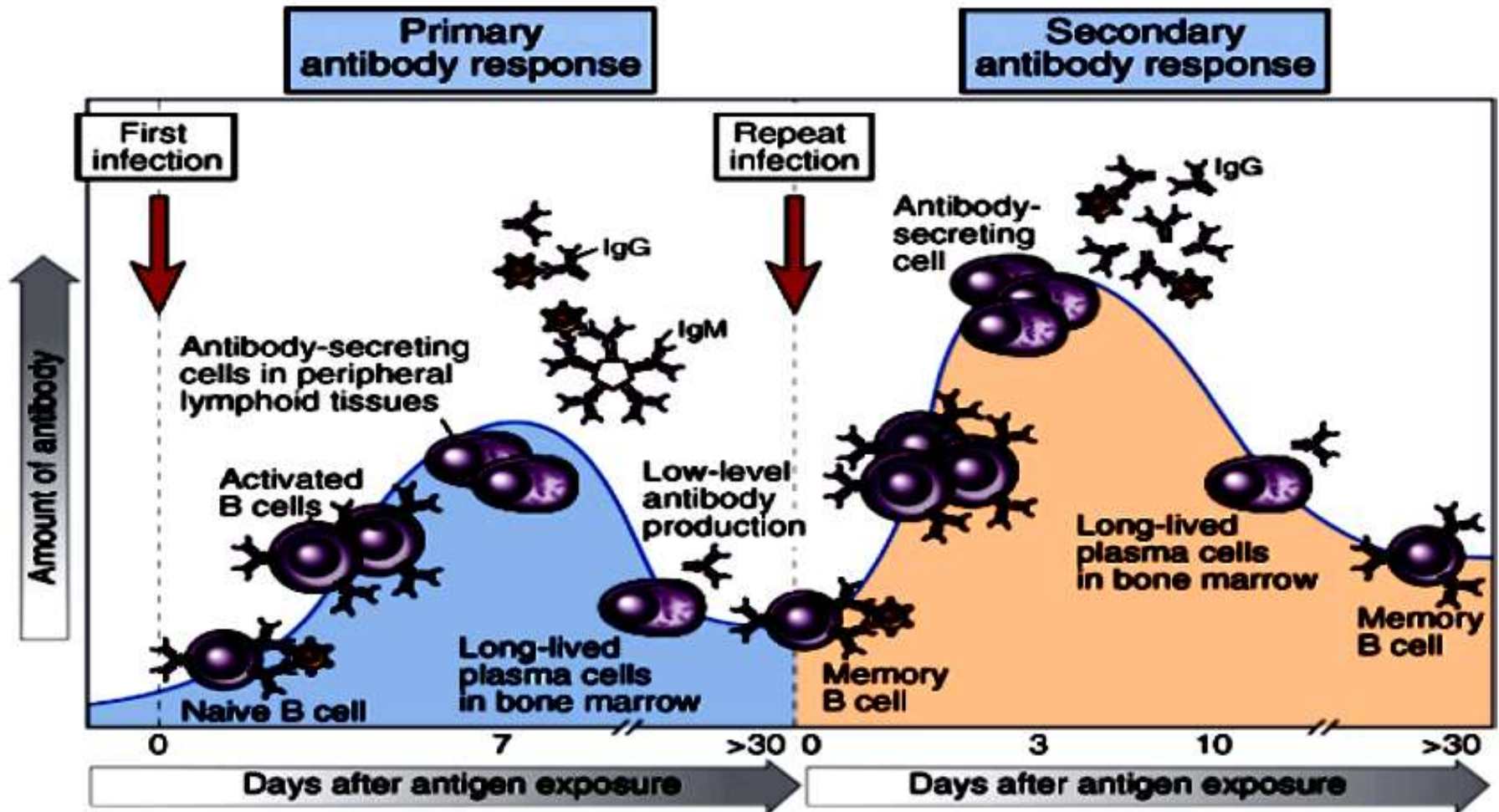
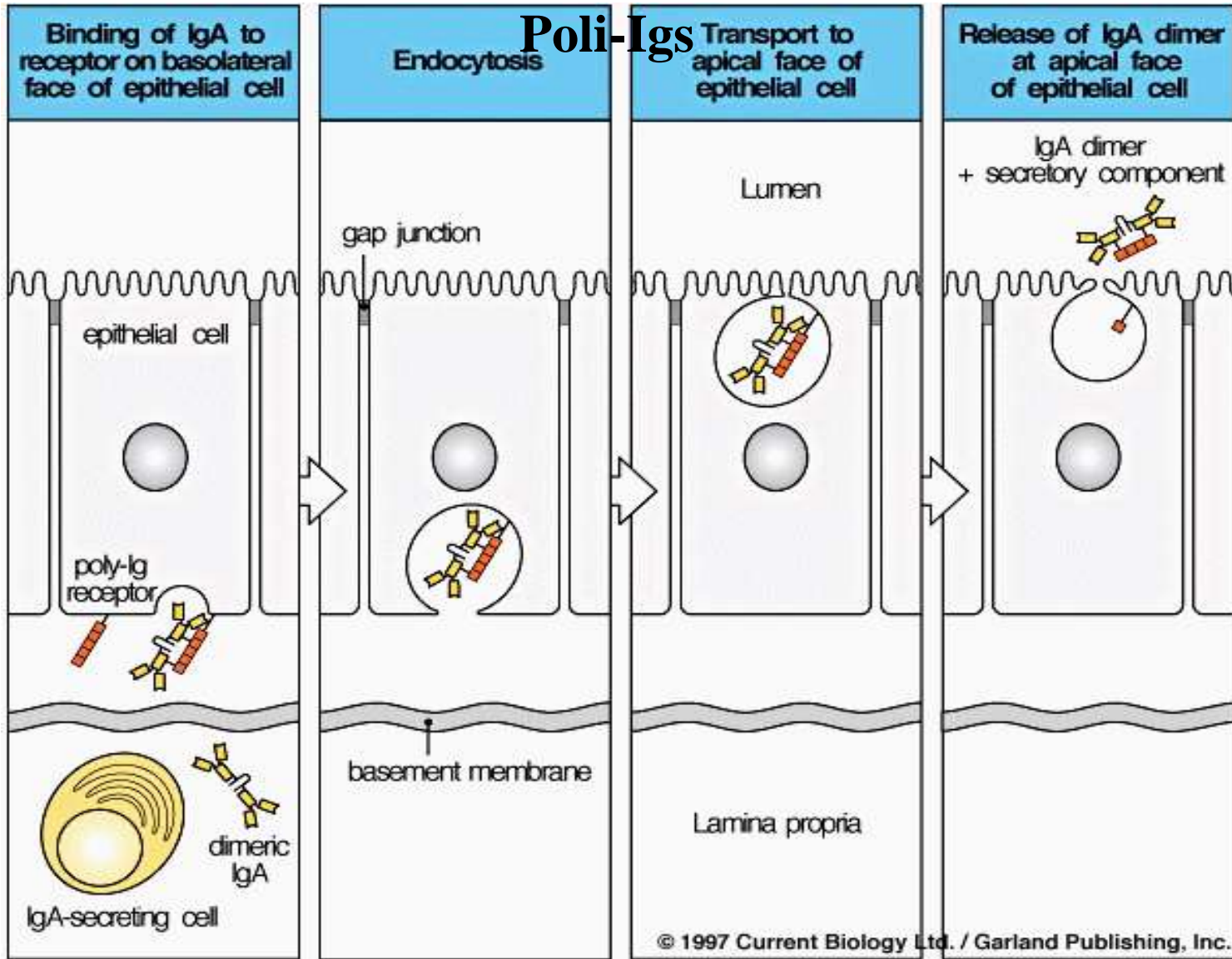


Fig. 11 – A Transcitose de Acs nas Cels Epitelais da Mucosa do Intestino do Isótipo IgA de Acs é Mediada por um Receptor de Poli-Igs



PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN CLASSES.

Class	Heavy Chain Designation	Number of Sub-classes	Mean Serum Concentration <i>mg/dl</i>	Molecular Weight <i>daltons</i>	Mean Survival <i>days</i>	Biologic Activity
IgG	γ	4	1250	150,000	23	<ol style="list-style-type: none"> 1. Opsonin 2. Fix complement 3. Crosses placenta
IgM	μ	1	120	890,000	5	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fix complement 2. Agglutination 3. Antigen receptor
IgA	α	2	280	170,000	6	<ol style="list-style-type: none"> 1. Secretory antibody 2. Agglutination
IgD	δ	2	3	160,000	3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Antigen receptor
IgE	ϵ	1	0.03	196,000	2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anti-parasite antibody 2. Allergy antibody

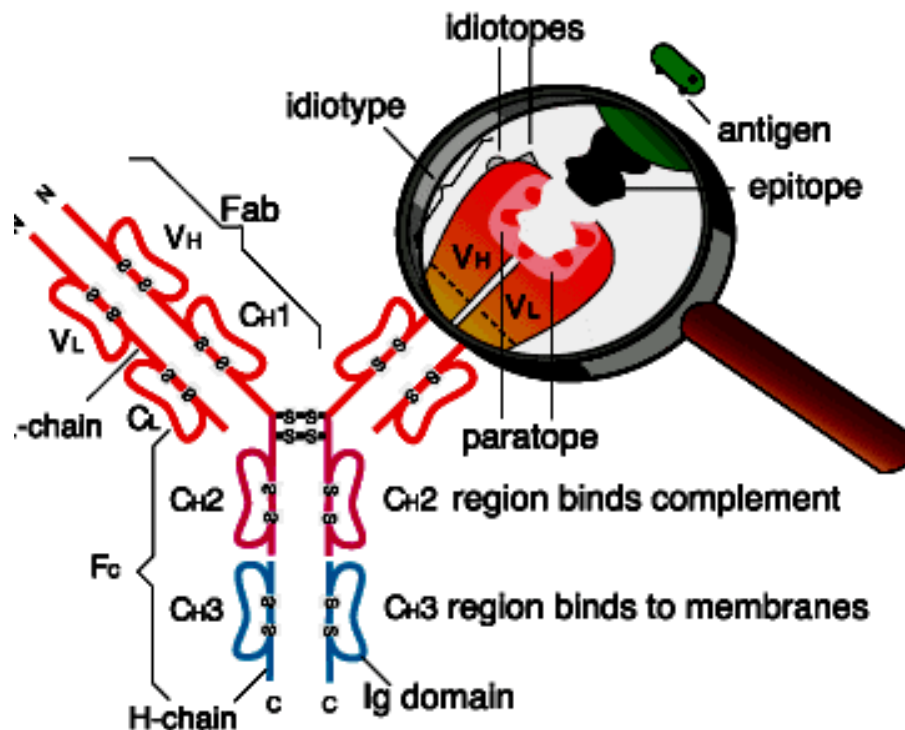
Bases da Especificidade do Sítio Combinatório dos Anticorpos



A superfície do sítio combinatório do Ac, especialmente ao nível das CDRs de VH e de VL são as partes mais importantes para conferir especificidade na interação específica com cada epítopo de um Ag

- A forma e as cargas elétricas das CDRs de VH e de VL que constituem o sítio combinatório de um dado Ac determinam qual o epítopo que será ligado pelo mesmo.
- A forma e as cargas elétricas dependem das sequências de Aminoácidos que compõem cada CDR.
- Haptenos se combinam com sítios combinatórios com a forma de fendas ou depressões.
- Pequenos Peptídeos se combinam com sítios combinatórios com a forma de ranhuras.
- Proteínas / Polissacarídeos grandes se combinam com uma ampla área do sítio combinatório

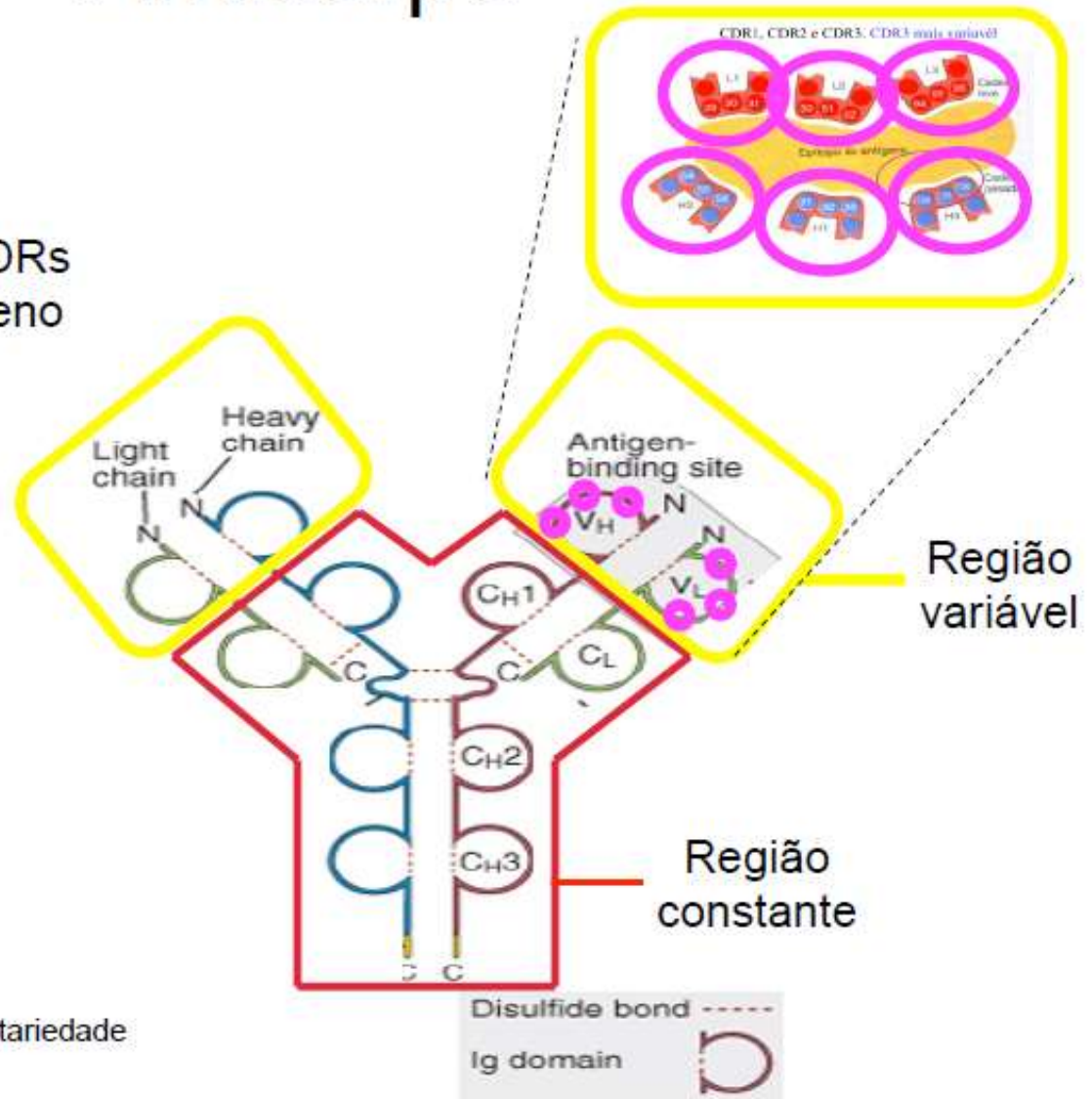
- Nos domínios variáveis da cadeia leve e da pesada existem 3 regiões hipervariáveis (HV), que formam as regiões determinantes de complementariedade (CDR ou RDC) e são apresentados na superfície de uma molécula de anticorpo.
- Estas CDR formam a superfície de ligação para o antígeno.
- As CDR são ladeadas por seqüências de amino ácidos mais conservados, chamadas de regiões “Framework”, responsáveis pela estabilidade estrutural do domínio de ligação do antígeno



Anticorpo

OBS

- Região constante
- Região variável
- 3 Regiões hipervariáveis CDRs
- 2 Sítios de ligação de antígeno



CDR: região determinante de complementariedade

Fig. 5 – A estrutura e Composição das Regiões Constantes e Variáveis de Imunoglobulinas

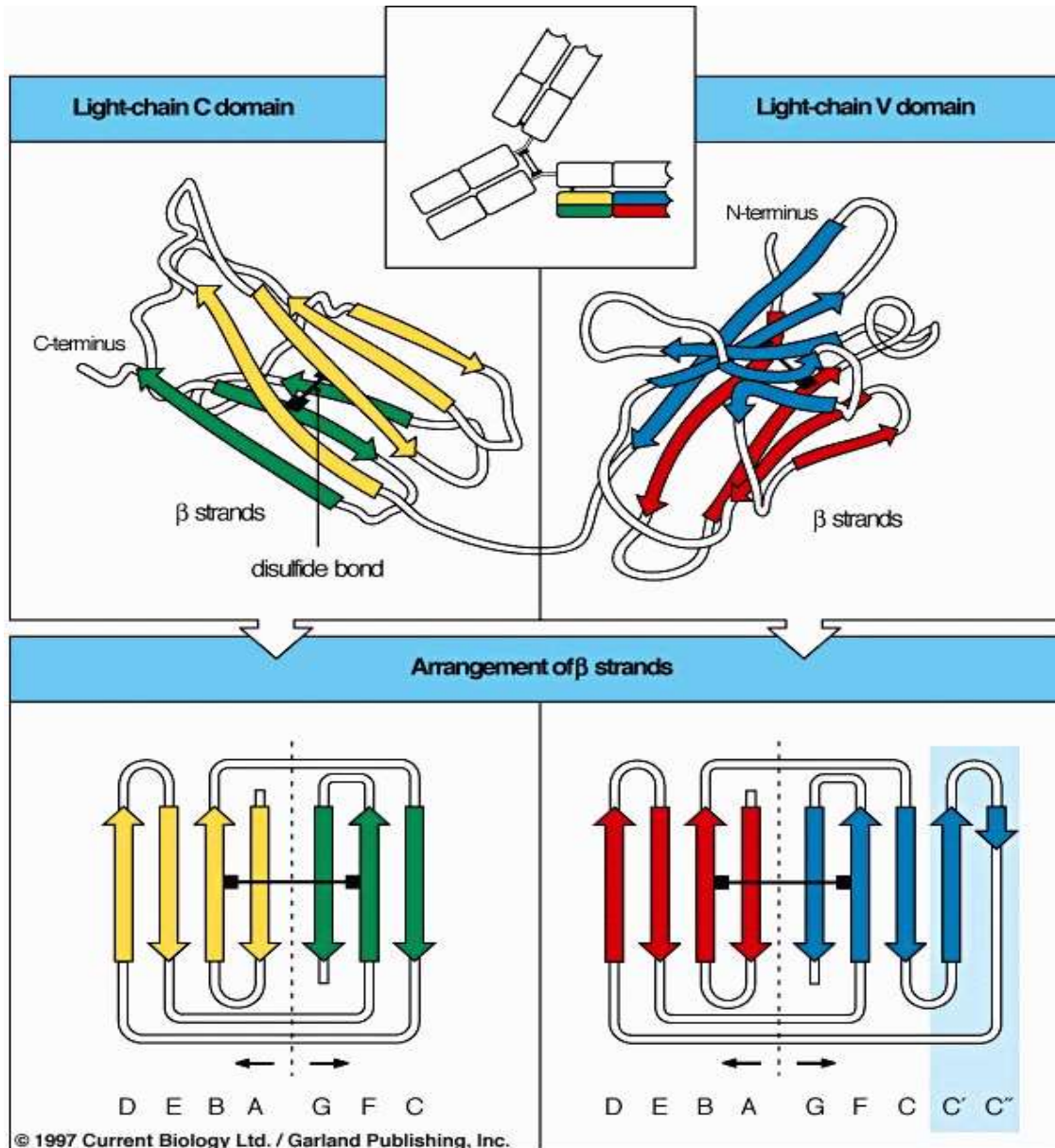


Fig. 6 – A composição e a estrutura das regiões V de cadeia L e H e a presença de regiões hipervariáveis nos sítios combinatórios dos anticorpos

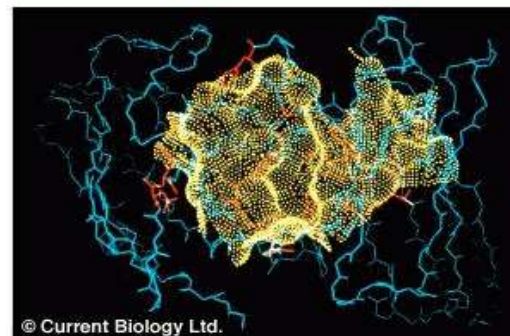
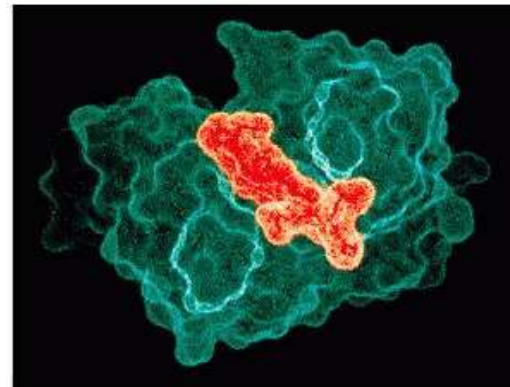
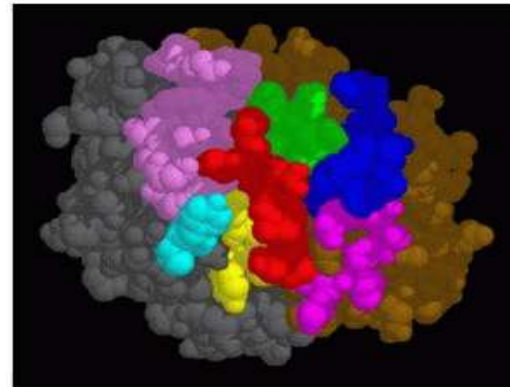
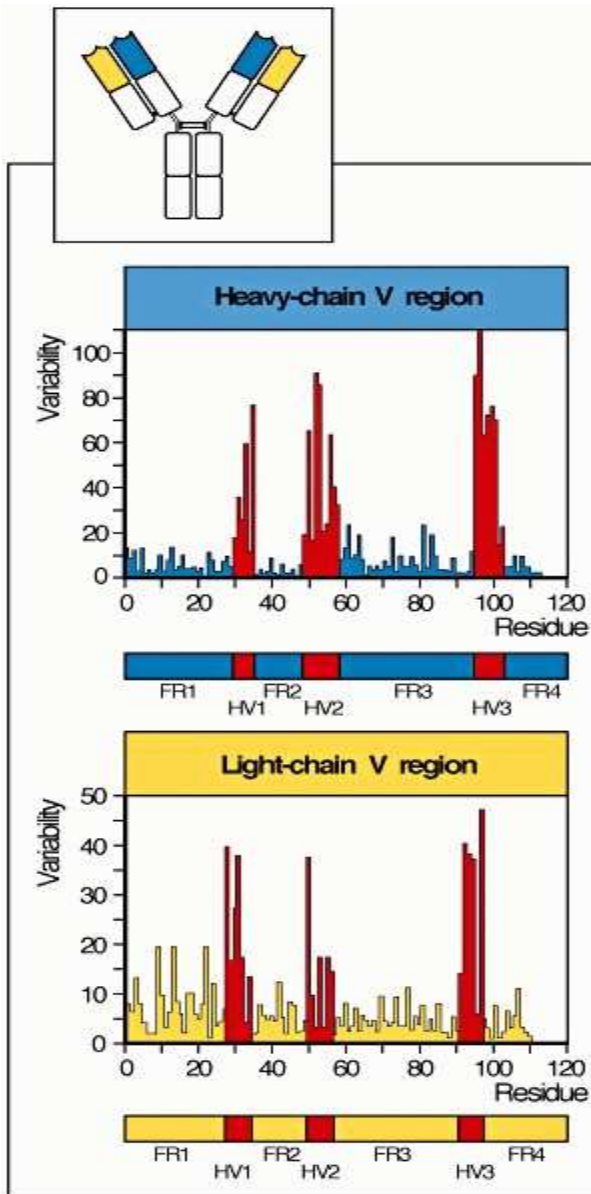


Fig. 7 – As regiões hipervariáveis (CDR's) constituem alças que se projetam na estrutura do sítio combinatório das Igs

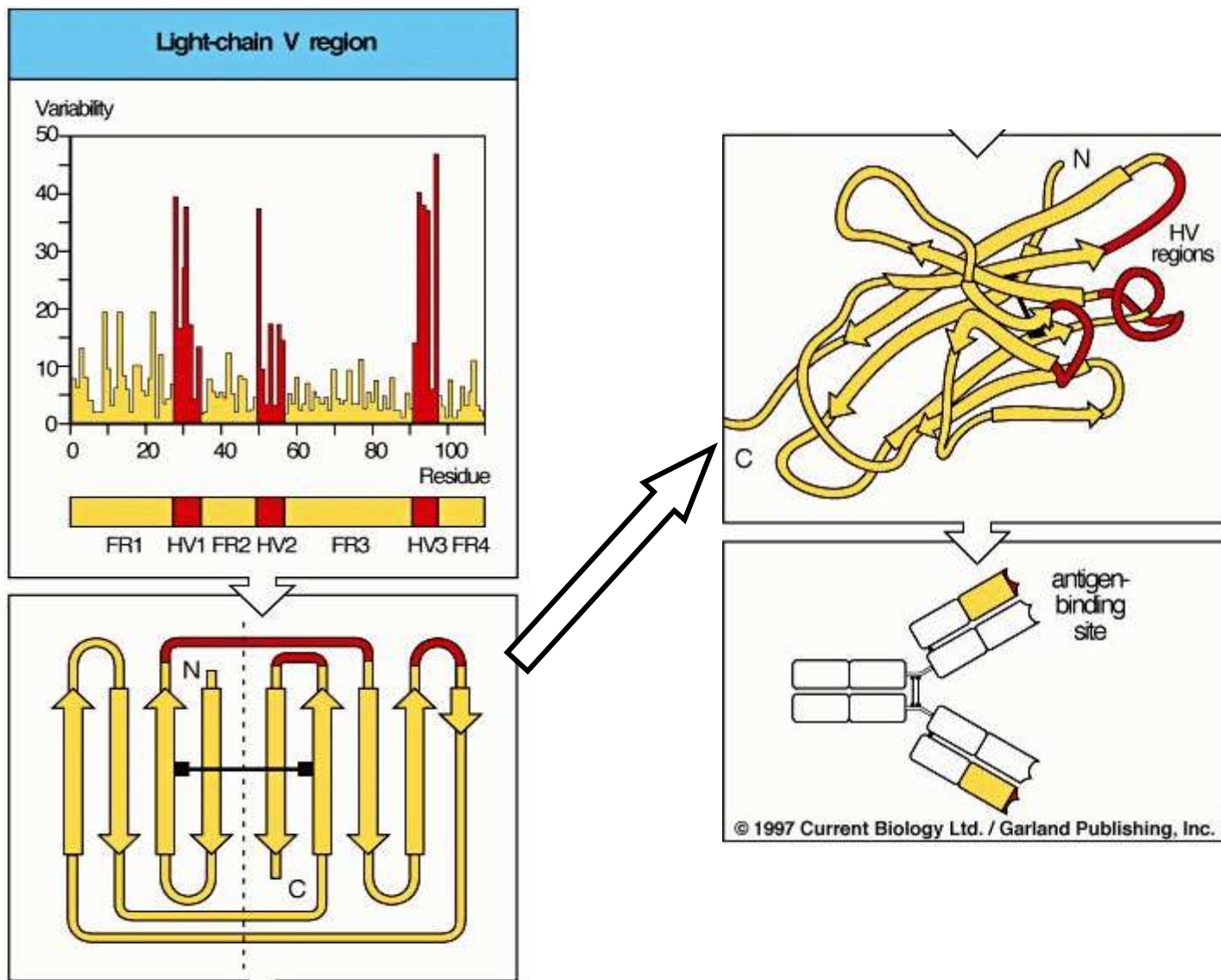
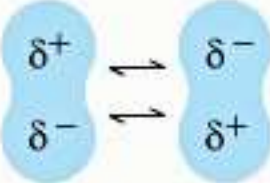
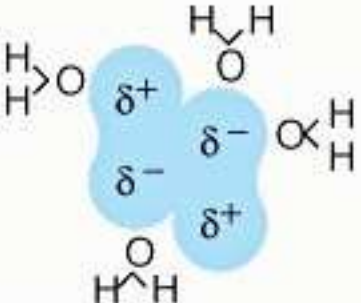


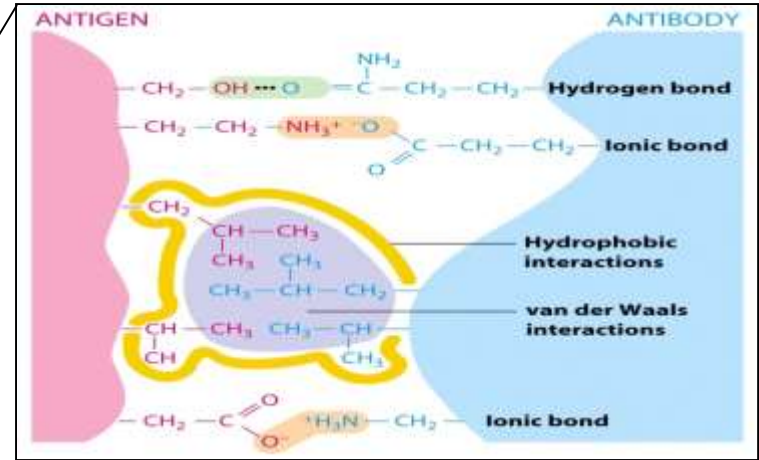
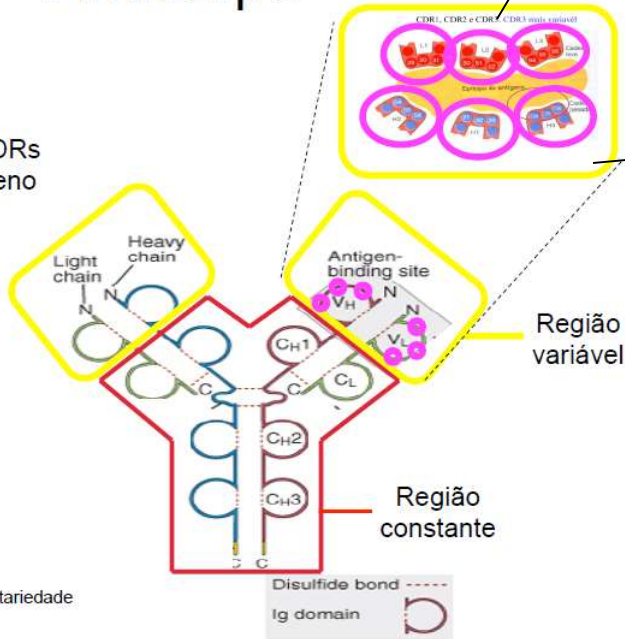
Fig. 8 – As Forças não covalentes que mantêm A_g-A_cs ligados

Non-covalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	$-\overset{\oplus}{\text{N}}\text{H}_3 \quad \overset{\ominus}{\text{O}}\text{OC}-$
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	$\begin{array}{c} \diagup \text{N} - \text{H} - - \text{O} = \text{C} \diagdown \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	

OBS

Anticorpo

- Região constante
- Região variável
- 3 Regiões hipervariáveis CDRs
- 2 Sítios de ligação de antígeno

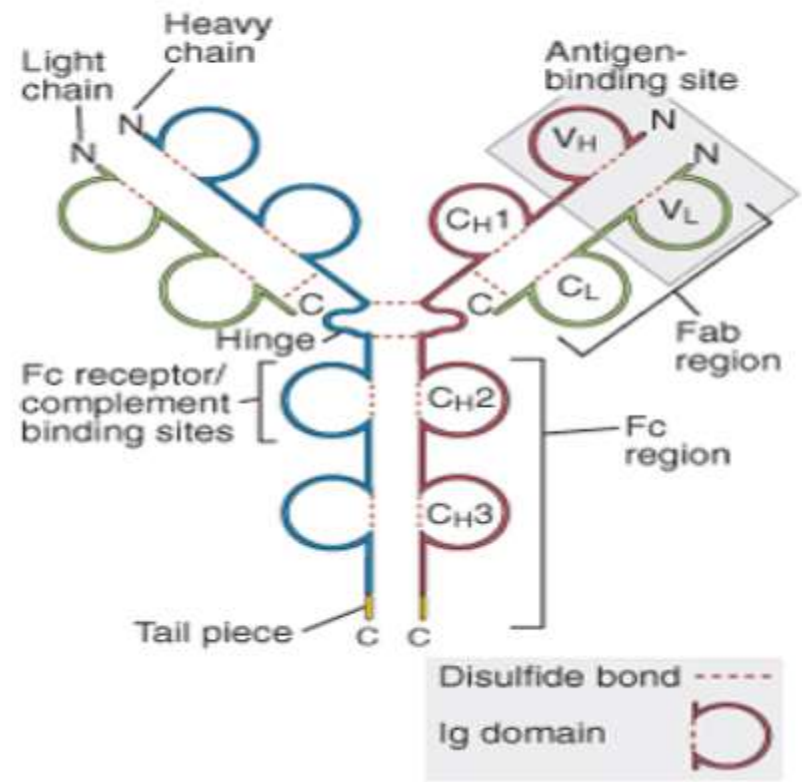


CDR: região determinante de complementariedade

Sumário sobre a estrutura básica dos Acs

Anticorpo

- 2 Cadeias pesadas
- 2 Cadeias leves
- 2 Regiões Fab
- 1 Região Fc
 - Região constante
 - Região variável
- 3 Regiões hipervariáveis CDRs
- 2 Sítios de ligação de antígeno
- Sítios de ligação para complemento
- Glicolipídios



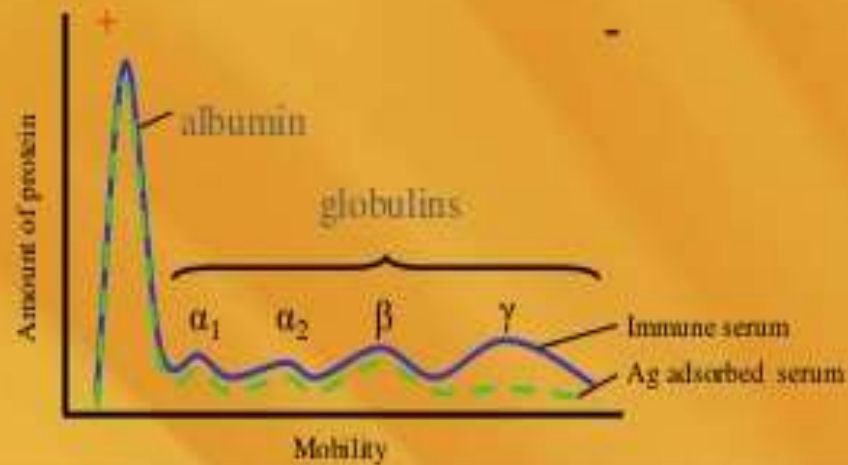
Recapitulando ...!!!

Função dos isotipos de imunoglobulinas

Isotipo	Concentração (mg/mL)	Média de sobrevivência (dias)	Atividade biológica
IgG	1250	23	<ul style="list-style-type: none">• Oponização - macrófagos e neutrófilos• ADCC - NK e macrófagos• Ativação via clássica do complemento• Imunidade neonatal
IgM	120	5	<ul style="list-style-type: none">• Ativação via clássica do complemento• Receptor de antígenos de célula B <i>naive</i>
IgA	280	6	<ul style="list-style-type: none">• Imunidade de mucosa• Imunidade neonatal
IgD	3	3	<ul style="list-style-type: none">• Receptor de antígeno de célula B <i>naive</i>
IgE	0,03	2	<ul style="list-style-type: none">• ADCC - eosinófilos• Eliminação de helmintos• Hipersensibilidade - alergias

Immunoglobulins: Structure and Function

- Definition: Glycoprotein molecules that are produced by plasma cells in response to an immunogen and which function as antibodies



Variabilidade da estrutura de Imunoglobulina

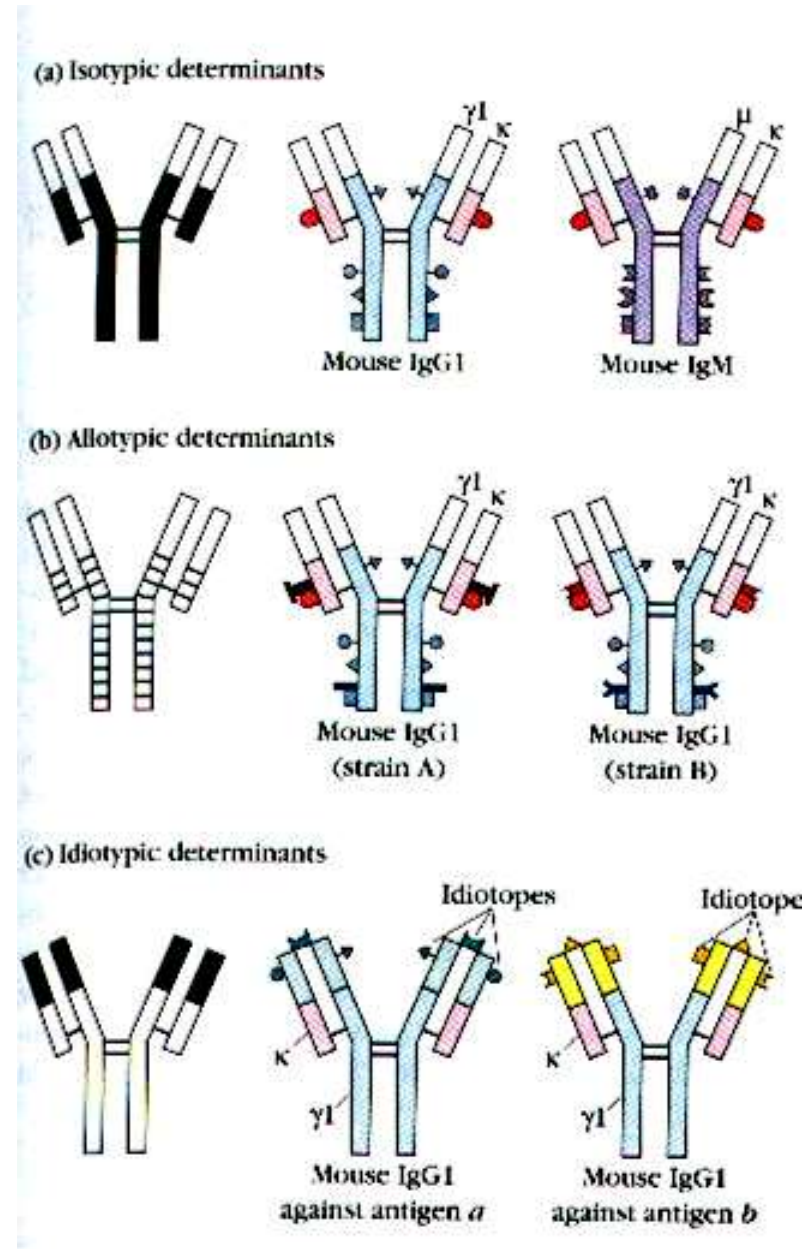
1 – Isótipo

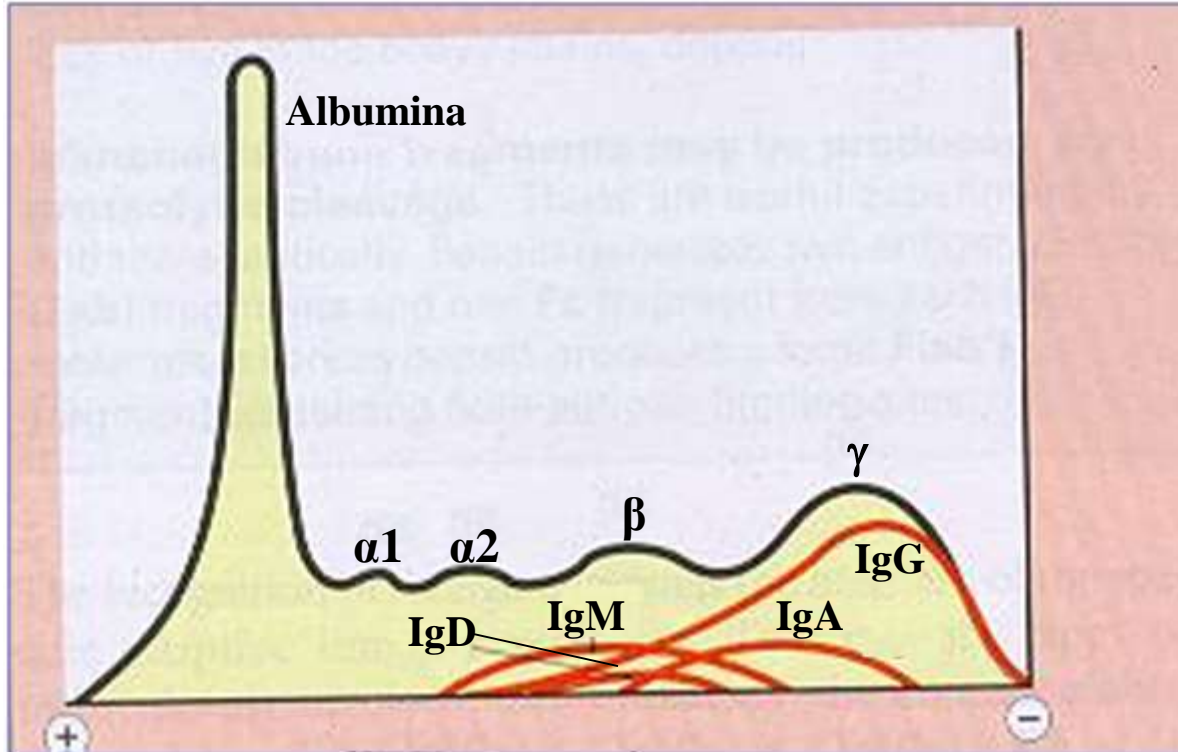
Cadeias pesadas: α , δ , ϵ , γ , μ

Cadeias leves: λ e κ

2 – **Alótipo**: variabilidade alélica intra-espécie.

3 – **Idiotipo**: variabilidade nas regiões hipervariáveis.

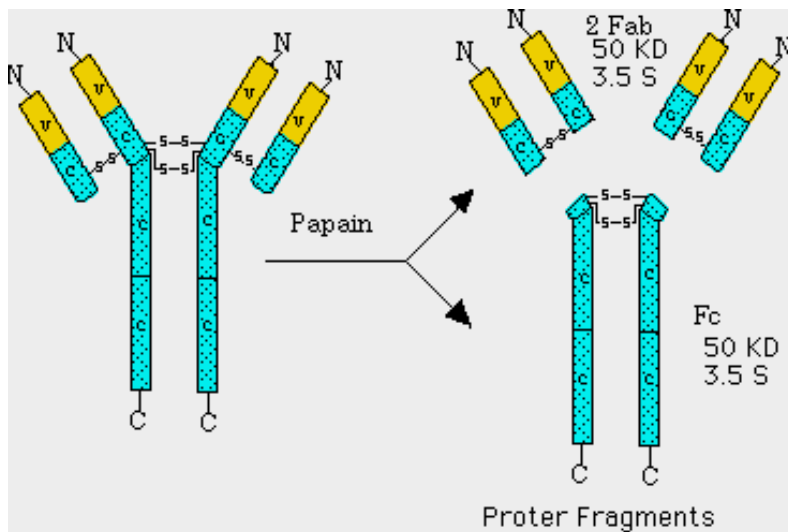
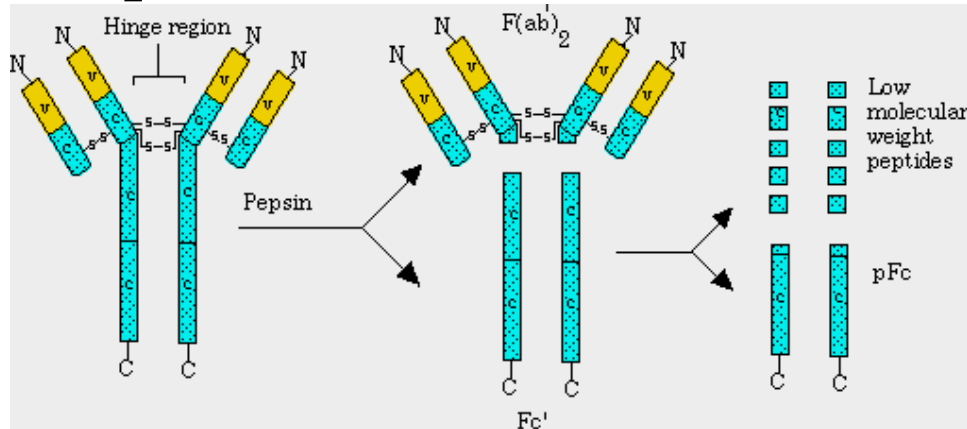




Separação por eletroforese em gel de agarose das principais frações de proteínas do soro sanguíneo, com destaque para as frações que contêm os principais isótipos de anticorpos (IgG, IgA, IgM e IgD). *Obs.- A IgE não é detectada por essa técnica de eletroforese por se encontrar em concentrações muito baixas no soro sanguíneo.

Muitos pesquisadores trabalharam durante uma década para o estabelecimento da estrutura básica de IgG. Dois processos foram usados:

Digestão enzimática parcial



Redução das pontes dissulfeto inter-cadeias

