

# Capítulo 1

## **Imunologia**

Antônio Teva  
José Carlos Couto Fernandez  
Valmir Laurentino Silva

### **1. Introdução à Imunologia**

A imunologia é uma ciência recente. Sua origem é atribuída, por alguns autores, a Edward Jenner, que, em 1796, verificou proteção induzida pelo *cowpox* (vírus da varíola bovina) contra a varíola humana, nomeando tal processo da vacinação. No entanto, é sabido que, na antiguidade, os chineses já inalavam o pó das crostas secas das pústulas de varíola ou as inseriam em pequenos cortes na pele, em busca de proteção.

O sistema imune é o conjunto de células, tecidos, órgãos e moléculas que os humanos e outros seres vivos usam para a eliminação de agentes ou moléculas estranhas, inclusive o câncer, com a finalidade de se manter a homeostasia do organismo. Os mecanismos fisiológicos do sistema imune consistem numa resposta coordenada dessas células e moléculas diante dos organismos infecciosos e dos demais ativadores, o que leva ao aparecimento de respostas específicas e seletivas, inclusive com memória imunitária, que também

pode ser criada artificialmente, através das vacinas. Na ausência de um sistema imune funcional, infecções leves podem sobrepujar o hospedeiro e levá-lo à morte. Porém, mesmo com um sistema imune funcional, o homem, por exemplo, pode adquirir uma doença infecciosa ou um câncer, pois a resposta imune específica, diante de um agente agressor, leva tempo para se desenvolver e, além disso, tanto organismos estranhos, como células neoplásicas, desenvolvem mecanismos de evasão para fugir da resposta imune.

Neste capítulo, serão abordados conceitos básicos dos principais componentes do sistema imune, os mecanismos de resposta específica ante os diversos agentes infectoparasitários, como também a investigação dos vestígios da passagem desses agentes, por meio de métodos laboratoriais para pesquisa de antígenos e anticorpos específicos, principal propósito desse texto, uma vez que se destina a alunos de escolas técnicas de nível médio.

## **2. Órgãos, tecidos e células envolvidos na resposta imunitária**

### **2.1. Células que participam do sistema imunitário**

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e por moléculas que estas células expressam (Figura 1). Os **leucócitos** são as células que desempenham as principais ações, mas outras células, que se encontram nos tecidos, também participam da resposta imunitária, enviando sinais e recebendo estímulos dos leucócitos. As células que participam do sistema imunitário se originam na medula óssea, onde muitas evoluem para a fase adulta. A partir da medula, e por meio de vasos sanguíneos, elas migram junto com todos os elementos celulares do sangue. Inclusive as hemácias, que transportam o oxigênio, e as plaquetas que participam da coagulação, uma vez que estes elementos se originam das células-tronco progenitoras da medula. As células que derivam do progenitor mieloide e do progenitor linfoide são as que mais

interessam para o entendimento das ações do sistema imunitário, de modo que, neste texto, não serão considerados os megacariócitos e os eritrócitos.

O progenitor mielóide é o precursor dos granulócitos, fagócitos mononucleares (macrófagos), células dendríticas e mastócitos do sistema imune. Os **macrófagos** são as células fagocitárias mais relevantes. Estas células são a forma diferenciada dos monócitos sanguíneos, que se encontram estrategicamente distribuídos em vários tecidos para dar origem ao **sistema fagocitário mononuclear**. Os microgliócitos são os macrófagos do cérebro, as células de Kupffer são os macrófagos do fígado, os macrófagos alveolares fazem parte do tecido pulmonar, entre outros macrófagos residentes em diferentes tecidos. As funções dos macrófagos se caracterizam pela neutralização, ingestão e destruição de partículas, incluindo os biopatógenos, além de processar e apresentar antígenos para os linfócitos T. Neste contexto, são as **células dendríticas** as mais especializadas na captura e na apresentação de antígenos para os linfócitos T. As células dendríticas imaturas migram do sangue para residirem nos tecidos e realizam tanto a fagocitose quanto a micropinocitose. Após o encontro com um patógeno, maturam rapidamente e migram para os nódulos linfáticos, onde encontram o ambiente adequado para a apresentação de antígenos.

Os **granulócitos** recebem essa denominação por possuírem grânulos em seu citoplasma que se coram densamente por corantes hematológicos tradicionais. São também chamados de **leucócitos polimorfonucleares**, devido às formas de seus núcleos. Existem três tipos de granulócitos, sendo eles os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos; todos com um tempo de vida relativamente curto e produzidos em grande número durante as respostas inflamatórias.

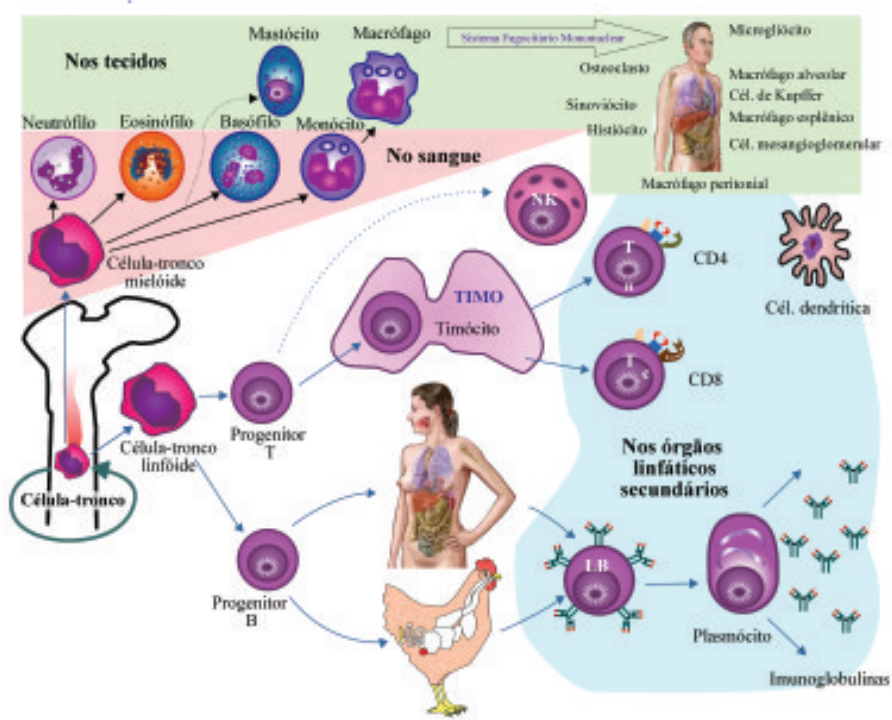
Os **neutrófilos**, assim como os macrófagos e as células dendríticas, são representantes do grupo de células fagocitárias do sistema imunitário, mas, diferentemente destas células, não apresentam antígenos para os linfócitos T. Os neutrófilos são os elementos celulares mais numerosos e importantes da resposta inata.

Os **eosinófilos** parecem ser importantes, principalmente na resposta diante de infecções parasitárias ou processos alérgicos, já que seu número aumenta no curso destas reações.

A função dos **basófilos** provavelmente é similar e complementar à dos eosinófilos e mastócitos.

Os **mastócitos**, cujo precursor parece ser comum aos basófilos, devido a semelhanças funcionais, também se diferenciam ao chegar aos tecidos onde residem. Eles se localizam principalmente à margem dos vasos sanguíneos e liberam mediadores que agem nas paredes vasculares quando ativados.

Figura 1. Células que participam do sistema inunitário



O progenitor linfoide comum dá origem aos linfócitos. Os **linfócitos** são as células que reconhecem, especificamente, os antígenos. Sua morfologia típica consiste em uma pequena célula redonda com núcleo esférico. Apesar da aparência uniforme à microscopia ótica, vários tipos de linfócitos podem ser distinguidos com base nas suas propriedades funcionais e proteínas específicas que expressam. A distinção mais fundamental consiste na classificação destas células em duas linhagens principais, conhecidas como linfócitos B e linfócitos T.

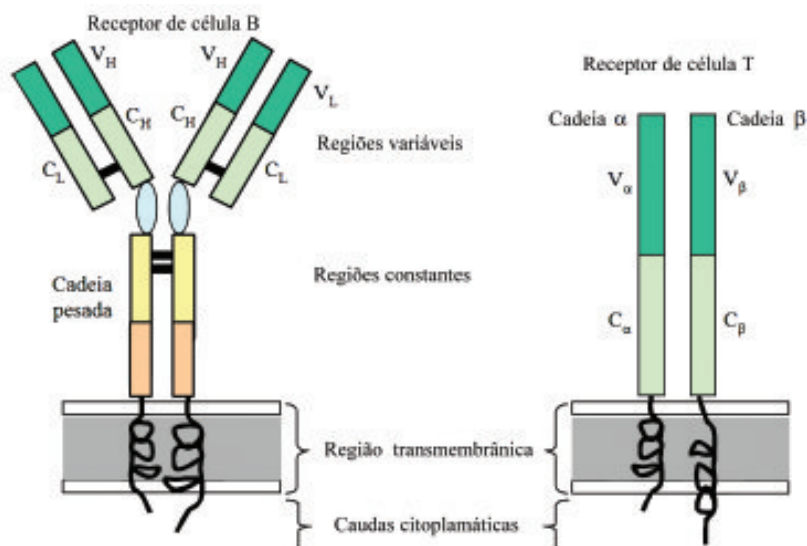
Os **linfócitos B**, também chamados de células B (de bursa ou bolsa de Fabricius, nas aves, e derivadas da medula óssea, nos mamíferos), quando ativadas, proliferam e se diferenciam em células plasmáticas ou **plasmócitos**, que são as células efectoras da linhagem B, cuja função principal é a secreção de anticorpos. Os **linfócitos T**, ou células T (derivados do timo), se apresentam em duas classes principais. Uma se diferencia, quando ativada, em **células T CD8+** ou **citotóxicas**, que matam as células infectadas, ao passo que a outra classe de células T, chamadas de **células T CD4+** ou **auxiliares**, atuam na ativação de outras células, como os linfócitos B e os macrófagos, além de coordenar a resposta imunitária.

O **receptor de antígeno da célula B** (BCR) (Figura 2) é uma forma de anticorpo ligada à membrana que a célula B passa a produzir, após sua ativação e diferenciação em célula plasmática. Os **anticorpos** são moléculas agrupadas em uma classe de substâncias denominadas **imunoglobulinas**, e o receptor de antígeno do linfócito B é também conhecido como **imunoglobulina de membrana**. A **imunidade humoral** é a principal função das células B e dos plasmócitos, e consiste em secretar anticorpos no sangue e em outros líquidos orgânicos, resultando efeitos protetores, mediados por líquidos teciduais.

O **receptor de antígeno da célula T** (TCR) (Figura 2) constitui uma classe heterogênea de proteínas de membrana que, embora estejam relacionadas evolutivamente com as imunoglobulinas, são diferentes delas, já que estão

adaptadas para detectar antígenos derivados de proteínas estranhas ou patógenos que entram nas células hospedeiras. Todavia, em contraste com as imunoglobulinas, os TCRs nunca são secretados, de modo que a célula T precisa migrar até as áreas de lesão para exercer seus efeitos protetores, por meio de contato direto com a célula alvo ou para influenciar as atividades de outras células do sistema imunitário. Juntamente com os macrófagos, as células T desenvolvem uma categoria de resposta imune denominada **imunidade mediada por células**.

Figura 2. Estruturas básicas do receptor de superfície da célula B e do receptor T.



A maioria dos linfócitos virgens possui uma sobrevivência muito curta, sendo programada para morrer em poucos dias após ter saído da medula óssea ou do timo. No entanto, se uma dessas células receber sinais indicando a presença de um imunógeno (antígeno que estimula uma resposta imune específica), ela poderá responder por meio de um fenômeno conhecido como **ativação**, durante o qual pode sofrer vários ciclos de divisão celular.

Algumas das células-filhas retomam ao estado de repouso, tornando-se **células de memória**, que podem sobreviver por vários anos. Estes linfócitos de memória representam uma grande proporção das células do sistema imunitário. A outra progênie do linfócito virgem ativado diferencia-se em **células efetoras**, que sobrevivem apenas alguns dias, mas que, durante este período, executam atividade que resultam em defesa.

Outra classe de células linfoides, chamada de **células matadoras naturais** ou células *natural killer* (NK), é desprovida de receptores antígeno-específicos, sendo parte do sistema imune inato. Essas células circulam no sangue como grandes linfócitos, com diferentes grânulos citotóxicos, e são capazes de reconhecer e matar algumas células anormais, tais como células tumorais e células infectadas por vírus. E parecem ser importantes na defesa contra biopatógenos intracelulares na imunidade inata.

## 2.2. Os órgãos linfoides e a rede linfática

Os **órgãos linfoides** (Figura 3) são tecidos organizados que contêm grandes quantidades de linfócitos em um ambiente de células não linfoides. Nesses órgãos, as interações que os linfócitos têm com as células não linfoides são importantes, tanto para o desenvolvimento dos linfócitos e o início da resposta imune adaptativa, como para a manutenção dos mesmos. Tais órgãos podem ser divididos em **órgãos linfoides centrais** ou **primários**, produtores de linfócitos, e **órgãos linfoides periféricos** ou **secundários**, que desempenham a função de maximizar o encontro entre os linfócitos e os produtos processados pelas células apresentadoras de antígenos, dando início à resposta imune. Os órgãos linfoides centrais são a **medula óssea vermelha** e o **timo**, um grande órgão localizado na porção superior do tórax. Tanto os linfócitos B como as células T surgem na medula óssea, mas apenas os linfócitos B ali se diferenciam. Os linfócitos T migram para o timo para sofrer seu processo de diferenciação. Uma vez completada sua maturação

celular, os dois tipos de linfócitos entram na corrente sanguínea, migrando para os órgãos linfoides periféricos. Durante a vida intrauterina, o **fígado fetal** desempenha o papel que a medula óssea vermelha passa a desenvolver plenamente após o nascimento.

Os órgãos linfoides periféricos são especializados na captura do antígeno para possibilitar o início das respostas imunes adaptativas. Os microrganismos patogênicos podem penetrar no hospedeiro por muitas portas de entrada, instalando o processo infeccioso em qualquer sítio, mas o encontro do antígeno com os linfócitos acontecerá nos órgãos linfoides periféricos: os nódulos linfáticos, o baço e vários tecidos linfoides associados às superfícies das mucosas. Os linfócitos estão em contínua recirculação entre esses tecidos, para os quais o antígeno também é carregado, vindo de todos os locais de infecção, primariamente dentro de macrófagos e células dendríticas. Dentro dos órgãos linfoides, células especializadas, como as células dendríticas maduras, apresentam o antígeno para os linfócitos.

A **rede linfática** consiste em um extenso sistema de vasos que coletam o líquido intersticial, fazendo-o retornar para o sangue. Esse líquido intersticial é produzido continuamente pela passagem de água e solutos de baixo peso molecular através das paredes vasculares que penetram no espaço intersticial, pela secreção celular e outros fatores de excreção. Ao ser parcialmente drenado para os vasos linfáticos, passa a ser chamado de linfa. A linfa flui lentamente pelos vasos linfáticos primários, deságua em vasos linfáticos de calibre progressivamente maior, que convergem para o ducto torácico, e desemboca na veia cava superior, que, por sua vez, devolve todo o volume para a corrente sanguínea, num fenômeno denominado **recirculação**.

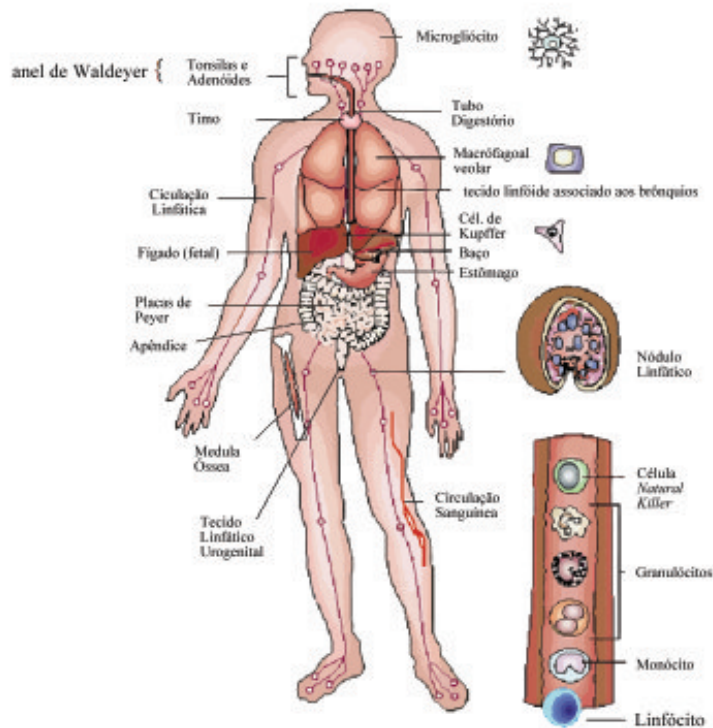
Localizados em pontos de convergência da rede vascular, os **nódulos linfáticos** constituem uma série de órgãos encapsulados em forma de “caroço de feijão”, que se distribuem ao longo dos vasos linfáticos. Os



vasos linfáticos aferentes drenam o fluido dos tecidos e carregam antígenos e células infectadas aos seios dos nódulos linfáticos, onde os antígenos são capturados. Os **seios** são revestidos por orifícios minúsculos, que permitem a linfa e seu conteúdo atravessarem o nódulo linfático e entrarem em contato com os linfócitos. Nos nódulos linfáticos, os linfócitos B se localizam em folículos nas áreas corticais, também denominadas **áreas timo-independentes**; as células T são mais difusamente distribuídas em torno das áreas paracorticais, também conhecidas como zonas de células T ou **áreas timo-dependentes**. Alguns dos folículos de células B contêm áreas centrais, denominadas centros germinativos, onde ocorre intensa proliferação dos linfócitos B, após seu encontro com o antígeno específico e células T auxiliares. Por fim, a linfa sai por um vaso linfático eferente no lado oposto do nódulo linfático, numa região conhecida como hilo.

○ **baço** encontra-se situado atrás do estômago e filtra o sangue da mesma forma como os nódulos linfáticos filtram a linfa e coletam antígenos. Também captura e se desfaz de células vermelhas senescentes. A massa principal deste órgão é composta pela polpa vermelha e os linfócitos circundam as arteríolas que o penetram, formando áreas da polpa branca, cuja região mais interna é dividida em uma camada linfoide periarteriolar, contendo principalmente células T e revestidas por uma coroa de células B.

Figura 3. Órgãos, tecidos e células envolvidos na resposta imunitária.



### 2.3. Tecido linfóide associado à mucosa

A expressão **tecido linfóide associado à mucosa** (MALT = *mucosal-associated lymphoid tissue*) é uma descrição geral para os tecidos linfóides não encapsulados, que existem nas regiões subjacentes às mucosas. Os MALTs se distribuem anatomicamente e seus componentes individuais incluem:

- **Anel de Waldeyer** - Anel de estruturas linfóides que circunda a faringe. É formado pelas **tonsilas e adenóides**.
- **Tecido linfóide associado aos brônquios** (BALT = *bronchial-associated lymphoid tissue*) - Agregados linfocitários semelhantes, mas organizados difusamente, que protegem o epitélio respiratório.

- **Tecidos linfoides associados ao intestino** (GALT = *gut-associated lymphoid tissues*) - Incluem **folículos linfoides isolados** e o **apêndice cecal**, além de estruturas especializadas do intestino delgado, as **placas de Peyer**.
- **Tecido linfático urogenital**
- **Entre outros MALTs** (Figura 3).

Coletivamente, estima-se que o sistema imune de mucosa contenha tantos linfócitos quanto o resto do corpo. Esses linfócitos formam um grupo especial de células que seguem leis um tanto diferentes. Embora notavelmente diferentes em sua aparência, os nódulos linfáticos, o baço e os tecidos linfoides associados à mucosa demonstram a mesma arquitetura básica. Cada um deles opera segundo o mesmo princípio, capturando o antígeno nos locais de infecção e apresentando-o a pequenos linfócitos migratórios para, assim, induzirem as respostas imunes adaptativas. Os tecidos linfoides periféricos também proveem sinais de sobrevivência aos linfócitos que não encontram seu antígeno específico. Isto é importante para manter o número correto de linfócitos T e B circulantes, e assegura que somente os linfócitos com o potencial de responder ao antígeno estranho sejam mantidos.

#### 2.4. Recirculação de linfócitos

Os pequenos linfócitos T e B que se diferenciaram na medula óssea e no timo, mas que ainda não se encontraram com o antígeno, são referidos como **linfócitos virgens** ou em repouso. Estes elementos circulam continuamente do sangue para os tecidos linfoides periféricos, nos quais penetram por meio de interações adesivas especiais com os capilares e retornam para o sangue através dos vasos linfáticos ou, no caso do baço, diretamente ao sangue. Na presença de uma infecção, os linfócitos que reconhecem o agente infeccioso são retidos no tecido linfoide, onde proliferam e se diferenciam em **células efectoras**, capazes de controlar a infecção.

Quando ocorre uma infecção tecidual, os antígenos são capturados por células dendríticas, que se deslocam do sítio da infecção pelos vasos linfáticos aferentes para os nódulos linfáticos. Nos nódulos linfáticos, essas células processam e apresentam o antígeno aos linfócitos T que estão recirculando, os quais elas ajudam a ativar. As células B que encontram o antígeno, à medida que migram através do nódulo linfático, também são detidas e ativadas com o auxílio de algumas células T ativadas. Uma vez que esses linfócitos específicos tenham passado por um período de proliferação e diferenciação, eles deixam os nódulos linfáticos como células efetoras através dos vasos linfáticos eferentes.

### 3. Células T: desenvolvimento, diversidade e ativação

Os linfócitos são as únicas células do organismo que expressam receptores altamente diversificados para o antígeno, o que permite o reconhecimento de uma grande variedade de substâncias estranhas. Essa diversidade é gerada durante o processo de desenvolvimento dos linfócitos T e B, a partir de células precursoras. O desenvolvimento dos linfócitos T *alfa beta* ( $\alpha\beta$ ) e *gama delta* ( $\gamma\delta$ ) segue estágios sequenciais, consistindo na recombinação somática e expressão dos genes do TCR, proliferação celular, seleção induzida pelo antígeno e aquisição de fenótipos de capacidade funcional. Essas células se originam de precursores do fígado fetal ou da medula óssea de adultos e completam o seu desenvolvimento no timo. As células T em desenvolvimento no timo são chamadas de **timócitos**. A maioria dos timócitos imaturos não expressa o TCR ou os correceptores CD4 e CD8 e migram através do córtex, onde os eventos de maturação ocorrem quando expressam pela primeira vez o TCR e iniciam a maturação em células CD4 ou CD8.

Os níveis de proliferação e apoptose são extremamente altos nos timócitos corticais, onde cerca de 95% morrem antes de chegar à região medular do timo. O resultado desse processo seletivo é a restrição ao MHC próprio e a tolerância a muitos autoantígenos. A diferenciação funcional e fenotípica em

células T CD4 ou CD8 ocorre na medula tímica, e as células T maduras são liberadas para a circulação.

### 3.1. Receptores de antígenos e moléculas acessórias dos linfócitos T

Os linfócitos T respondem aos antígenos peptídicos, que são expostos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). O início desta resposta requer o reconhecimento específico do antígeno pelas células T, a adesão estável das células T às APCs e a transdução dos sinais ativadores. Cada um desses eventos é mediado por moléculas distintas, expressas pelas células T. As moléculas de MHC e os peptídeos formam um complexo na membrana plasmática das APCs. O receptor que reconhece esse complexo peptídeo-MHC é o TCR (Figura 2), que é distribuído clonalmente, ou seja, os clones de linfócitos que apresentam diferentes especificidades expressam distintos TCRs. Os sinais bioquímicos, que são acionados na célula T pelo reconhecimento do antígeno, não são transduzidos pelo TCR, mas por proteínas não variáveis chamadas CD3 e *dzeta* ( $\zeta$ ), que estão ligadas de forma não covalente ao receptor do antígeno para formar o complexo TCR. Portanto, nas células T, o reconhecimento do antígeno é basicamente realizado por dois grupos de moléculas: um receptor para o antígeno altamente variável, o TCR, e proteínas sinalizadoras não variáveis (CD3 e cadeia  $\zeta$ ). Outras moléculas acessórias funcionam como moléculas de adesão para estabilizar a ligação das células T às APCs, permitindo que o TCR mantenha íntimo contato com o antígeno durante o tempo suficiente para a transdução dos sinais necessários à ativação dessas células.

As células T que expressam o TCR  $\Upsilon\delta$  pertencem a uma linhagem distinta das células T restritas ao MHC. A percentagem das células T  $\Upsilon\delta$  é muito variável nos diferentes tecidos das diferentes espécies, normalmente não excedendo mais do que 5%. Elas não reconhecem os antígenos peptídeos

associados às moléculas MHC e não são restritas ao MHC. Alguns clones dessas células reconhecem uma pequena molécula que pode ser apresentada por moléculas similares às da classe I do MHC, ou seja, uma apresentação não clássica de moléculas normalmente encontradas nas microbactérias e em outros microrganismos. A diversidade limitada das células  $\gamma\delta$  sugere que os ligantes desses receptores são bem conservados. Elas podem iniciar a resposta imune contra um pequeno número de microrganismos antes mesmo do recrutamento das células T antígeno-específicas  $\alpha\beta$ .

Além dos componentes do complexo TCR, as células T apresentam várias proteínas de membrana, as quais exercem papel crucial na resposta destas células no reconhecimento do antígeno. Essas moléculas presentes na membrana de linfócitos ligam-se especificamente a outras moléculas da membrana de outras células, como as APCs, células do endotélio de vasos e da matriz extracelular. Essas moléculas não apresentam regiões variáveis, não são polimórficas, são idênticas em todas as células T de todos os indivíduos de uma mesma espécie, e são responsáveis pela transdução de sinais bioquímicos para o interior das células T. Essa propriedade assegura que as células T e as APCs permaneçam ligadas o tempo suficiente para permitir aos TCRs a oportunidade de localizar, reconhecer e responder ao complexo peptídeo-MHC na APC.

### **3.2. Correceptores CD4 e CD8: Receptores envolvidos na ativação**

As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam às regiões não polimórficas das moléculas de MHC e transduzem os sinais que, juntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T. Normalmente, as células T  $\alpha\beta$  maduras expressam CD4 ou CD8, embora existam referências da expressão de ambos os marcadores. Esses correceptores interagem com as moléculas de MHC, quando o TCR reconhe-

ce de forma específica o complexo peptídeo-MHC na APC. Cerca de 65% das células T  $\alpha\beta$  maduras do sangue e dos tecidos expressam o correceptor CD4 e 35% do CD8.

#### 4. Natureza dos antígenos

O **antígeno** (do grego *anti*, contra e *gen*, gerar) é qualquer substância solúvel, celular ou particulada que pode ser especificamente ligada por um anticorpo ou por um receptor de antígeno de célula T. Os antígenos possuem duas propriedades: a da **imunogenicidade**, que é a capacidade de induzir uma resposta imune específica, e a da **antigenicidade**, que é a capacidade de interagir com os linfócitos T ou linfócitos B já sensibilizados. Assim, todas as substâncias imunogênicas são também antigênicas. As moléculas que desencadeiam a resposta imune são chamadas de **imunógenos**. Pequenas substâncias químicas não são capazes de estimular uma resposta e, portanto, recebem o nome de **hapteno**. Para ter capacidade de induzir uma resposta imune, o hapteno é ligado a uma macromolécula, que é chamada de **carreadora**. O complexo hapteno-carreador, ao contrário do hapteno livre, pode atuar como um imunógeno.

##### 4.1. Determinante antigênico

Os sítios de ligação dos anticorpos e dos TCRs interagem com uma área muito pequena das macromoléculas antigênicas, que é chamada de **determinante antigênico** ou **epitopo**. Portanto, é a menor porção da molécula responsável pela ligação ao linfócito ou anticorpo. A presença de vários determinantes iguais é chamada de polivalência ou multivalência e cada um pode ser ligado por uma molécula com região variável. As superfícies celulares, incluindo os microrganismos, geralmente possuem uma grande quantidade de determinantes antigênicos.

## 4.2. Relação filogenética dos antígenos

A estimulação de linfócitos de galinhas com proteína de pato resulta em uma resposta imune muito baixa. Por outro lado, se inoculadas em galinhas, proteínas de coelho, a resposta imune é bastante elevada. Isto acontece porque quanto mais próxima for a relação filogenética, menor será o estímulo e vice-versa. Existe pouca diferença entre as proteínas de galinhas e patos e muita diferença entre as proteínas de aves e mamíferos. Embora este conceito da relação filogenética reflita boa parte das aplicações imunológicas, não pode ser tomado como regra. A indução de uma resposta imune muito específica é função direta da semelhança biológica entre a fonte do antígeno e o animal receptor, ainda que seja menos intensa. Lebres e coelhos pertencem à mesma família e são bastante semelhantes, tanto morfológica quanto fisiologicamente. Portanto, ao se injetar proteínas de coelho em lebre, poderá se obter anticorpos muito específicos, ou seja, anticorpos que só reagem contra proteína de coelho.

## 4.3. Peso molecular e complexidade molecular

Na maioria dos antígenos, quanto maior for a molécula, maior será o número de epitopo; e quanto maior a complexidade, maior será a imunogenicidade. Um antígeno complexo contém vários determinantes antigênicos, onde alguns dos quais são mais eficientes na indução da resposta imune e são chamados imunodominantes.

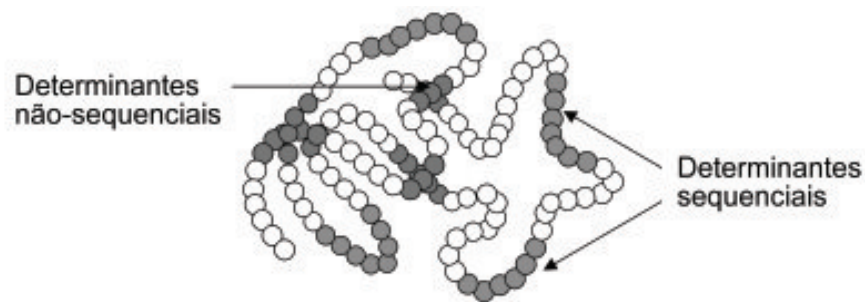
## 4.4. Configuração espacial e acessibilidade

A imunogenicidade e a antigenicidade de uma proteína não depende apenas de sua estrutura primária (isto é, da sequência de aminoácido), mas também das estruturas secundárias, terciárias e até quaternárias. Assim, se tratarmos uma proteína pelo calor, ou agentes químicos desnaturantes, e inocularmos esta em um animal, poderemos obter a formação de anticorpos com especificidade diferente do que se inoculássemos a proteína intacta. A configuração espacial de



diversos epitopos em uma única molécula de proteína pode influenciar a ligação do anticorpo de várias formas (Figura 4). A área importante para a imunogenicidade deve ficar acessível, na superfície da molécula.

Figura 4. Distribuição dos determinantes antigênicos sequenciais e não sequenciais em uma macromolécula proteica



#### 4.5. Forma de administração e adjuvantes

A dose do antígeno, a via e o esquema de imunização, assim como o uso de adjuvantes, são fatores atuantes na indução da resposta imune. As vias de inoculação subcutânea, intradérmica e intramuscular levam geralmente os imunógenos para os nódulos linfáticos regionais, e, mais frequentemente, induzem a imunidade celular. Os antígenos inoculados por via endovenosa e intraperitoneal acumulam-se predominantemente no baço, e mais frequentemente induzem a uma imunidade humoral. O adjuvante melhora a imunogenicidade de compostos com ele misturado, sem interferir na especificidade da resposta. Em medicina preventiva, são muitas vezes adicionados às vacinas para reduzir a dose e a frequência de injeções dos antígenos utilizados para a imunoprevenção de doenças infecciosas. Normalmente, o antígeno é aprisionado por ele, formando depósitos, o qual é liberado aos poucos por período de tempo mais extenso. Com isso, há o aumento do tempo de exposição do antígeno no organismo pelo retardamento de sua

destruição, estimulando, assim, a migração de células para o local de inoculação e aumentando a interação destas células com o mesmo. O tipo de adjuvante mais comumente usado em estudos experimentais é o adjuvante de Freund, que pode ser classificado em dois tipos: AIF (Adjuvante Incompleto de Freund), que é constituído por óleo mineral neutro e lanolina ou Arlacel; e o ACF (Adjuvante Completo de Freund), que além do óleo mineral neutro mais lanolina, é adicionado um componente bacteriano, normalmente o *Mycobacterium*, morto pelo calor. Além desses, outros adjuvantes são utilizados, como o sulfato de alumínio, o hidróxido de alumínio, a IL-12, entre outros. Dependendo da composição, adjuvantes podem ou não ser usados em seres humanos.

### **Bases químicas da especificidade antigênica**

Anticorpos formados contra determinadas substâncias têm uma reação forte contra elas, principalmente se os anticorpos interagem com os antígenos específicos que induziram a sua formação (**antígenos homólogos**), mas podem reagir com a mesma ou menor intensidade com outros antígenos, que são chamados de **antígenos heterólogos**, porém com estrutura semelhante. Essas reações com antígenos heterólogos são denominadas **reações cruzadas**. As reações cruzadas podem ocorrer basicamente em função da similaridade entre dois diferentes determinantes antigênicos, ou ainda pelo fato de dois antígenos diferentes apresentarem o mesmo determinante antigênico.

## **5. Diversidade das imunoglobulinas**

Os **anticorpos** são conceituados como glicoproteínas globulares com função imunitária e pertencem à superfamília das imunoglobulinas. São sintetizados por linfócitos B e, principalmente, por plasmócitos, em resposta ao estímulo imunogênico. Interagem, especificamente, com os imunógenos, que estimulam sua biossíntese; desencadeiam vários mecanismos na fase efetora

da resposta imune que, frequentemente, resultam em anular a ação de biopatógenos, por meio da ativação do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em que os anticorpos marcam os microrganismos para serem destruídos pelas células do sistema imune inato e reações de hipersensibilidades, entre outras ocorrem.

Estas funções são estruturalmente separadas na molécula e a região de ligação ao antígeno varia amplamente, sendo conhecida como região variável ou região V. A região molecular que participa da função efetora é conhecida como região constante ou C, e não varia do mesmo modo, embora apresente cinco formas principais que se especializaram na ativação de diferentes mecanismos.

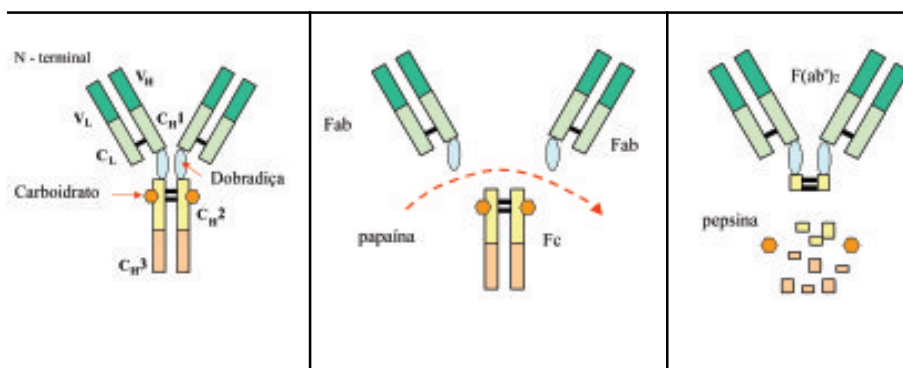
A notável diversidade das moléculas dos anticorpos é consequência de um mecanismo altamente especializado, pelos quais os genes expressos são reunidos por rearranjos de DNA, que juntam dois ou três diferentes segmentos para formar um gene de região variável durante o desenvolvimento das células B. Subseqüentes rearranjos nucleicos podem reunir o gene composto da região variável e qualquer gene da região constante, produzindo assim anticorpos de cada um dos 5 isotipos.

Estruturalmente (Figura 5), a imunoglobulina é formada por duas cadeias leves (L-*light*-leve), idênticas, constituídas de polipeptídeos de cerca de 25 mil Daltons e de duas cadeias pesadas (H-*heavy*-pesado), também idênticas, com peso molecular de 50 mil Daltons ou mais. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por pontes dissulfídricas. O número exato e as posições destas pontes entre as cadeias diferem entre as classes e subclasses de Imunoglobulinas. Além disso, ambas as cadeias, leves e pesadas, possuem uma região variável e outra constante. Portanto, a imunoglobulina possui na cadeia leve uma região constante ( $C_L$ ) e uma variável ( $V_L$ ). O mesmo na cadeia pesada, uma região constante ( $C_H$ ) e uma variável ( $V_H$ ). Existem dois tipos de cadeias leves, a *kappa* ( $\kappa$ ) e a *lambda* ( $\lambda$ ). Em humanos, 60% das

cadeias leves são do tipo *kappa*, e 40% são do tipo *lambda*. Os primeiros 110, ou mais, aminoácidos da região aminoterminal das cadeias leves ou pesadas variam muito entre os anticorpos de especificidade diferentes e por isto são chamadas de região variável.

A molécula de imunoglobulina pode ser digerida por enzimas proteolíticas. A digestão pela papaína quebra a molécula em três fragmentos (Figura 5): dois fragmentos chamados **Fab** (*fragment antigen binding*), que se liga ao antígeno específico, e um fragmento denominado **Fc** (*fragment crystallizable*, fragmento cristalizável), por formar cristais quando armazenado em locais frios. Os fragmentos Fab são os que contêm as cadeias leves (L) completas, emparelhadas com os domínios V (variável) e C (constante) da cadeia pesada, enquanto o Fc, contém apenas o domínio C (constante). A papaína cliva a molécula na porção aminoterminal das pontes de enxofre, permitindo que as metades carboxiterminais da Fc permaneçam unidas, deixando o fragmento Fc livre. Já a pepsina, cliva na mesma região, mas na porção carboxiterminal das pontes dissulfídicas, produzindo o  $(Fab)'_2$ , onde os dois braços dos Ac permanecem unidos.

Figura 5. Estrutura básica de uma imunoglobulina e a formação dos fragmentos pela digestão enzimática.



### 5.1. Geração da diversidade na resposta imune humoral e maturação da afinidade

Mesmo a resposta a um Ag simples é diversa, com muitas moléculas de Igs, cada uma com afinidade única e especificidade acurada. Durante a organização dos diferentes segmentos genéticos necessários para produzir uma molécula de Ig, combinações ao acaso dos diferentes componentes gênicos produzem uma enorme diversidade potencial.

Durante as fases iniciais do desenvolvimento do linfócito B, a IgM de membrana é produzida como receptor. A mudança de isotipo em células B ocorre ao serem estimuladas pelo antígeno. Isto assegura a manutenção da mesma região variável, garantindo a especificidade ao Ag correspondente, expressa nos diferentes isotipos, aos quais orientam diferentes funções efetoras. Uma diferença básica entre o Ac produzido na resposta primária e na resposta secundária é a sua afinidade. O Ac da classe IgM, produzido para um Ag na resposta primária, tende a ser de afinidade relativamente baixa e pode contar com uma avidéz adicional, causada por sua estrutura pentamérica, para ligar-se eficientemente ao Ag. Entretanto, a IgG e outras classes produzidas na resposta secundária tendem a ter uma afinidade maior. Vale ressaltar que o aumento gradual da afinidade do Ac pelo Ag indutor, que é observado no curso de uma resposta, acontece no nódulo linfático. Este fenômeno (maturação da afinidade) é a consequência da hipermutação somática dos genes de Ig acoplada com a seleção das células B com Ig de superfície de alta afinidade. A maturação da afinidade, no curso de uma resposta imune, pode ser encarada como um processo darwiniano, requerendo primeiro a geração de variabilidade nos receptores de células B e então a seleção daqueles com maior afinidade pelo Ag. Após esse processo, as células B, que se ligam ao Ag de modo bem-sucedido e sobrevivem à seleção, saem do centro germinativo do nódulo linfático para tornarem-se células B de memória ou células plasmáticas secretoras de Ac.

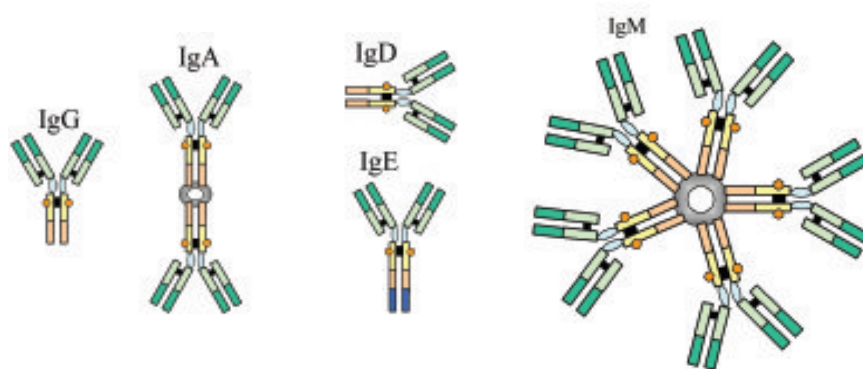
## 5.2. Distribuição e propriedades dos isotipos

Os agentes infectoparasitários devem achar seus caminhos para a maior parte dos locais do organismo hospedeiro, e os anticorpos também devem ser amplamente distribuídos para contê-los. Os anticorpos são distribuídos por difusão através de mecanismos especiais, para levá-los, por exemplo, para os pulmões e o intestino. Anticorpos de diferentes isotipos (Figura 6) operam em locais diferentes. Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune humoral são sempre as IgMs. Estes são produzidos antes que a célula B tenha sofrido hipermutação somática; portanto, tendem a ser de baixa afinidade, como visto anteriormente. Estas moléculas formam pentâmeros, cujos 10 sítios de ligação com o Ag podem se unir simultaneamente a antígenos multivalentes, tais como os polissacarídeos de parede celular bacteriana. Esta estrutura pentamérica também torna a IgM capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção. Quanto à IgD, não se conhece muito bem a sua função, mas parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo Ag. O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares é a IgG, considerando todas as subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A IgG tem propriedades diversas, dentre as quais, confere proteção ao feto, pois é a única classe de imunoglobulina humana que pode ser transportada através da placenta diretamente para a corrente circulatória do feto. A IgG também atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para NK, ativação do complemento e opsonização.

A IgA é a principal imunoglobulina presente em secreções externas, como saliva, muco, suor, suco gástrico e lágrimas. Além disso, é a principal imunoglobulina contida no colostro e no leite, e deve ser no neonato a principal fonte de proteção contra patógenos no intestino. A IgA se divide em duas subclasses, IgA1 e IgA2. A IgA presente no plasma é encontrada na forma monomérica e em pequenas concentrações, enquanto a forma dimérica é

encontrada em grandes concentrações nas regiões mucosas do organismo. Estas previnem a invasão de bactérias ou a penetração de toxinas nas células epiteliais. A IgE está difundida de maneira moderada nos espaços extravasculares e tem como principal propriedade a sensibilização de mastócitos e basófilos, promovendo reação inflamatória, através da liberação de mediadores químicos como a histamina, que, por sua vez, promove vasodilatação, permitindo a passagem de Acs do vaso para a área lesada, e fatores quimioatraentes que recrutam fagócitos para o local de infecção. Além disso, podem estar envolvidas em processos alérgicos e na ajuda para eliminação de helmintos, quando sensibilizam eosinófilos.

Figura 6. Estrutura dos cinco principais isotipos de imunoglobulinas humanas



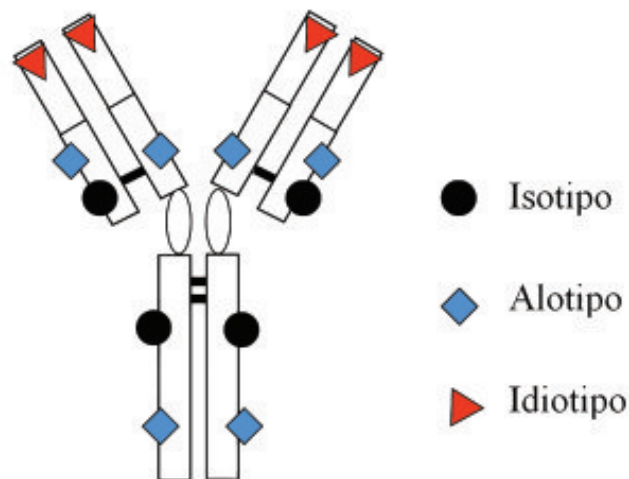
### 5.3. Polimorfismo das imunoglobulinas

Quando uma Ig é usada como Ag, ela é tratada como qualquer outra proteína estranha e faz desencadear uma resposta de Ac. Pode ser produzido Ac anti-Ig que reconheça aminoácidos característicos do **isotipo** do Ac injetado. Também é possível gerar Acs que reconhecem diferenças no Ac de membros da mesma espécie e tal fenômeno se deve à variação genética ou polimorfismo. Tais variantes alélicas são chamadas de **alotipos** e representam

pequenas diferenças polimórficas nos loci, que codificam as regiões constantes das cadeias leves e pesadas. Contrastando com os Acs anti-isotipos, os Acs anti alotipos reconhecerão Ig de um dado isotipo em alguns representantes de uma dada espécie. Finalmente, as variações na sequência dos epitopos de uma Ig são conhecidas como **idiotipos** (Figura 7).

Para a produção de Acs altamente específicos, a clivagem pela papaína (Figura 5) é essencial, pois esta enzima, como já foi dito anteriormente, corta a molécula antes das pontes de sulfeto, o que mantém a porção Fc inteira, e a produção dos Ac serão altamente específicas contra a região Fc daquele isotipo. Quando se deseja uma molécula de Ac que não reaja com o sistema complemento e não se fixe em receptores para Fc de superfície celular, cliva-se a Ig com a pepsina, que corta depois das pontes de sulfeto, o que mantém a fração (Fab')<sub>2</sub> íntegra, permitindo a ligação específica com o alvo desejado e impossibilitando as ações efetoras características do isotipo.

Figura 7. Localização das variações isotípicas, alotípicas na molécula de imunoglobulina.





#### 5.4. Anticorpos monoclonais

Em 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein planejaram um método para a preparação do **anticorpo monoclonal (Ac mo)**, através da fusão da célula B ativada normal produtora de anticorpo com uma célula do mieloma (uma célula plasmática cancerosa). Neste evento, produziram uma célula híbrida (hibridoma), que possuía as propriedades de crescimento imortal da célula do mieloma e secretava o Ac produzido pela célula B.

Os clones resultantes das células do hibridoma que secretam grandes quantidades de **Ac mo** podem ser indefinidamente cultivadas. Os hibridomas de células B são produzidos utilizando polietilenoglicol (PEG) para fundir as células do mieloma com as células B de animais que foram imunizados com o Ag, através do qual se deseja produzir os anticorpos. As células do mieloma contribuem para o crescimento imortal das células fusionadas, e as células B contribuem com a informação genética para a síntese do Ac específico de interesse. As condições do procedimento devem permitir seletivamente a sobrevivência e o crescimento somente dos hibridomas. Para tal, é utilizado o meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Neste meio, a aminopterina bloqueia a síntese de DNA pela via de *novo*. Na presença de aminopterina, as células devem usar a via de salvamento, onde as enzimas catalisadoras são a fosforribosiltransferase hipoxantina-guanina (HGPRT) ou a timidina quinase (TK), para produzir o DNA. Uma mutação em qualquer uma destas duas enzimas bloqueia a habilidade da célula em usar a via de salvamento. Portanto, células do mieloma sozinhas morrerão, pois são deficientes para as enzimas HGPRT ou TK, essenciais para a via de salvamento. Somente as híbridas irão sobreviver, pois a célula B contribui com a enzima que falta para a via de salvamento. Embora as células B não fusionadas sejam capazes de sobreviver no meio HAT, estas não vivem por períodos extensos *in vitro* e morrem.

Após a obtenção dos hibridomas, estes devem ser diluídos e distribuídos em placas de cultura apropriada numa concentração de 0,5 célula por poço. Tal procedimento nos dará a certeza de que o Ac produzido seja oriundo de

um único clone, pois como não existe meia célula, teoricamente, teremos um poço vazio e outro com apenas uma célula. Feito isso, cada hibridoma, após multiplicação e produção de Ac, será examinado por teste sorológico, tendo em vista a identificação dos hibridomas desejados, ou seja, aqueles que sintetizam o anticorpo monoclonal que reaja com o Ag correspondente. Uma vez identificados, os hibridomas são induzidos à proliferação, tornando-se assim uma fonte inesgotável de anticorpos altamente específicos.

Os **Ac mo** são muito úteis como reagentes para diagnóstico, exames de imagem e procedimentos terapêuticos na clínica médica. Para diagnóstico, podem ser utilizados na detecção de gravidez, diagnóstico de numerosos microrganismos patogênicos, medidas de níveis sanguíneos de várias drogas, tipagem sanguínea, tipagem de antígenos de histocompatibilidade, caracterização fenotípica de diversos tipos celulares e detecção de antígenos produzidos por determinados tumores. Por exemplo, para esse propósito, **Ac mo** radiomarcados podem ser utilizados *in vivo* na detecção ou localização de antígenos tumorais, permitindo diagnósticos precoces de alguns tumores primários ou metastáticos nos pacientes. Na imunoterapia, o **Ac mo** específico para um determinado Ag tumoral de superfície, acoplado com um quimio ou radioterápico, pode ser potente agente terapêutico.

## 6. Sistema completo

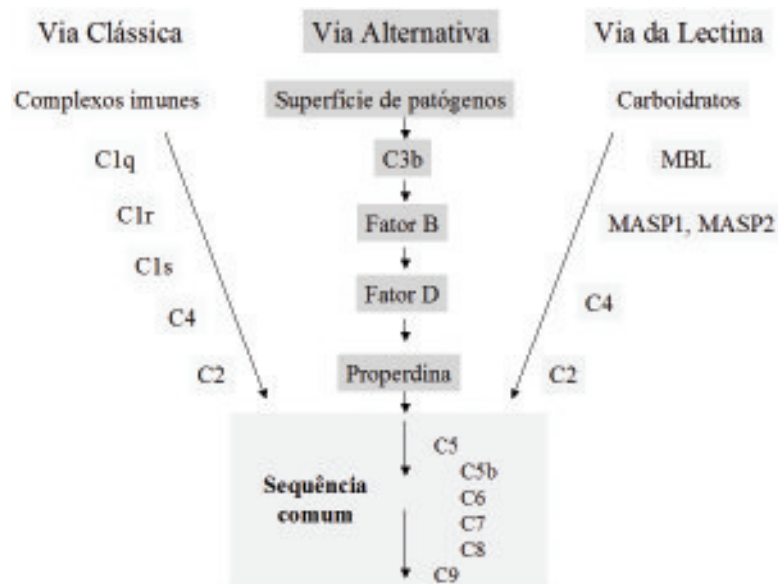
O nome complemento foi originado a partir da atividade complementar de proteínas na ação bactericida de alguns Acs. O sistema complemento é um complexo proteico existente no plasma, sob a forma inativa, constituído por substâncias termolábeis e/ou termoestáveis; e que tem como função a eliminação de um agente estranho pela ativação de mecanismos inespecíficos, que se constitui de:

- **Fagocitose** - quando algumas proteínas ativadas do complemento unem-se a bactérias, opsonizando-as para ingestão pelos fagócitos portadores de receptores do complemento;

- **Reação inflamatória** - quando os pequenos fragmentos de proteínas promovem eventos vasculares e recrutam fagócitos ao local da atividade inflamatória.
- **Lise** - quando uma vez desencadeada a cascata, os componentes terminais do complemento lesam certas bactérias, vírus e células com a formação de poros na membrana celular.

Além dessas três funções, o sistema complemento também é responsável pela **depuração imune**, que consiste na remoção de complexos imunes da circulação no baço e no fígado. Este sistema, com cerca de 30 proteínas ou mais, interage por ativação enzimática. O complemento pode agir sozinho ou com Ac e são conhecidas 3 vias, a clássica, a alternativa e a via das lectinas. A via clássica é ativada por complexos imunes, enquanto as vias alternativa e das lectinas são ativadas por microrganismos. Todas as vias de ativação convergem para uma etapa final de reação em cadeia denominada **sequência comum** (Figura 8).

Figura 8. Vias de ativação do sistema complemento



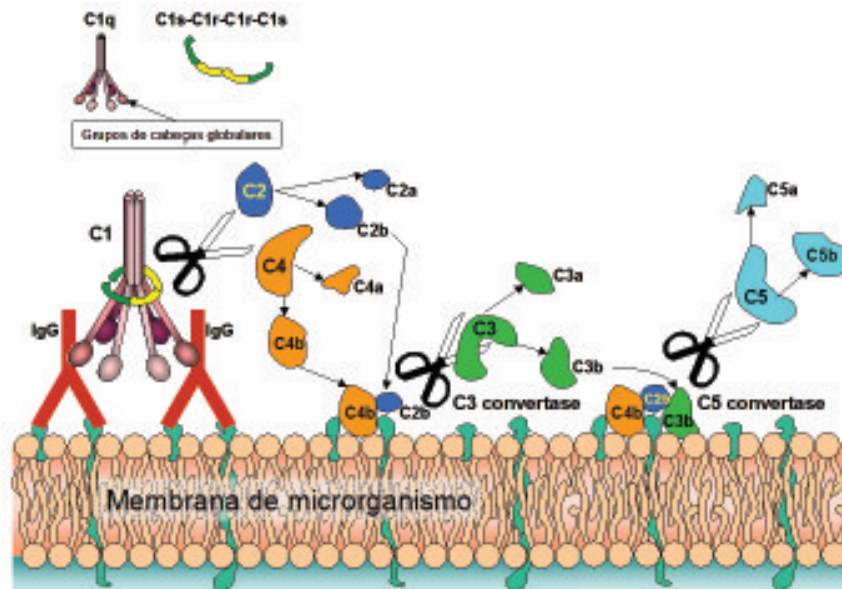
No processo de ativação, que envolve uma série de etapas proteolíticas, uma proteína precursora inativa é clivada para fornecer um grande fragmento ativo; esta se une à superfície celular e contribui para a próxima clivagem, e um pequeno fragmento peptídico que é liberado serve como mediador de resposta inflamatória. Cada uma das três vias de ativação gera uma convertase de C3 por um caminho diferente, determinando que as principais moléculas efetoras e os eventos tardios sejam os mesmos para as três vias. É importante lembrar que a ativação inadequada e a persistência dos efeitos inflamatórios são potencialmente prejudiciais ao organismo, de modo que a sua regulação precisa ser bem rigorosa. E uma das maneiras de controle se resume ao pouquíssimo tempo que os componentes-chaves permanecem ativos (milésimos de segundos), a menos que se liguem a uma superfície celular. Além da curta vida-média dos fragmentos do complemento, existem vários pontos na via de ativação, nos quais podem atuar proteínas reguladoras, o que previne a ativação inadvertida do complemento sobre células do hospedeiro e evita a lesão de células do organismo.

Quanto à nomenclatura, todos os componentes da via clássica são designados pela letra C, seguida por uma designação numérica simples: C1, C2. Os componentes foram numerados pela ordem de descoberta e não segundo a sequência de reações (C1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9). Quanto aos produtos de clivagem, são designados por letras minúsculas, onde o maior fragmento recebe a letra **b** (exceto o fragmento C2, que recebe a letra **a**) e o menor, a letra **a**. Os componentes iniciais da via alternativa, em vez de serem numerados, são indicados pelas letras maiúsculas **B** e **D**, e seus produtos de clivagem também são designados pelas letras **b** e **a**, onde o maior fragmento é **Bb** e o menor, **Ba**. Quanto aos componentes ativados, recebem uma linha horizontal superior, por exemplo,  $\overline{Bb}$ .

### 6.1. Ativação da via clássica

O componente C1 é um complexo formado por três proteínas C1q, C1r e C1s. Uma vez formado o complexo Ag-Ac, o componente C1q se liga na região Fc do Ac, dando início a uma reação em cascata, onde C1q ativa duas moléculas de C1r capazes de se ligar a outras duas de C1s, resultando no complexo **C1q-C1s-C1r-C1r-C1s**, que é uma serina protease. Desta forma, **C1s** atua em C4 e C2, dissociando-as em C4a e C4b, C2a e C2b. Nesta etapa, a união de **C4b** a **C2b** (em alguns livros, C2a) forma a C3 convertase. Após a formação da **C3 convertase**, esta cliva C3 em C3a e C3b. O **C3** é a fração mais abundante no plasma e o mais importante entre os componentes do complemento, pois inúmeras moléculas de C3b podem se ligar à superfície de um patógeno. Alguns fragmentos C3b se ligam a receptores da membrana e atuam como opsoninas, facilitando a fagocitose, outros fragmentos de C3b se ligam a C3 convertase, originando a C5 convertase (C4bC2bC3b) da via clássica (Figura 9), que vai atuar em C5 dissociando-o em C5a e C5b. Com a dissociação de C5, inicia-se uma etapa comum a todas as vias de ativação do complemento, onde a fração C5b interage com C6, que abre um sítio de ligação para C7. Por sua vez, o complexo C5bC6C7 deposita-se na superfície da membrana e abre o sítio de ligação para C8, que penetra na membrana da célula. O C8, então, abre um sítio para C9, que, após a ligação de vários C9, forma um canal transmembrânico ou poro hidrofílico, chamado de complexo de ataque à membrana (MAC), ocasionando lise celular e desequilíbrio osmótico. É importante ressaltar que no curso da cascata do sistema complemento, os fragmentos menores C4a, C2a, C3a e C5a liberados no interstício, são potentes mediadores inflamatórios.

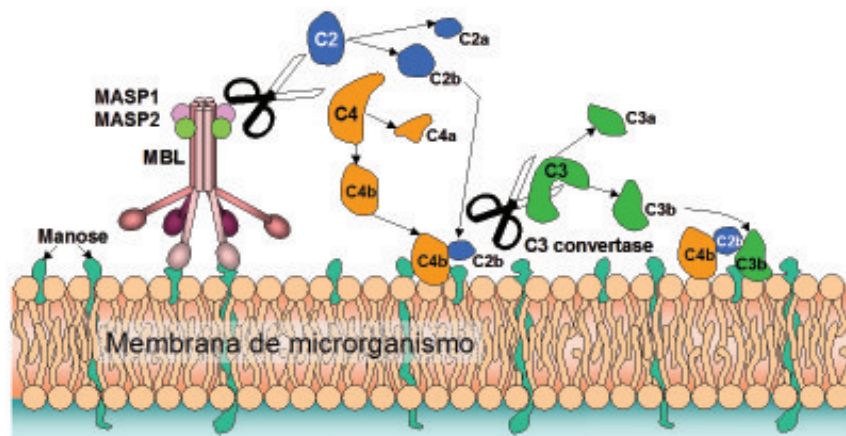
Figura 9. Ativação da cascata do complemento pela via clássica.



## 6.2. Via das Lectinas

A via das lectinas (Figura 10) é semelhante à via clássica. As lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, que se ligam a carboidratos e podem ativar a via clássica do complemento na ausência do complexo antígeno-anticorpo. A principal lectina é a proteína ligadora de manose (**MBL**), que faz o papel de C1q ao se ligar à resíduos de carboidratos da superfície de uma bactéria ativadora ou outras substâncias. A MBL está associada com duas pró-enzimas MASP-1 e MASP-2 (Serina Protease Associada a MBL). Quando a MBL se liga aos grupamentos manose terminais nos carboidratos bacterianos, MASP-1 e MASP-2 são ativadas e continuam a ativar a via clássica.

Figura 10. Ativação da cascata do complemento pela via das lectinas



### 6.3. Via Alternativa

Com exceção da etapa inicial, os eventos da via alternativa (Figura 11) são homólogos aos da via clássica e das lectinas. A via alternativa é constantemente ativada, em taxa muito reduzida, a qual aumenta drasticamente na presença de superfícies ativadoras adequadas, como as membranas celulares de microrganismos. Esta via pode ser ativada pela ligação do C3b ou de uma forma hidrolizada espontaneamente, conhecida como iC3b, à superfície do patógeno. Este se liga ao fator B, formando C3bB, componente suscetível ao fator D, uma protease do plasma. O fator D cliva o componente B em Ba e Bb, onde Bb permanece ligado ao C3b, formando a molécula C3bBb que é a C3 convertase da via alternada. A C3 convertase da via alternativa produzirá mais C3b, tornando o sistema mais ativo, pois muitos fagócitos possuem receptores para este componente. A C3 convertase da via alternativa é extremamente instável e, por isso, costuma sofrer rápida dissociação. No entanto, uma proteína plasmática denominada properdina se liga a esta convertase e a estabiliza, diminuindo sua degradação e permitindo a continuação da cascata.

Nesta via, alguns C3b se ligam ao C3bBb e formam a C5 convertase da via alternada **C3b<sub>2</sub>Bb** ou **C3bBbC3b**. Este complexo cliva C5 em C5a e C5b, dando início a sequência comum, onde C5b inicia o complexo de ataque à membrana, ligando-se a C6, C7, C8 e C9 (Figura 12).

Figura 11. Ativação da cascata do complemento pela via alternativa.

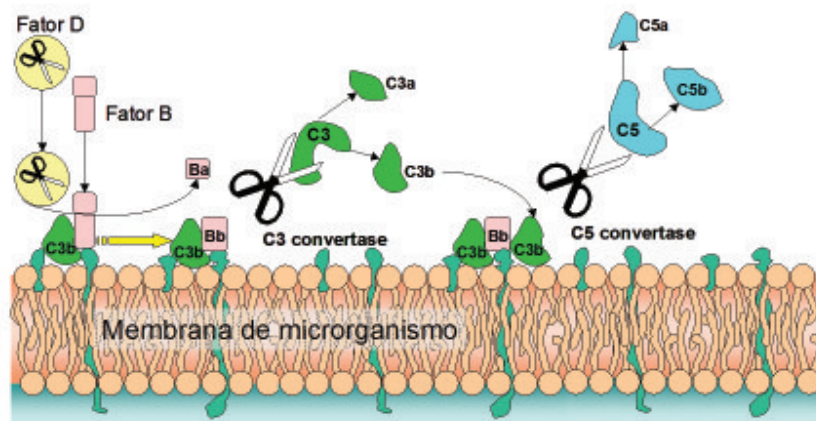
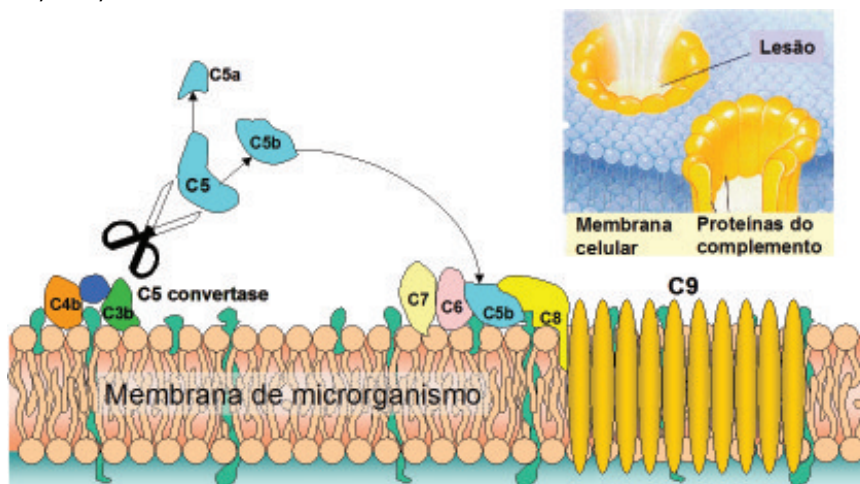


Figura 12. Sequência final da cascata do complemento comum a todas as vias de ativação, onde C5b inicia o complexo de ataque à membrana, ligando-se a C6, C7, C8 e C9.





## 7. Complexo principal de histocompatibilidade

Todo organismo multicelular possui algum sistema de defesa que distingue agentes infectoparasitários e elimina-os do hospedeiro. Mais ainda, os grandes vertebrados têm um sistema imune mais evoluído que pode discriminar o que é estranho e fazer uma resposta seletiva para o mesmo. A vantagem de tal imunidade específica é a rápida adaptação do sistema imune aos agentes patogênicos que são mais frequentemente encontrados no meio ambiente local. Esta capacidade é conseguida através do complexo principal de histocompatibilidade, cujos produtos desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio e não próprio. A identificação das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) aconteceu pela investigação da sua função na resposta imunológica aos tumores, na rejeição de transplantes de pele e no controle da resposta imune.

### 7.1. Estrutura das moléculas do MHC

Os genes que codificam as moléculas do MHC estão localizados no cromossomo 6 humano e no 17 em camundongos, denominados antígenos leucocitários humanos (HLA) e de histocompatibilidade (H-2), respectivamente. O MHC pode ser dividido em quatro subconjuntos de genes ou classes: classes I, II, III e IV, sendo os de classe I e II ligados ao processamento e apresentação de antígenos, enquanto os genes que compõem as classes III e IV codificam para outras proteínas, estando algumas relacionadas com a resposta imune, tais como componentes do sistema complemento, algumas citocinas, etc. Em humanos, existem três *loci* que codificam as moléculas de classe I, os quais são denominados HLA-A, HLA-B e HLA-C, e três *loci* gênicos do MHC de classe II, que são denominados HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Normalmente, um indivíduo herda duas cópias de cada *locus* gênico (um de cada progenitor). Assim, em humanos, temos seis *loci* de classe I e seis *loci* de classe II. Todos esses *loci* apresentam alto grau de polimorfismo, ou seja,

apresentam múltiplos alelos na população. As moléculas do MHC de classe I, que estão presentes na maioria das células nucleadas, são reconhecidas principalmente pelo TCR de linfócitos T CD8, ao passo que as moléculas de classe II, presentes principalmente na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais, são reconhecidas pelo TCR dos linfócitos T CD4.

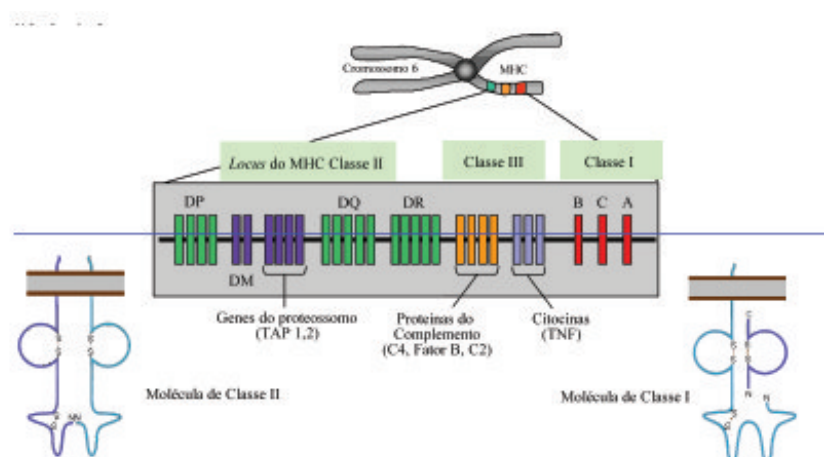
## 7.2. MHC de classe I

As moléculas do MHC de classe I são expressas na membrana celular da maioria das células nucleadas dos vertebrados. Sua estrutura é constituída por uma cadeia  $\alpha$  (*alfa*) de aproximadamente 45kDa, que atravessa a membrana plasmática. A outra é a  $\beta 2$ -microglobulina de 12kDa que se encontra fracamente ligada à membrana. Os genes que codificam a cadeia  $\alpha$  (variável) estão localizados dentro da região genômica do MHC, enquanto os genes que codificam a  $\beta 2$ -microglobulina (invariável) estão localizados fora da região do MHC no cromossomo 15 humano. A cadeia  $\alpha$  é formada por três segmentos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . A região em que o peptídeo se liga corresponde à região amino-terminal e é composta pelos segmentos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , que formam uma fenda ou bolsa onde ele se encaixa. O tamanho dessa fenda permite ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos e corresponde à região do MHC de classe I que interage com o TCR do linfócito T. Por essa razão, os antígenos proteicos precisam ser processados para gerar peptídeos, pequenos o suficiente para se ligarem à molécula do MHC. A região invariável, que corresponde ao segmento  $\alpha 3$ , se liga ao correceptor CD8 do linfócito T. Essa ligação confere a especificidade da molécula de classe I com a célula T CD8. O domínio  $\alpha$ , também se liga de forma não covalente à molécula  $\beta 2$ -microglobulina, sendo esse complexo estabilizado pelo peptídeo processado que se liga nos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (Figura 13). Somente nessa forma estável a molécula do MHC de classe I é expressa na superfície das células.

### 7.3. MHC de classe II

As moléculas do MHC de classe II também são expressas na membrana celular. Mas estas são expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos profissionais. Essas células incluem as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. A molécula de classe II é formada por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ . A cadeia  $\alpha$  tem 32-34kDa, enquanto a cadeia  $\beta$  tem 29-32kDa (Figura 13). As duas cadeias do MHC de classe II são codificadas dentro da região genômica do MHC e ambas são polimórficas, ou seja, são variáveis. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , na porção extracelular, possuem domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  e  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , onde a porção variável das duas cadeias são os segmentos  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , conforme pode ser visto na Figura 13. Os domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  interagem para formar a fenda de ligação ao peptídeo, que estruturalmente é bastante similar à molécula do MHC de classe I. Esta fenda, ou bolsa é onde se encaixa o peptídeo a ser apresentado à célula T. Assim, como é de se esperar, esta também é a região da molécula do MHC de classe II que apresenta maior variabilidade. Na molécula de classe II, as extremidades da fenda de ligação do peptídeo são abertas, o que permite a ligação de peptídeos de 10-30 aminoácidos, mas pode ocorrer ligação de peptídeos maiores, o que não acontece com a molécula de classe I que tem as extremidades fechadas.

Figura 13. As três classes de genes no MHC humano e a expressão dos produtos de classe I e II.



#### **7.4. Processamento e apresentação de antígenos às células T CD8**

Antígenos apresentados pelas moléculas de MHC de classe I são, na maioria das vezes, gerados dentro da mesma célula que produziu a molécula de classe I. Os peptídeos gerados são derivados de proteínas que se encontram no citosol da célula, que podem ser da própria célula, de origem viral ou de outros microrganismos intracelulares e antígenos tumorais. Os antígenos, em geral proteínas presentes no citoplasma, são degradados em peptídeos por um complexo multiproteolítico denominado proteassoma. Esses peptídeos são transportados do citoplasma para o retículo endoplasmático rugoso por intermédio de uma proteína transportadora de antígeno (TAP). Os peptídeos transportados pela TAP para dentro do retículo endoplasmático se ligam à molécula nascente do MHC classe I, tornando-a estável. Assim, o complexo resultante, MHC classe I e peptídeo, deixam o retículo endoplasmático e movem-se para o complexo de Golgi, do qual é transportado para a superfície da célula onde é reconhecido pela célula T CD8.

#### **7.5. Processamento e apresentação de antígenos às células T CD4**

As moléculas do MHC de classe II também se ligam a peptídeos originados da degradação proteica, mas, geralmente, os peptídeos resultam da proteólise de moléculas endocitadas ou partículas fagocitadas pelas APC. As partículas são internalizadas em vesículas intracelulares, denominadas endossomas, que se fundem com lisossomas, contendo enzimas proteolíticas. A vesícula resultante dessa fusão é chamada fagolisossoma. O processo de degradação do antígeno ocorre em condições ácidas, que é o pH ótimo para a ação das enzimas proteolíticas, e os peptídeos originados da degradação se ligam na fenda da molécula do MHC de classe II. Quando recém-sintetizada no retículo endoplasmático, a molécula do MHC de classe II tem a fenda protegida por uma proteína denominada cadeia invariante (Ii). Desse modo, a fenda do MHC classe II não pode acomodar peptídeos presentes no retículo

endoplasmático. Essa molécula de classe II é, então, direcionada para os fagolisossomas, onde se encontram os peptídeos exógenos resultantes da proteólise dos antígenos. Nos fagolisossomas, as enzimas proteolíticas digerem a cadeia II; porém, não totalmente, restando o fragmento chamado peptídeo de classe II, associado à cadeia invariante (CLIP = *class II associated invariant chain peptide*). Com a remoção do CLIP, por meio da molécula HLA-DM, o peptídeo processado pode se ligar à fenda da molécula de classe II e ser reconhecido especificamente pelos linfócitos T CD4.

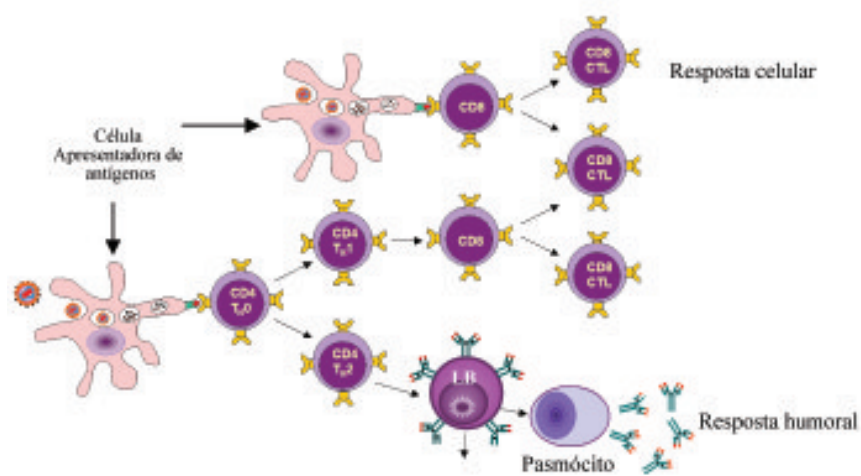
## 8. Resposta celular e resposta humoral

Se a resposta inata for suficiente para anular a ação de um agente infectoparasitário, não ocorrerá ativação da resposta imune adaptativa e, portanto, não formará memória imunitária. Por outro lado, caso ocorra persistência da infecção, devido aos mecanismos de escape desse agente, haverá a necessidade da ativação da resposta imune adaptativa. Em função da natureza do agente infectoparasitário e da forma com que seus antígenos são processados, a resposta imune adaptativa pode seguir dois caminhos distintos, que levam à proliferação de células CD8+ (resposta celular predominantemente Th1) e à secreção de anticorpos por células B e plasmócitos (resposta humoral predominantemente Th2) (Figura 14). Th1 e Th2 não são sinônimos de resposta celular e humoral. Existe predomínio, mas células Th2 são funcionais, e existem anticorpos IgG ligados ao Th1.

A imunidade mediada por células se desenvolve por uma rede de interações que resulta em defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de fagócitos ou de outras células. Os antígenos de patógenos processados no citosol, fora de vesículas ácidas, são conduzidos até a superfície celular pela molécula de classe I e apresentados para as células T CD8+ que eliminam diretamente a célula infectada, enquanto os antígenos de patógenos processados em vesículas ácidas são apresentados pelas moléculas de classe II às células

T CD4+, que podem se diferenciar em dois tipos: CD4+Th1, que ativam células mononucleares (macrófagos e linfócitos) e CD4+Th2, que induzem a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de anticorpos.

Figura 14. Esquema geral da resposta celular e humoral

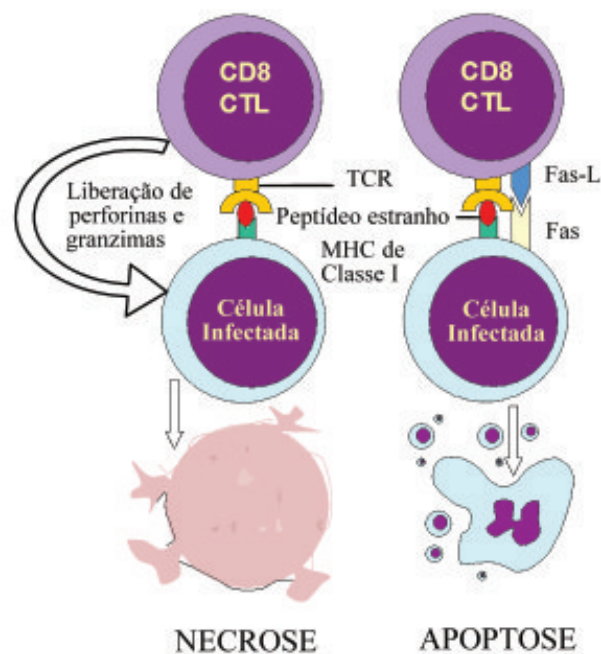


### 8.1. Resposta celular e o mecanismo de ação das células T CD8+

Os linfócitos T CD8+ ativados se diferenciam em células T citolíticas (CTL), que destroem somente as células portadoras do antígeno associado a produtos de classe I do MHC, não danificando a célula vizinha durante o evento. O mecanismo de ação pode ocorrer pela lise direta através das **enzimas perforinas** e **granzimas**, como também pela indução de **apoptose**. No primeiro processo, após a ligação do TCR/CD3 com o antígeno via MHC I, os microtúbulos da célula CD8+ se movem para a área de contato com a célula alvo, e os grânulos contendo as enzimas citolíticas também se aglomeram nesta região. Neste contato, as proteínas formadoras de poros (perforinas) entram em contato com concentrações de Ca<sup>++</sup> e sofrem polimerização. Esta

polimerização forma um canal permeável a íons na membrana plasmática da célula alvo, levando a um desequilíbrio osmótico e lise (Figura 15). Além de lise direta, as células CD8+ CTL produzem IFN- $\gamma$ , que estimula a atividade fagocitária de macrófagos, inibe diretamente a replicação de vírus e induz a expressão de moléculas de classe I. O segundo mecanismo de destruição de célula-alvo envolve a interação da molécula ligante de Fas, denominada Fas-L e presente no CTL, com a molécula Fas (CD95), presente na célula alvo. Essa interação leva a célula-alvo à apoptose, que também pode ser induzida pela ação das granzimas. Neste evento, as células acometidas condensam o citoplasma e a cromatina, formando os corpos apoptóticos, que serão fagocitados rapidamente por células vizinhas sem a formação de reação inflamatória adjacente (Figura 15). Um efeito adicional da apoptose é a ativação de enzimas celulares que degradam genomas virais em até 200 pares de bases e seus múltiplos.

Figura 15. Necrose e apoptose induzidas por células T citotóxicas



## 8.2. Mecanismo de ação das células CD4+ Th1 e CD4+ Th2

Alguns microrganismos como *Mycobacterium* spp são patógenos intracelulares que crescem em vesículas, onde são parcialmente protegidos da ação dos anticorpos e das células CD8 CTL. Estes normalmente inibem a fusão destas vesículas com o lisossomo, prevenindo sua destruição. Diante disso, esses microrganismos são eliminados normalmente quando estas células são ativadas através de citocinas inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , produzido pelas células CD4+Th1.

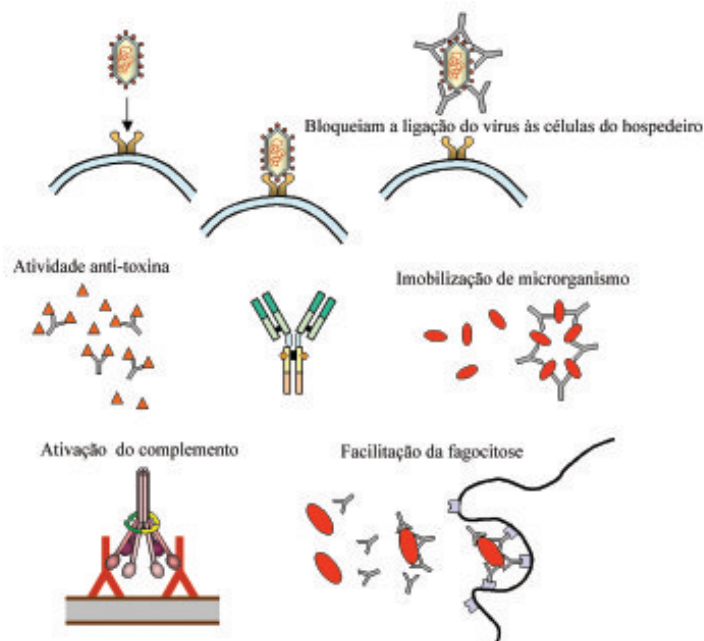
O processo de ativação, através do contato dos macrófagos com as células CD4+Th1, gera uma série de ações bioquímicas que convertem o macrófago numa potente célula anti bacteriana. Estas reações são: fusão do fagossomo com o lisossomo, expondo as bactérias às enzimas lisossomais; aumento da expressão de MHC de classe I e classe II; expressão de receptor de TNF- $\alpha$  e secreção de TNF- $\alpha$ , que junto com o IFN-  $\gamma$ , sinergiza para o aumento da ação bactericida, resultando na produção de óxido nítrico (NO) e oxigênio reativo ( $O_2$ ); secreção de IL-12, que orienta a diferenciação de células Th0 para Th1; e secreção de IL-10, que inibe a produção de IFN- $\gamma$  e serve para amortecer os efeitos lesivos da ativação exacerbada de macrófagos nos tecidos. Quando um patógeno resiste aos efeitos iniciais da resposta imune celular, pode-se evoluir para uma inflamação crônica, consistindo intenso infiltrado mononuclear e proliferação de tecido conjuntivo característico de inflamação inespecífica ou por um padrão de inflamação crônica que se distingue pela formação de granuloma que se caracteriza por agregados de macrófagos ativados, os quais assumem uma aparência epitelióide circundados por linfócitos T. Frequentemente, mas não invariavelmente, células gigantes multinucleadas, que derivam da fusão de vários macrófagos, são encontradas em granulomas mais antigos. As células CD4 Th1 e Th2 participam regulando tais granulomas com produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, prevenindo a disseminação dos patógenos e lesões tissulares.



### 8.3. Resposta humoral

Muitas bactérias importantes nas doenças infecciosas humanas se multiplicam nos espaços extracelulares do organismo, e a maior parte dos patógenos intracelulares se dissemina de uma célula para outra através dos fluídos extracelulares. A resposta imune humoral conduz à destruição dos microrganismos extracelulares e seus produtos, como, por exemplo, as toxinas; além de também prevenir ou diminuir a disseminação das infecções intracelulares, através da **neutralização** desses agentes. Os anticorpos também facilitam o reconhecimento de microrganismos por células fagocitárias, permitindo que assim sejam ingeridos e digeridos, como ativam o **sistema complemento**, potencializando a opsonização, recrutando células inflamatórias para o local da infecção e lisando certos microrganismos pela formação dos poros em suas membranas (Figura 16).

Figura 16. Alguns mecanismos efetores da resposta mediada por anticorpos



Nesta resposta, a ativação das células B e sua diferenciação em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas é deflagrada pelo antígeno específico e requer a participação de células CD4 Th2 (Figura 14), que também controlam a mudança de isotipo e desempenham papel importante na hipermutação somática, o que é necessário para a maturação da afinidade dos anticorpos, que ocorre no curso da resposta humoral. A imunoglobulina de superfície funciona como receptor de antígenos, ou BCR, e realiza dois papéis na ativação: a transdução de sinal direto para o interior da célula, quando se une ao antígeno e a condução desses antígenos aos sítios intracelulares, para ser degradado e levado à superfície do linfócito B, onde, por sua vez, são reconhecidos por CD4 Th2 antígenos específicos. Esta resposta dependente da célula T é chamada de **timo-dependente (TD)**. Porém, alguns antígenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, podem ativar diretamente linfócitos B, e tal resposta é chamada de **timo-independente (TI)**.

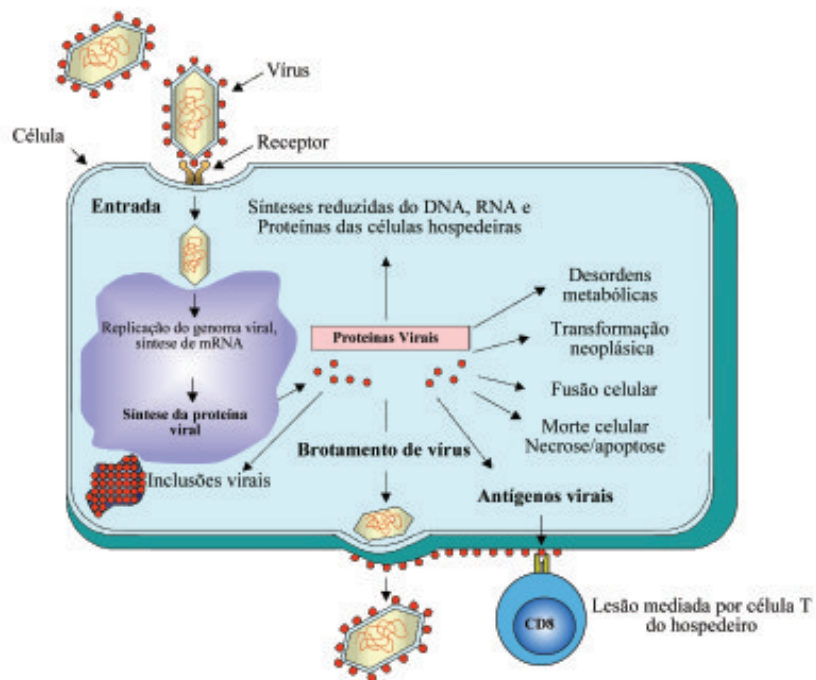
Anticorpos de alta afinidade neutralizam toxinas, vírus e bactérias. Mas, podem não resolver o problema, pois muitos agentes não são neutralizados pelos anticorpos e devem ser removidos por outros meios. Assim, o papel dos anticorpos nestas situações é ativar outras células (células efetoras acessórias), que tenham receptores para Fc de Imunoglobulina. Dentre essas, podemos citar macrófagos e neutrófilos, que ingerem bactérias recobertas por IgG; assim como as NK, que lisam diretamente parasitos recobertos por IgG; e ainda células infectadas com vírus, recobertas também com IgG. Tal fenômeno acontece por um mecanismo denominado citotoxicidade celular, dependente de anticorpo (ADCC). Além da ADCC, via IgG, exercida pela NK, o mesmo fenômeno pode ser observado por meio da IgE, onde as células citotóxicas são os eosinófilos, e a importância da ADCC via IgE se deve ao fato de que alguns parasitos não são mortos diretamente por fagocitose, somente através dos mediadores liberados por estas células. A IgE também participa na sensibilização e ativação de mastócitos promovendo liberação de substâncias que dilatam vasos sanguíneos e recrutam células inflamatórias.

## 9. Resposta imune aos agentes infectoparasitários

O ambiente em que vivemos é povoado por muitas espécies de microrganismos onde uma pequena parcela tem a capacidade de causar doenças. O sistema imune evoluiu no sentido de promover ações que resultem na defesa contra estes microrganismos, contribuindo para a recuperação e manutenção da homeostase. Os agentes infectoparasitários diferem em sua patogenicidade e virulência. A patogenicidade refere-se à capacidade de um organismo causar doença, e a virulência é o grau de patogenicidade. Portanto, a patogenicidade depende das características do agente, do estado imunitário do hospedeiro e dos determinantes socioambientais. Em indivíduos com sistema imunitário normal, os agentes infectoparasitários devem ser suficientemente virulentos para se estabelecer e causar infecção. Por outro lado, indivíduos com sistema imunitário debilitado, agentes pouco virulentos, tais como os comensais, podem causar lesões graves. Neste tópico serão abordados os principais mecanismos de resposta às ações dos vírus, bactérias, protozoários e helmintos que parasitam o organismo humano.

Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, que se replicam no interior das células e podem causar lesão tecidual e doença, por vários mecanismos (Figura 17). A replicação viral interfere com a síntese e com as funções normais das proteínas celulares, levando à lesão da célula infectada e à morte. Este é o efeito citopático, e se diz que a infecção é lítica. Vírus não citopáticos podem causar infecções latentes, durante as quais residem nas células do hospedeiro e produzem proteínas estranhas ao mesmo tempo em que estimulam a imunidade específica. Em decorrência, as células infectadas são reconhecidas e mortas pelas células CTL. As proteínas virais também podem estimular as reações de hipersensibilidade tardia (DTH), e a lesão celular é uma consequência direta das respostas imunes fisiológicas contra os vírus.

Figura 17. Mecanismos pelos quais os vírus lesionam as células



Os principais mecanismos de imunidade inata aos vírus envolvem a estimulação direta de IFN  $\alpha/\beta$  pelas células infectadas, que funcionam inibindo a replicação viral e lise das células infectadas pelas células NK. Além desses mecanismos, a ativação do sistema complemento e a fagocitose servem para eliminar vírus de locais extracelulares. Na imunidade específica, combina-se a resposta celular com a resposta humoral. Os anticorpos específicos se ligam às proteínas do envelope ou do capsídeo, impedindo a fixação do vírus na célula hospedeira e, conseqüentemente, impedindo sua penetração (Figura 16). Além disso, os anticorpos IgG opsonizantes também podem potencializar a remoção pela fagocitose (Figura 16) ou destruição das células infectadas através da ADCC via células NK. Embora os anticorpos sejam importantes na imunidade contra vírus, eles não são suficientes para eliminar infecções virais.

Contudo, o principal mecanismo contra uma infecção viral estabelecida é através de uma resposta celular via CD8+ citolíticos específicos, que destroem as células infectadas, estimulam a ação de enzimas intracelulares que degradam genomas virais e secretam citocinas com ação de interferon.

As bactérias extracelulares causam doença de duas maneiras: induzindo reação inflamatória que resulta na destruição tecidual no local da infecção e produzindo toxinas, que possuem diversos efeitos patológicos. Estas podem ser **endotoxinas** (componentes da parede celular bacteriana) ou **exotoxinas** (ativamente secretadas pelas bactérias). Portanto, as respostas imunes contra bactérias extracelulares visam eliminar a bactéria e o efeito de suas toxinas.

O principal mecanismo de imunidade inata é a fagocitose por neutrófilos, monócitos e macrófagos, mas a resistência destas bactérias à fagocitose e a sua digestão é um determinante na virulência. A ativação do sistema complemento na ausência do anticorpo é importante, pois a produção de C3b opsoniza a bactéria e favorece a fagocitose. O MAC lisa diretamente a bactéria e os subprodutos do complemento (fragmentos menores), que participam da resposta inflamatória recrutando e ativando leucócitos. A imunidade humoral específica é a principal resposta protetora contra essas bactérias e consiste do reconhecimento de antígenos proteicos por células CD4+ Th2, apresentados via MHC de classe II. Os anticorpos específicos, além de neutralizarem bactérias e suas toxinas, impedindo sua ligação às células alvo, ativam o sistema complemento potencializando suas ações.

Quanto às bactérias que sobrevivem no interior de células hospedeiras, as mais patogênicas são aquelas que sobrevivem no interior dos macrófagos, como as microbactérias. Por serem praticamente inacessíveis aos anticorpos, sua eliminação requer mecanismos diferentes daqueles observados para bactérias extracelulares. O principal mecanismo de imunidade inata contra essas bactérias é através da fagocitose, mas estas podem ativar diretamente ou indiretamente células NK, que promovem uma defesa precoce contra bactérias intracelulares

antes da resposta específica. A principal resposta específica contra essas bactérias é a resposta celular, com atuação de células Th1 (CD4+ e/ou CD8+) que estimulam os macrófagos a produzirem diversas substâncias bactericidas. Desta maneira, as células CD4+ Th1 e CD8+ Th1 atuam em conjunto na resposta celular contra bactérias intracelulares e o mecanismo exercido por uma pode complementar o da outra. É importante salientar que a ativação de macrófagos também pode causar lesão tecidual, manifestada pela reação de hipersensibilidade tardia (DTH ou HT), assim como as observadas nas infecções virais e em outros agentes infectoparasitários.

Em termos muito genéricos, os anticorpos são mais eficazes contra os parasitos extracelulares e os CTLs, contra os intracelulares. Em outras palavras, as citocinas produzidas pelas células T CD4+ podem ser importantes na determinação do resultado da infecção, uma vez que as células Th1 e Th2 possuem um perfil de citocinas contrastante e de contrarregulação, mostrando que o papel das células Th1 e Th2 na determinação do resultado da infecção sugere que as respostas das células Th1 levem à morte dos patógenos intracelulares e que as respostas das células Th2 eliminem os patógenos extracelulares. Todavia, isto é muito mais uma simplificação didática do que o quadro real.

O tipo de resposta que conferirá maior proteção depende da natureza e da fase evolutiva do parasito. Por exemplo, o anticorpo por si só, ou combinado com o complemento, pode danificar alguns parasitos extracelulares, mas será sempre melhor quando atuando com uma célula efetora. Diferentes mecanismos efetores atuarão em uma única infecção contra os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. Assim, na malária, os anticorpos contra as formas livres bloqueiam sua capacidade para invadir novas células, mas as respostas mediadas por células impedem o desenvolvimento da fase hepática nos hepatócitos. A imunidade protetora na malária não se correlaciona simplesmente com os níveis de anticorpos e pode até ser induzida na ausência deles.

O parasito precisa superar os mecanismos de defesa preexistentes no hospedeiro, para que possa se estabelecer com sucesso antes da iniciação da resposta imune específica do hospedeiro. O complemento exerce um papel nesta fase, uma vez que vários tipos de parasitos, incluindo os vermes adultos e as larvas infectantes, possuem moléculas em sua superfície de revestimento que ativam a via alternativa. Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas constituem a primeira linha de defesa. Anticorpos e citocinas, produzidos especificamente em resposta aos antígenos parasitários, potencializam as atividades antiparasitárias de todas estas células efetoras. Entretanto, os macrófagos teciduais, monócitos e granulócitos possuem alguma atividade intrínseca antes mesmo da potencialização.

Os tripanossomos e os parasitos da malária (plasmódios) que penetram no sangue são removidos da circulação por células fagocíticas no fígado e no baço. Antes de agirem como células apresentadoras de antígenos na iniciação de uma resposta imune, os macrófagos atuam como células efetoras que inibem a multiplicação dos parasitos ou até mesmo os destroem. Estas células também secretam moléculas que regulam a resposta inflamatória e potencializam a imunidade através da ativação de outras células. A fagocitose pelos macrófagos fornece uma defesa importante contra os parasitos menores; entretanto, estas células também secretam muitos fatores tóxicos que permitem a destruição dos parasitos sem a internalização. Quando ativados pelas citocinas, os macrófagos podem destruir parasitos extracelulares relativamente pequenos, como os estágios eritrocitários do plasmódio, e também os parasitos maiores, como os estágios larvais do esquistossomo. Os macrófagos também atuam como células exterminadoras através da ADCC.

A ativação dos neutrófilos e macrófagos é uma característica geral dos estágios iniciais da infecção. Todas as funções efetoras dos macrófagos são potencializadas logo após a infecção. Embora sua ativação específica seja induzida por citocinas secretadas pelas células T, como  $\text{IFN}\gamma$ , GM-CSF, IL-3 e IL-4,

mecanismos T-independentes também podem ativá-los. Neste caso, células NK secretam  $IFN\gamma$  quando estimuladas pela IL-12 produzida pelos macrófagos.

As propriedades efectoras exibidas pelos macrófagos também podem ser apresentadas pelos neutrófilos. Os neutrófilos são células fagocíticas que podem destruir os agressores, seja por mecanismos dependentes de oxigênio, seja por independentes, como o óxido nítrico. Os neutrófilos produzem uma explosão oxidativa mais intensa do que os macrófagos e seus grânulos secretores contêm proteínas altamente citotóxicas. A destruição extracelular pelos neutrófilos é mediada por  $H_2O_2$ , enquanto os componentes granulares estão envolvidos na destruição intracelular dos organismos internalizados. Os neutrófilos estão presentes nas lesões inflamatórias causadas por parasitos e provavelmente atuando na eliminação desses parasitos das células rompidas. Como os macrófagos, os neutrófilos possuem receptores para Fc e receptores para complemento e podem participar das reações citotóxicas dependentes de anticorpo, a fim de destruir as larvas de *Schistosoma mansoni*, por exemplo. Dessa forma, os neutrófilos são mais destrutivos do que os eosinófilos para várias espécies de nematódeos, embora a eficácia relativa dos dois tipos celulares possa depender do isótipo e da especificidade do anticorpo.

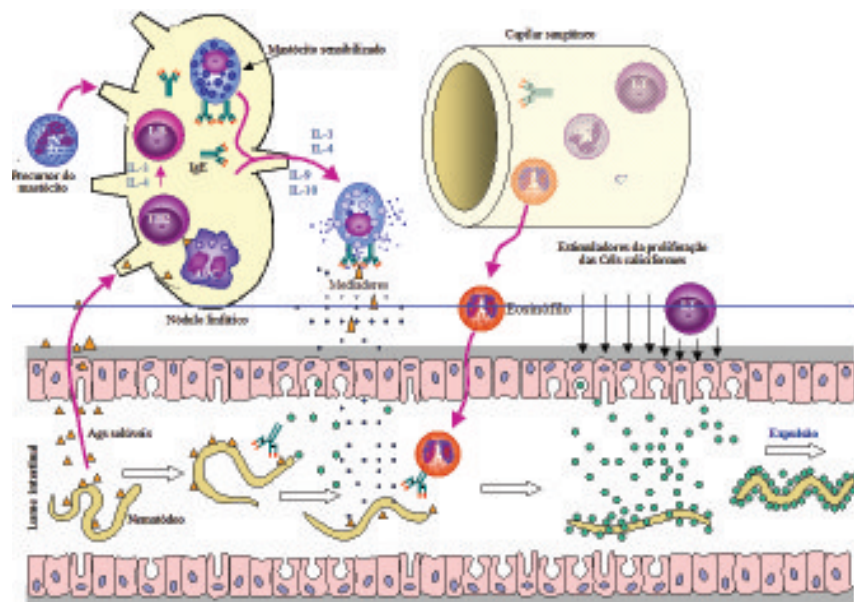
Os eosinófilos estão associados a infecções helmínticas e se encontram envolvidos especificamente na defesa contra os estágios teciduais de helmintos, que são grandes demais para serem fagocitados. A reação do mastócito dependente de IgE consta primariamente em localizar os eosinófilos próximos ao parasito e, então, potencializar suas funções antiparasitárias.

Os eosinófilos são células de menor potencial fagocítico perante os neutrófilos, no entanto, sofrem um processo de desgranulação em resposta a distúrbios em sua membrana celular, liberando o conteúdo granular sobre a superfície dos parasitos. O dano aos helmintos pode ser causado pela proteína básica principal (MBP). A MBP não é específica para um determinado alvo, mas o dano às células do hospedeiro é muito pequeno, uma vez que a



proteína fica confinada a um espaço diminuto entre o eosinófilo e o verme. Os eosinófilos e os mastócitos podem agir em conjunto na destruição das larvas de helmintos, onde os produtos dos mastócitos potencializam a ação dos eosinófilos. Desta forma, os antígenos liberados provocam desgranulação local dos mastócitos dependentes de IgE e a liberação de mediadores, que atraem seletivamente os eosinófilos para o local, potencializando ainda mais suas atividades (Figura 18).

Figura 18. Expulsão de helmintos parasitos do lume intestinal



A resposta imune contra *Trypanosoma cruzi* depende não apenas das células T CD4+ e CD8+, mas também das NK e da produção de anticorpos. O mesmo é verdadeiro para a resposta imune contra o *Toxoplasma gondii*. As células NK, estimuladas pela IL-12 secretadas pelos macrófagos, constituem outra fonte de IFN $\gamma$ . As infecções crônicas normalmente estão associadas com produção reduzida de IFN $\gamma$  e provavelmente explicam a alta incidência de

tuberculose e toxoplasmose em pacientes com AIDS, os quais possuem números reduzidos de células T CD4+.

Em algumas infecções parasitárias, o sistema imunitário não consegue eliminar o parasito, mas reage isolando o organismo com células inflamatórias. O hospedeiro reage ao antígeno localmente, o que estimula a liberação de citocinas, que por sua vez recrutam as células de defesa para o local afetado. Na esquistossomose, a formação do granuloma é outro exemplo da reação do hospedeiro contra o parasito. Essa reação é uma resposta crônica mediada por células aos antígenos solúveis liberados pelos ovos do parasito no fígado. Os macrófagos se acumulam no local e liberam fatores fibrogênicos que estimulam a formação do tecido granulomatoso. Embora essa reação possa ser benéfica para o hospedeiro, no sentido que isola as células hepáticas das toxinas secretadas pelos ovos dos helmintos, também constitui a maior fonte de dano, provocando alterações irreversíveis no fígado e perda da função hepática.

Em muitas infecções a distinção entre uma resposta mediada por células ou por anticorpo pode ser difícil, dado que ambas atuam em conjunto contra o parasito. A expulsão de alguns nematódeos intestinais ocorre espontaneamente poucas semanas após a infecção primária. Parece haver dois estágios na expulsão, alcançados por uma combinação de mecanismos T-dependentes e T-independentes. Células T (predominantemente Th2) respondem aos antígenos do parasito e induzem a produção de anticorpo pelas células que sofreram proliferação. Ocorre proliferação dos mastócitos da mucosa e hiperplasia das células caliciformes secretoras de muco no epitélio intestinal. Os vermes são danificados por anticorpo e produtos dos mastócitos sensibilizados por IgE, que desgranulam após o contato com o antígeno e liberam a histamina que, por sua vez, aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal onde o verme se encontra. Esses processos não são suficientes para eliminar os vermes; portanto, moléculas inflamatórias inespecíficas, secretadas pelos macrófagos, incluindo TNF e IL-1, contribuem para a proliferação das células caliciformes e

provocam aumento na secreção de muco. O muco reveste os vermes e leva à sua expulsão.

Existem inúmeros exemplos de estratégias físicas simples e protetoras nos parasitos. Os nematódeos possuem uma cutícula extracelular espessa que os protege da agressão tóxica. O tegumento dos esquistossomos sofre um espessamento durante a maturação, oferecendo uma proteção semelhante. A superfície frouxa de revestimento de muitos nematódeos pode se desintegrar sob o ataque imune.

A maioria dos parasitos interfere na resposta imune e a imunossupressão é uma característica universal da infecção parasitária, comprometendo tanto as respostas mediadas por anticorpo como as mediadas por células.

Os antígenos solúveis dos parasitos, quando liberados em enormes quantidades, podem prejudicar a resposta do hospedeiro por um processo denominado “distração imune”. Assim, os antígenos solúveis de vários agentes infectoparasitários parecem inativar os anticorpos circulantes, fornecendo uma “cortina de fumaça” e desviando o anticorpo do parasito. Muitos destes antígenos de superfície liberados são formas solúveis de moléculas inseridas na membrana do biopatógeno.

Além dos efeitos destrutivos diretos de alguns parasitos e de seus produtos aos tecidos do hospedeiro, muitas respostas imunes, por si só, possuem efeitos patológicos. Na malária, na tripanossomose e na leishmaniose visceral, o número e a atividade aumentados dos macrófagos e linfócitos, no fígado e no baço, levam ao aumento de tamanho destes órgãos. Na esquistossomose, grande parte da patologia resulta dos granulomas dependentes de linfócitos que se formam ao redor dos ovos no fígado. As alterações significantes que ocorrem nos indivíduos com elefantíase são provavelmente resultado de respostas imunopatológicas às larvas adultas nos linfáticos. A formação de complexos imunes é comum, eles podem ser depositados nos rins, como na síndrome nefrótica da malária, e podem dar origem a várias outras alterações patológicas.

A IgE das infecções helmínticas pode promover desde efeitos brandos à reações severas no hospedeiro, por meio da liberação de mediadores pelos mastócitos, caracterizados por pruridos, eritemas, dificuldades respiratórias ou mesmo choque anafilático.

## **10. Aplicação e importância do diagnóstico imunossorológico das doenças infecto parasitárias**

○ diagnóstico sorológico das doenças transmissíveis consiste na investigação da infecção no indivíduo ou na população, mediante a detecção, quantificação e caracterização de variáveis (imunoglobulinas, antígenos, citocinas) presentes no plasma/soro sanguíneo ou em outros materiais biológicos, tais como amostra fecal, urina, saliva, escarro ou tecidos.

○ desenvolvimento de novas informações científicas está relacionado com os progressos na metodologia pelo desenvolvimento de novos procedimentos, novas técnicas ou instrumentos. Os primeiros métodos de identificação e medida de imunoglobulinas foram desenvolvidos por *Von Behring & Kitasato*, influenciados pelos experimentos de Pasteur sobre a Teoria dos Germes, ao encontrarem no soro de animais imunizados contra difteria e tétano, substâncias neutralizantes e específicas que denominaram *anticorpos*. As pesquisas desenvolvidas por vários cientistas se voltaram imediatamente para a caracterização bioquímica dessas substâncias neutralizantes e o desenvolvimento de técnicas capazes de induzir a formação de elevadas concentrações de anticorpos em animais de laboratório. Este foi o período fundador do diagnóstico sorológico.

Neste tópico, as técnicas sorológicas serão abordadas, principalmente, sob o ponto de vista dos profissionais que realizam o diagnóstico sorológico das doenças infectoparasitárias.

### 10.1. Aplicações dos testes sorológicos

Os testes sorológicos vêm sendo constantemente empregados para auxiliar na confirmação diagnóstica das suspeitas clínicas de infecções, permitindo a obtenção de resultados em curto espaço de tempo, em função de algumas características que incluem a simplicidade de execução, baixo custo operacional e a possibilidade de automação. Suas contribuições, entretanto, são inestimáveis, principalmente quando o patógeno, ou seus produtos, dificilmente podem ser demonstrados nos fluidos biológicos ou na estrutura hística do hospedeiro.

Estes métodos são utilizados na qualificação e quantificação de diversos componentes, incluindo antígenos, anticorpos, imunocomplexos, enzimas e hormônios, entre outras moléculas relacionadas ao processo inflamatório. O conhecimento dos fundamentos gerais para adequada aplicação e criteriosa interpretação dos resultados exige que estas técnicas sejam realizadas por profissionais bem treinados, a fim de se prevenir a ocorrência dos falsos resultados, que conduzem para o diagnóstico e tratamento incorretos dos pacientes.

O método sorológico pode ser **qualitativo** ou **quantitativo**. O método qualitativo indica uma resposta do tipo “ou tudo ou nada”, por exemplo: aglutinou ou não aglutinou, infectado ou não infectado. O ensaio quantitativo mede a concentração de antígeno ou anticorpos, podendo ser expressa sob a forma de cruzes, titulações, densidades óticas em reações fotolorimétricas ou outras unidades de medida que se aplicam. A expressão do resultado sob a forma de cruzes, ou por titulações, que correspondem a maior diluição em que ainda se observa a reação antígeno-anticorpo, é bastante subjetiva, por retratar a intensidade de uma reação determinada visualmente por critérios pessoais. A utilização de aparelhos que realizam a leitura automática das reações sorológicas traduz em números os resultados obtidos de maneira visual, reduzindo, por um lado, a probabilidade dos erros, mas por outro, elevando (em alguns casos) o custo do exame laboratorial.

## 10.2. A importância do diagnóstico individual

O indivíduo sintomático ou assintomático com níveis de anticorpos específicos detectáveis é denominado **soropositivo**. Aquele que não possui anticorpos detectáveis é o **soronegativo**. No caso do indivíduo diagnosticado soronegativo (em uma primeira análise), que ao reavaliar a primeira amostra junto com uma segunda, de coleta mais recente (processo conhecido como **sorologia pareada**), e no caso de resultado da primeira amostra se repetir e a segunda resultar positiva, diz-se que ocorreu **soroconversão**. O diagnóstico individual normalmente se realiza com a finalidade de elucidar processos patológicos com sinais e sintomas comuns a várias doenças, procedimento este denominado **diagnóstico diferencial**. Como exemplos, podem-se distinguir sorologicamente doenças como a leishmaniose tegumentar difusa e a hanseníase lepromatosa, a leishmaniose visceral e a hepatite viral, a hepatite B e a hepatite C, a toxoplasmose e a rubéola, entre outras.

Em algumas situações torna-se importante determinar a **fase clínica da doença**, principalmente aquelas em que os patógenos possuem habilidade para atravessar a barreira placentária e gerar embriopatias ou fetopatias. A presença de anticorpos específicos é uma evidência da exposição atual ou anterior aos agentes infecciosos, caracterizada pela diversidade funcional das várias classes de imunoglobulinas e a ordem em que se apresentam nos fluidos biológicos. Determinada por fatores genéticos, a IgM, regra geral, é a primeira a apresentar níveis que possibilitam a detecção após estímulo imunogênico e caracterizar fase inicial na maioria das infecções. O seu decréscimo é compensado pelo surgimento da IgG, normalmente encontrada ao final de um processo agudo, permanecendo durante a fase crônica, e podendo ser detectada durante longo período no plasma do hospedeiro, mesmo após a cura, como imunoglobulina de memória. Nor-

malmente, nas solicitações de exame laboratorial, pedem-se a pesquisa de IgM e IgG específicas. Porém, em infecções recentes por *Toxoplasma gondii* ou por citomegalovírus, a IgM e IgG podem eventualmente resultar negativas, mas a IgA positiva pode corrigir falhas no diagnóstico. Por estas razões, imunoglobulinas como a IgE e a IgA específicas têm sido pesquisadas e utilizadas com maior precisão na determinação de fase inicial das infecções, uma vez que possuem vida média menor e permanecem na circulação após o início do processo infeccioso, por um período ainda mais curto que o da IgM.

Os testes sorológicos são também utilizados para verificação do potencial de virulência e de invasividade dos enteroparasitos. A *Entamoeba histolytica*, por exemplo, enquanto parasita o lume intestinal, parece não induzir, ou pouco induz, a formação de anticorpos específicos. Por outro lado, a ulceração, a penetração tecidual e a conseqüente multiplicação e disseminação deste parasito no hospedeiro, pode proporcionar elevados títulos de IgG anti ameba no plasma sanguíneo, facilmente detectáveis.

Além das imunoglobulinas, as **Proteínas de Fase Aguda (PFA)**, presentes normalmente em baixas concentrações no plasma sanguíneo, alteram-se em resposta aos estímulos inflamatórios após lesão tecidual ou infecção. Em linhas gerais, as PFA constituem um vasto número de proteínas plasmáticas de origem hepática, cuja síntese aumenta em 25% ou mais e podem ser classificadas em função do incremento de sua produção após estímulo inflamatório (Quadro 1). Tradicionalmente, a quantificação da **Proteína C Reativa (PCR)** na prática clínica tem vários objetivos, entre eles, a avaliação da extensão e a atividade da inflamação, o que permite o acompanhamento do processo patológico, diferenciação entre doença inflamatória e não inflamatória e estimativa de seu respectivo prognóstico.

Quadro 1. Características cinéticas das proteínas de fase aguda

Proteínas de fase aguda	Tempo de resposta entre estímulo e elevação dos níveis plasmáticos	Peso molecular (kDa)
<b>Grupo 1:</b> aumenta menos de uma vez		
Ceruloplasmina	48-72 horas	132
C3	48-72 horas	180
C4	48-72 horas	206
<b>Grupo II:</b> aumenta de duas a quatro vezes		
a-1 - glicoproteína ácida	24 horas	41
a-1 - antitripsina	10 horas	54
a-1 - antiqumotripsina	10 horas	68
Haptoglobina	24 horas	86
Fibrinogênio	24 horas	340
<b>Grupo III:</b> aumenta acima de cinco mil vezes		
Proteína C reativa	6-10 horas	110
Encefalites viróticas, citomegalia, herpes sistêmica e tuberculose Amiloide sérico A	2-10 horas	180

Os testes sorológicos também são utilizados para **selecionar** doadores e receptores de sangue e de órgãos, não só no contexto de quem desempenha a determinação de grupos sanguíneos ou antígenos de histocompatibilidade, como também para quem se compromete na detecção e prevenção de doenças infecciosas transmissíveis por meio da transfusão sanguínea e hemoderivados, como tecidos e órgãos transplantados. No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu estratégias de controle apoiadas na triagem clínica, epidemiológica e sorológica para prevenção das doenças transfusionais, que incluem a doença de Chagas, a sífilis, as hepatites B e C, a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), o vírus da leucemia T do adulto (HTLV-I e II), em todo o território nacional, e a malária, em regiões endêmicas. As condições que constituem contraindicação absoluta para doação de órgãos, relacionadas às doenças infecciosas, além das empregadas na prevenção de doenças transmissíveis por meio da transfu-



são sanguínea e hemoderivados, incluem avaliação laboratorial de septicemia bacteriana ou fúngica, ativa.

As moléculas liberadas pelo parasito e os anticorpos correspondentes encontrados no hospedeiro são chamados de **marcadores sorológicos**. Estes marcadores podem ser utilizados para avaliar o **prognóstico de doenças** e alguns marcadores indicam evolução para **cura**, enquanto outro **agravamento**. Baseando-se nestes princípios, pode-se avaliar a **eficácia terapêutica**.

Os anticorpos protetores, induzidos por parasitos em processos infecciosos ou por vacinas, podem ser pesquisados e utilizados como marcadores para avaliar a **imunidade específica**, naturalmente adquirida ou artificialmente induzida por vacinas. Os testes sorológicos realizados em paciente pré-natal são de fundamental importância na pesquisa de doenças congênitas, como a toxoplasmose, a sífilis, a citomegalia, entre outras; e na avaliação da imunidade específica, principalmente para doenças imunopreveníveis com a aplicação de vacinas (hepatite B, rubéola, difteria, tétano).

### 10.3. A importância do diagnóstico coletivo

A aplicação dos testes sorológicos em inquéritos epidemiológicos denomina-se **soroepidemiologia** e serve para estimar a **soroprevalência**, que corresponde ao número de indivíduos positivos em um período de tempo determinado, sem distinguir os casos novos dos antigos. Como a soroprevalência está intimamente relacionada com a taxa de infecção e a permanência dos anticorpos circulantes, este indicador auxilia nos seguintes propósitos em relação às doenças infectoparasitárias: estabelecer prevalência sorológica, identificar os principais problemas sanitários, estabelecer prioridades de vacinação, demarcar a distribuição e verificar a erradicação de doenças, verificar a reintrodução de doenças em áreas consolidadas, determinar a periodicidade das epidemias, avaliar as campanhas de vacinação,

investigar enfermidades descobertas recentemente (doenças emergentes) e estimar as perdas econômicas atribuídas à enfermidade.

Testes sorológicos também são aplicados na análise do conteúdo intestinal de insetos hematófagos, para identificação das fontes alimentares dos vetores envolvidos na transmissão de doenças. Estabelecer o padrão alimentar dos insetos hematófagos é de grande importância para o entendimento de sua biologia, além de possuir valor fundamental para a Saúde Pública, no delineamento de estratégias de controle de vários agravos gerados por esses vetores.

## **11. Fundamentos gerais do imunodiagnóstico**

A pesquisa laboratorial da resposta imune pode ser empregada para a verificação da resposta humoral e da resposta celular. A pesquisa da resposta humoral pode ser realizada de duas maneiras. Uma dessas maneiras refere-se ao emprego de anticorpos específicos para identificar um antígeno parasitário ou outras substâncias que desempenham o papel de antígenos na reação, tais como drogas, hormônios, ácidos nucleicos, citocinas, receptores de células, etc. Uma outra maneira é a detecção de anticorpos específicos na amostra a ser testada, passível de determinar se um indivíduo foi exposto a um organismo específico. A medida das interações entre antígeno-anticorpo com o propósito de diagnóstico é conhecida como **imunoserologia**.

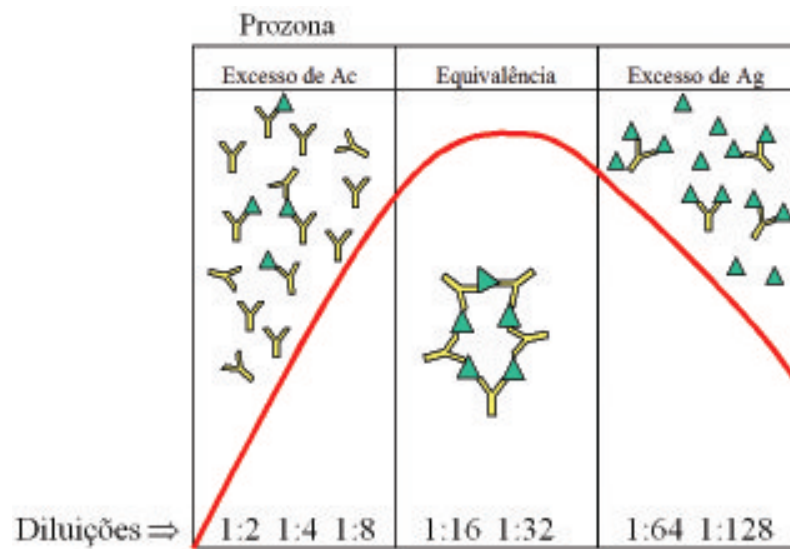
As técnicas imunossorológicas fundamentam-se na natureza da interação antígeno-anticorpo, nas quais podem expressar-se de duas formas distintas, em decorrência da utilização de imunorreagentes livres de marcação ou de reagentes marcados. As técnicas em que não se empregam marcadores demonstram-se por fenômenos visíveis. Portanto, ao se combinar anticorpos com antígenos solúveis, os complexos resultantes podem

formar precipitados insolúveis. Se os antígenos são particulados (bactérias, protozoários, hemácias), os anticorpos os aglutinam. Se o anticorpo pode ativar a via clássica do sistema complemento e o antígeno se encontra em uma superfície celular, o resultado pode ser a citólise. As técnicas que empregam imunorreagentes marcados caracterizam-se pela simples combinação do antígeno com o anticorpo, necessitando que um deles esteja marcado convenientemente. O imunorreagente pode ser marcado com corantes fluorescentes ou quimioluminescentes, radioisótopos, enzimas, ouro ou prata coloidais, entre outros marcadores.

### 11.1 Reações de precipitação

As reações de precipitação ocorrem entre antígenos solúveis e seus anticorpos correspondentes, com formação de agregados insolúveis que se precipitam. Os determinantes mais importantes das reações de precipitação consistem nas concentrações relativas de antígeno e anticorpo. Esta relação é ilustrada esquematicamente na Figura 19. Ocorre precipitação máxima quando a quantidade de antígenos e de anticorpos são equivalentes (zona de equivalência), com quantidades decrescentes nas zonas de excesso de antígeno ou excesso de anticorpo. O fenômeno de **prozona** refere-se à precipitação subótima, invisível aos nossos olhos, que ocorre na região de excesso de anticorpo. Portanto, é necessário que diluições de antissoros reajam com quantidades fixas de antígeno a fim de obter o máximo de linha de precipitação. O fenômeno de prozona pode ser responsável pelo aparecimento de resultados falso-negativos em outros testes sorológicos, além dos testes de precipitação, como nas reações de aglutinação. Existem vários sistemas disponíveis para a prática da reação de precipitação, dentre estes, destacam-se a precipitação em meios líquidos, meios semissólidos, como ágar ou agarose, e outros suportes, tais como o acetato de celulose.

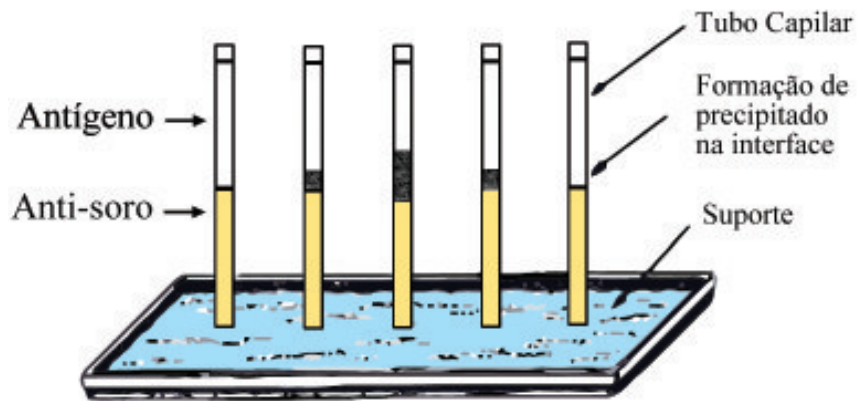
Figura 19. Curva de formação de imunocomplexos visíveis



### 11.2. Reação de precipitação em meio líquido

Conhecida também como técnica da precipitina ou técnica do anel, a reação de precipitação em meio líquido (Figura 20) consiste em se colocar em tubos de ensaio ou em tubos capilares uma solução de anticorpos conhecidos (soro hiperimune) e sobre ela se adicionar, cuidadosamente, a solução antigênica que se deseja pesquisar, de modo a constituir-se uma interface entre ambas. As moléculas da solução antigênica irão difundir-se através da outra solução, formando um gradiente de concentração. Ao nível em que a equivalência antígeno/anticorpo for a ideal, se formará uma faixa de precipitado visível (um anel de turvação branco leitoso na interface).

Figura 20. Imunodifusão em meio líquido (Teste de Precipitina)



### 11.3. Reação de imunodifusão simples em meio semissólido

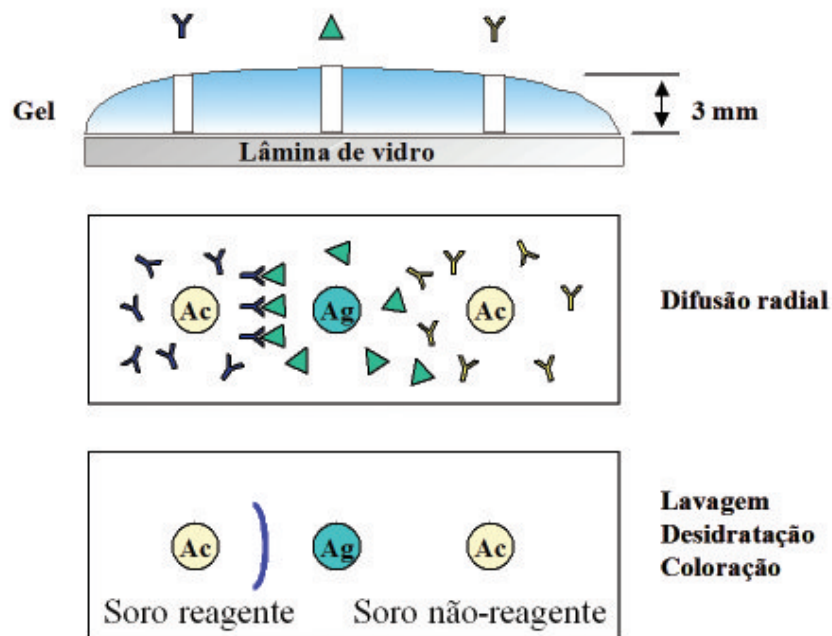
Neste sistema, também chamado imunodifusão unidirecional ou técnica de Oudin, a solução antigênica é sobreposta a uma coluna de ágar, em um tubo de 35 a 45 mm de altura contendo o soro hiperimune. As moléculas de antígeno penetram no gel e se difundem com velocidade característica para cada espécie molecular (coeficiente de difusão) influenciada pela concentração do gel. Ao final de certo tempo de difusão, que em geral é de uma semana, cada antígeno terá formado, com o seu anticorpo correspondente, um disco ou zona de precipitação.

### 11.4. Reação de imunodifusão dupla (imunodifusão de OUCHTERLONY)

Em uma delgada camada de gel sobre uma lâmina de vidro escavam-se pequenos orifícios. Em um deles, coloca-se soro ou plasma e, em outro orifício, coloca-se o antígeno. Um difunde em direção ao outro, formando precipitados brancos em forma de linhas ou arcos, também chamados de

bandas de precipitação (Figura 21). Quando a concentração de antígenos e anticorpos é muito pequena, as bandas não são visíveis, necessitando, nesse caso, que se use solução corante para proteínas. Quando necessário, corar o gel para visualizar as bandas deve-se retirar do gel os imunorreagentes que não formaram imunocomplexos (imunorreagentes solúveis) por processos de lavagem com solução fisiológica. O imunocomplexo (agregado insolúvel), em função do seu tamanho efetivo, fica retido nas malhas do gel, onde, em seguida, é submetido ao corante adequado, o que possibilita a visualização das bandas quando formadas. A velocidade de difusão de cada imunorreagente é regida pelas leis da difusão e depende da concentração e do tamanho dos poros do gel, da temperatura, da concentração do ágar e de sua pureza.

Figura 21. Representação esquemática da reação de imunodifusão dupla Ouchterlony.



### **11.5. Reação de imunodifusão radial simples (imunodifusão de MANCINI)**

Nesta técnica, o anticorpo específico para determinado antígeno é incorporado ao gel e distribuído sobre uma lâmina de vidro ou placa de Petri. Em posições adequadas, são feitos orifícios onde se colocam soluções antigênicas a serem testadas, bem como soluções padrão, com pelo menos três concentrações conhecidas do antígeno. A partir desse momento, ocorre difusão radial do antígeno, resultando na opacificação em forma circular (halo ou anel) em torno do orifício. O diâmetro deste anel de precipitação é proporcional à concentração do antígeno e, deste modo, a quantidade deste pode ser determinada por comparação com os diâmetros obtidos por padrões conhecidos por meio de uma curva de referência.

### **11.6. Reação de imunoeletroforese (método de GRABAR e WILLIAMS)**

A imunoeletroforese é uma técnica de imunoprecipitação em meio gelatinoso que combina a eletroforese com a imunodifusão radial. A técnica é realizada em duas etapas: na primeira, os antígenos são fracionados por eletroforese, enquanto na segunda etapa, ocorre a difusão dos antígenos contra o antissoro específico, presente nas canaletas abertas no gel. A reação antígeno-anticorpo nesse sistema é evidenciada pela formação de linhas ou bandas de precipitação no gel, correspondendo cada banda a um complexo imune específico.

### **11.7. Reação de imunoeletroforese unidimensional simples**

Também conhecida como eletroforese de foguete ou técnica de Laurell, a imunoeletroforese unidimensional utiliza antissoro específico para o antígeno, ou o anticorpo que se quer quantificar, incorporado ao gel de agarose, que é colocado em lâminas de vidro. Assim como na técnica de

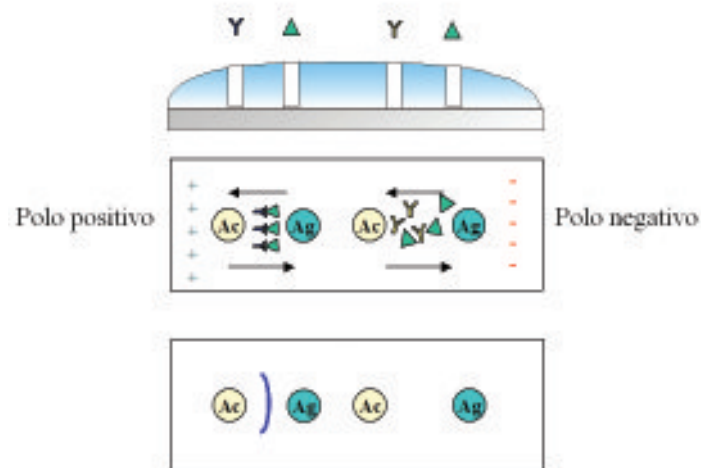
Grabar e Williams, o pH do gel é determinado de modo que a molécula a ser analisada fique com carga negativa, migre para o polo positivo e a substância incorporada não migre ao gel. As amostras a serem quantificadas, bem como os controles, são distribuídos em pequenos orifícios do gel e submetidos à eletroforese. A partir dos orifícios de aplicação, formam-se cones de precipitação, cujas extensões variam de acordo com as concentrações das substâncias pesquisadas. O padrão de precipitação se assemelha a um foguete, por se formar nas margens laterais do curso da migração eletroforética, até que se esgote a substância em análise, resultando na convergência das margens laterais em forma de ponta.

### **11.8. Reação de contraimunoeletroforese**

Também chamada de eletroimunodifusão dupla unidimensional. Nesta técnica, antígenos e anticorpos migram por eletroforese, simultaneamente, em direções opostas, a partir de orifícios separados do gel, no mesmo eixo, resultando na precipitação no ponto de encontro dos imunorreagentes entre os orifícios. Para a realização deste método, antígenos e anticorpos devem apresentar diferentes mobilidades eletroforéticas. Os anticorpos possuem propriedades de migrar para o polo negativo (cátodo) em um campo elétrico, enquanto os antígenos devem ser previamente tratados com solução tampão de pH adequado para otimizar os efeitos eletroendosmóticos que orientem sua migração para o polo positivo (ânodo). Este fenômeno pode ser induzido com o uso de tampões alcalinos (Figura 22). Este método permite a realização de várias análises em uma única lâmina, fornece resultados mais rápidos e mais sensíveis que a imunodifusão convencional e pode ser realizado em outros suportes, como o acetato de celulose.



Figura 22. Representação esquemática da reação de contraimunoeletroforese



### 11.9. Reações de aglutinação

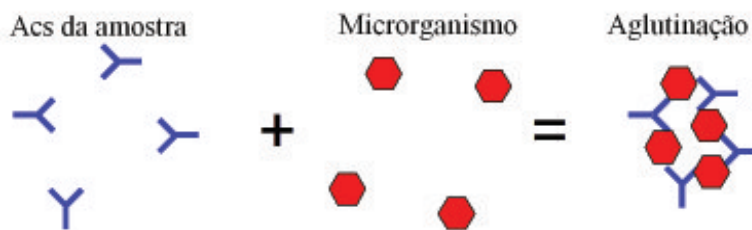
A aglutinação é a formação de redes de células ou partículas inertes (látex ou gelatina), interligadas por pontes moleculares de anticorpos, que se combinam simultaneamente com dois determinantes antigênicos nas superfícies de células ou partículas adjacentes.

### 11.10. Reação de aglutinação direta

A aglutinação direta é a formação de agregados suficientemente grandes que ocorre entre partículas insolúveis, em sua forma íntegra ou fragmentada, contendo antígenos naturais de superfície. Hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpos, os quais, sendo bivalentes, formam pontes, ligando determinantes antigênicos nas superfícies de partículas vizinhas. Para se detectar anticorpos específicos, diluições seriadas das amostras são postas para reagir junto a uma quantidade constante de antígeno. Após um período de incubação, a reação se concretiza

(Figura 23) e o resultado é geralmente expresso como título da amostra, ou seja, a máxima diluição em que ocorre aglutinação.

Figura 23. Representação esquemática da reação de aglutinação direta



#### 11.11. Reação de inibição da aglutinação direta de hemácias por antígenos virais

Diversos antígenos virais encontram receptores na superfície de hemácias, principalmente hemácias aviárias, e induzem sua aglutinação. Esta propriedade particular de muitos vírus é aproveitada para a titulação de anticorpos produzidos contra esses antígenos virais, na vigência dos processos infecciosos ou na convalescença, para fins diagnósticos e de segmento evolutivo.

Todas as reações de inibição baseiam-se na competição, seja de dois determinantes antigênicos semelhantes por um mesmo sítio de combinação ou de dois anticorpos diferentes por um mesmo determinante antigênico. A reação se efetua entre os imunorreagentes que formam o composto mais estável. Neste caso, o soro do paciente, contendo anticorpos específicos, em diluição seriada, é misturado a quantidades fixas de antígeno viral padronizado, sendo incubado a 37°C e, em seguida, as hemácias são adicionadas (Figura 24). Verifica-se até qual diluição houve neutralização, ou seja, inibição da propriedade aglutinante para hemácia.

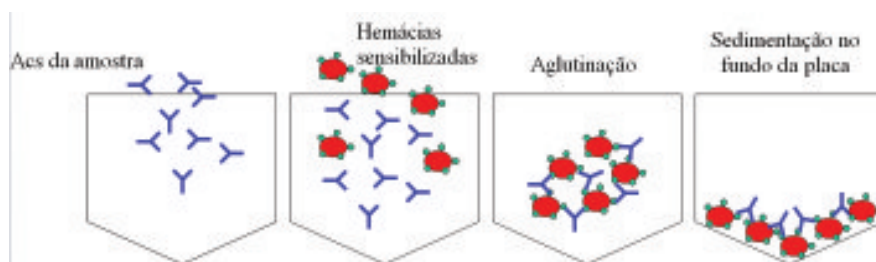
Figura 24. Representação da inibição da aglutinação viral das hemácias



### 11.12. Reação de aglutinação passiva de hemácias e suportes inertes

A reação se baseia na aglutinação de hemácias ou de partículas inertes (látex, gelatina) que funcionam como suporte, recobertas por um antígeno específico solúvel, em presença de amostra de soro ou plasma contendo os anticorpos correspondentes. A formação de pontes de anticorpos entre as partículas adjacentes indica a ocorrência da reação (Figura 25).

Figura 25. Esquema da reação de aglutinação passiva de hemácias e suportes inertes



### 11.13. Reação de inibição passiva de partículas inertes (látex)

Partículas de látex tendo antígenos ancorados à sua superfície podem ser aglutinadas pela formação de ponte anticórpica, do mesmo modo que a aglutinação direta de hemácias, como já foi exposto. No entanto, ao se

misturar antígenos solúveis aos soros contendo anticorpos, haverá bloqueio dos sítios de combinação das moléculas de anticorpo e inibição da aglutinação.

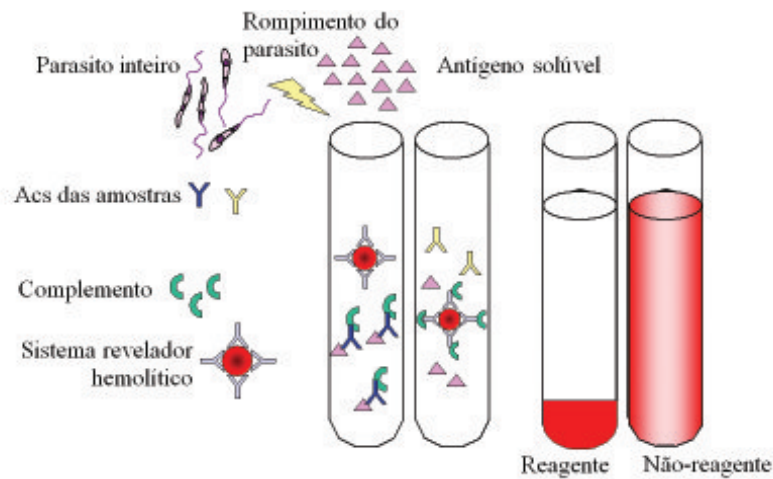
#### 11.14. Reação de fixação do complemento

A fixação do complemento ocorre após a interação antígeno-anticorpo. O consumo de complemento *in vitro* pode ser utilizado como um teste para detectar e medir concentrações de anticorpos e antígenos. A reação se manifesta em três momentos: no primeiro, o antígeno se combina com o anticorpo. No segundo, se os imunocomplexos estiverem presentes, os componentes do sistema complemento ligam-se, sendo assim consumidos. Finalmente, adiciona-se o sistema revelador que consiste de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo antieritrocitário). Após um período de incubação, observa-se se ocorreu ou não lise das hemácias sensibilizadas e a atividade hemolítica pode então ser medida, a fim de se determinar a quantidade do imunorreagente pesquisado (Figura 26).

Ao se pesquisar a presença de anticorpos em fluídos biológicos, a ausência de lise do sistema hemolítico indica a sua presença na amostra, pois como os principais componentes do sistema complemento foram consumidos na lise do imunocomplexo inicial, não estarão disponíveis para a lise do sistema hemolítico e a reação será positiva.

Tanto os anticorpos como os antígenos devem ser destituídos de atividade anti-complementar para não ativar o complemento, independentemente do imunocomplexo. O complemento é obtido de soro de cobaia, colhido e estocado de maneira apropriada para preservar a atividade hemolítica.

Figura 26. Representação da reação de fixação de complemento



### 11.15. Reações de imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi descrita pela primeira vez por Albert H. Coons e seus colaboradores, em 1941. Estes pesquisadores objetivavam empregar corantes em técnicas sorológicas e utilizaram para isso, além dos corantes comuns, radicais fluorescentes.

Neste período, já era conhecida a capacidade dos anticorpos de se ligarem a radicais químicos sem perder sua característica de reconhecimento e ligação aos antígenos. Já haviam sido descritos trabalhos utilizando conjugados de anticorpos e corantes em técnicas de aglutinação. O produto resultante desta conjugação não só mantinha suas propriedades aglutinantes originais como ainda coloria os grumos aglutinados. Porém, esta coloração foi considerada de fraca intensidade, o que levou Coons a optar pelos corantes fluorescentes.

Uma das grandes vantagens da técnica é a intensa luminosidade emitida por quantidades muito pequenas de corantes fluorescentes, permitin-

do identificar estruturas fluorescentes entre várias outras estruturas presentes em cortes de tecidos ou esfregaços.

A técnica de imunofluorescência representou um grande avanço no imunodiagnóstico, principalmente no que diz respeito à sorologia. Até a elaboração deste método, as reações ocorridas entre antígeno e anticorpo só podiam ser evidenciadas através de reações secundárias, como a precipitação ou a aglutinação, que geram fenômenos decorrentes da formação de imunocomplexos em grande quantidade ou utilizando partículas relativamente grandes. Uma das vantagens da imunofluorescência foi o fato de ter maior sensibilidade que os métodos existentes na ocasião, permitindo distinguir uma única célula bacteriana corada por fluoresceína entre  $10^7$  bactérias não coradas.

Só foi possível o desenvolvimento da técnica de imunofluorescência devido a características especiais que algumas substâncias possuem de armazenar energia luminosa e liberá-la mais tarde. A este fenômeno foi dado o nome de **luminescência**. Se a substância é capaz de armazenar e emitir luminescência por períodos mais longos, chama-se então **fosforescência**; se o período de emissão da luminosidade é mais curto, chama-se a isso **fluorescência**. Entre os corantes fluorescentes mais utilizados destacam-se a **rodamina** (isotiocianato de tetrametil rodamina – TRICT) e a **fluoresceína** (isotiocianato de fluoresceína – FITC), esta última supera a primeira por possuir maior eficiência quântica, ou seja, maior capacidade de absorção e de emissão de luminosidade. Porém, com a modernização dos equipamentos, não só de microscópios como também de citômetros, foram feitas modificações para aumentar a eficiência quântica dos demais corantes para utilizá-los em testes que buscam mais de um marcador em superfícies celulares.

A intensidade da luz emitida por este corante sofre grande interferência do meio em que ele se encontra. O pH é um dos fatores que mais interfere, pois há um mínimo de fluorescência em pH ácido e máxima fluorescência em

pH alcalino, por isso o material deve ser montado em glicerina tamponada alcalina antes da observação em microscópio de fluorescência.

Para se obter bons resultados com as técnicas imunofluorescentes, é fundamental a utilização de um bom microscópio ótico equipado com acessórios e filtros que permitam a boa visualização e captação da fluorescência. Atualmente, existem vários modelos de variadas procedências. Para a escolha do equipamento que mais se adapte às necessidades do laboratório, deve-se ter em mente qual o objetivo do teste, que tipo de material será utilizado como antígeno ou como amostra (para que seja feita a escolha das objetivas e oculares), qual o corante ou corantes que serão utilizados (para que sejam definidos os filtros do equipamento), quantos exames serão realizados em média e quantas vezes por semana, uma vez que tal escolha irá interferir na vida útil e escolha da lâmpada a ser utilizada, entre outros fatores.

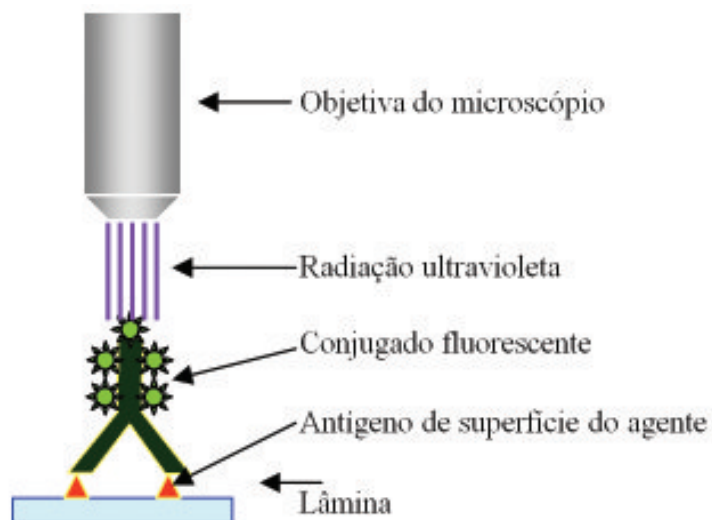
A ligação química de anticorpos a corantes dá origem a um composto chamado conjugado, que associa a capacidade de reconhecimento e ligação do primeiro às propriedades corantes do segundo, sem que ocorra nenhum tipo de prejuízo para ambos. Apesar de processo de conjugação ser relativamente simples, há uma série de cuidados que precisam ser seguidos devido às variações que podem ocorrer em cada um dos reagentes a cada associação. Um dos cuidados principais é a imunização dos animais com os antígenos mais purificados possíveis para evitar a reatividade cruzada com outros antígenos. Atualmente existem no mercado compostos conjugados de extrema pureza e alta especificidade, direcionados contra os mais variados antígenos e que atendem perfeitamente às necessidades da grande maioria dos laboratórios.

A partir do método descrito por Coons e seus colaboradores, sugeriram numerosas variações, das quais, a **imunofluorescência direta** foi a mais simples e a primeira a ser descrita. Nesta técnica, o conjugado reage diretamente com antígenos presentes na superfície de células (Figura 27). Como esta técnica se presta à pesquisa de substâncias que atuam como antígenos para o conjugado,

torna-se necessária, a cada procura de um antígeno diferente, a produção de um conjugado diferente. Além disso, de todas as variações da imunofluorescência, esta é a menos específica, já que principalmente em tecidos ou esfregaços, devido à grande quantidade de material na amostra, pode ocorrer a presença de antígenos homólogos ao que se está pesquisando. Quando se trata de células íntegras, há certa facilidade no reconhecimento, porém em fragmentos celulares ou estruturas muito pequenas é necessário grande conhecimento e intenso treinamento para diminuir a inespecificidade.

Esta variação do método ainda é bastante aplicada no diagnóstico de infecções por *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cervicais e uretrais. Este método também foi largamente utilizado na identificação de antígenos do MHC e na tipagem de linfócitos B e linfócitos T.

Figura 27. Esquema da reação de imunofluorescência direta

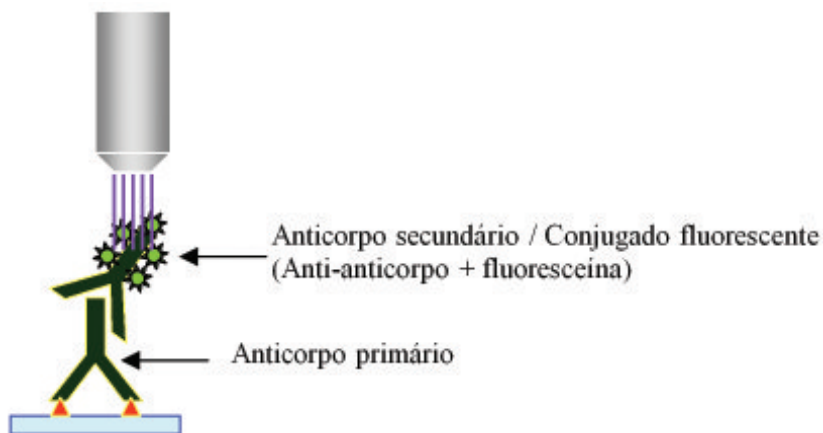


Outra variedade do método é a **imunofluorescência indireta**. Nesta modalidade, pode-se realizar a pesquisa de anticorpos contra os mais variados antígenos. O conjugado é uma imunoglobulina que reconhece a outra



imunoglobulina como antígeno, ou seja, é uma anti-imunoglobulina ou anticorpo secundário (Figura.28). A vantagem deste método é que o anticorpo pode estar ancorado à superfície de qualquer antígeno e ainda assim será reconhecido pelo conjugado. Assim, um único conjugado pode ser utilizado na pesquisa de anticorpos contra várias infecções diferentes, tornando o método mais barato. Uma vez que o reconhecimento de uma imunoglobulina por outra se dá pela região estável do fragmento cristalizável (porção Fc), a ligação é espécie específica, conferindo ao método grande especificidade. Ele também é mais sensível do que o método direto, porque existem normalmente mais epítopos na imunoglobulina para o conjugado se ligar. Quanto maior a quantidade de conjugado maior será a emissão de fluorescência.

Figura 28. Esquema da reação de imunofluorescência



Esta modalidade do método auxilia o diagnóstico de várias doenças e permite a pesquisa de diferentes isotipos de imunoglobulinas, sendo que, neste caso, há a necessidade de utilizar um conjugado para cada um dos isotipos. Desta forma, o método é utilizado no acompanhamento da doença e, em alguns casos, pode ser também utilizado como critério de cura.

De uma maneira geral, a técnica de imunofluorescência apresenta níveis de sensibilidade que variam de 70% a 90%, e especificidade que varia de 85% a 99%. Por ser um método com perfil mais específico, este é mais utilizado em confirmações sorológicas. Deve-se utilizar o método de imunofluorescência sempre aliado a outro método mais sensível para a realização da triagem e fornecer os dois resultados em combinação. A sua utilização pesquisando IgM e IgG séricas pode aumentar a sensibilidade, uma vez que a primeira aparece mais precocemente.

#### **11.16. Ensaios imunoenzimáticos - *Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA**

Os estudos preliminares que tornaram passíveis de execução os métodos imunoenzimáticos foram realizados, simultaneamente, em 1966, por Nakane e Pierce, nos Estados Unidos, e por Avrameas e Uriel, na França, com a utilização da **peroxidase** (*horseradish peroxidase* - HRP) para a confecção de conjugados proteicos, tendo como precursor o processo de marcação de proteínas com corantes fluorescentes, criado por Coons, em 1941.

Em 1971, dois grupos de pesquisadores, um holandês, formado por Van Weemen e Schurs, e um sueco, formado por Engvall e Perlmann, idealizaram e introduziram, pioneiramente, o método imunoenzimático para detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos específicos. Estes grupos observaram que proteínas poderiam ser imobilizadas em uma superfície sólida de poliestireno e a reação imune, ser revelada pela formação de produtos coloridos da reação enzima-substrato, na presença de um componente doador de elétrons, denominado cromógeno.

O método ELISA, quando efetuado em ótimas condições (enzimas altamente ativas, antígenos puros, substratos de alta qualidade, anticorpo e conjugado), apresenta sensibilidade semelhante ao radioimunoensaio, com a vantagem de não ser necessário utilizar material radioativo. Entretanto, esse

método apresenta algumas desvantagens, pois alguns substratos usados nessas reações são teratogênicos e a presença de enzimas endógenas interferem nos resultados quando se usa células inteiras como antígenos.

A reação é desenvolvida frequentemente em placas plásticas de microdiluição (suporte), contendo séries de orifícios, onde são depositados os imunorreagentes, antígenos ou anticorpos, dependendo do objetivo do método. O processo de revestimento da placa com o imunorreagente adequado denomina-se sensibilização. Para sensibilizar a placa deve-se tratar o imunorreagente com solução alcalina, deixando-o com carga efetiva negativa, e assim promover, passivamente, a adsorção à placa por interações eletrostáticas (forças coulômbicas), as quais ocorrem em virtude das cargas positivas do poliestireno ou polivinil (*polyvinyl chloride* - PVC) utilizado para confeccioná-las. Além das placas de microdiluição de 96 cavidades, também são utilizados outros suportes, entre os quais, esferas de sefarose, esferas de poliestireno ou de PVC, ou tubos de poliestireno ou PVC, que possibilitam a adsorção adequada da maioria dos imunorreagentes.

As etapas de lavagem das placas de microdiluição interpõem-se às demais etapas de execução do método e servem para retirar excessos de imunorreagentes não ligados. Podem ser usados procedimentos manuais ou automáticos, que vão desde o uso de jorradeiras contendo a solução de lavagem, ou de pente multicanal adaptado a um sistema de vácuo (lavadora semiautomática), até a utilização de lavadoras de placas automáticas, que reduzem o tempo de realização do teste e proporcionam maior uniformidade ao processo.

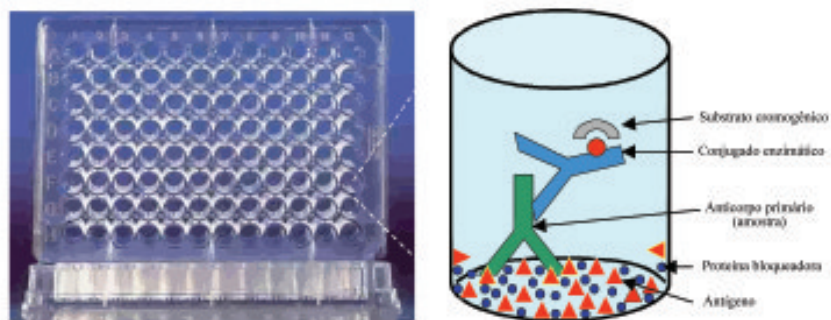
O revestimento da superfície interna da placa de ELISA, pelo menos no plano teórico, não é absoluto e, portanto, algumas regiões permanecem livres de ligação. Estes espaços devem ser ocupados com qualquer molécula alheia ao sistema reacional, no sentido de reduzir, ou mesmo evitar, a ligação inespecífica, não imune, de componentes da amostra, geradores de reações indesejáveis que possibilitam falsas interpretações. A cobertura destes espaços

vazios é chamada de **bloqueio**. Entre as proteínas mais empregadas nesta etapa destacam-se a soro albumina bovina (BSA), a ovalbumina e a caseína, além de um complexo proteico, como o soro de cabaia.

Dependendo do material a ser pesquisado, pode-se conjugar antígenos com enzimas (Ag-E) e anticorpos ou anti anticorpos com enzimas (Ac-E). Enzimas são macromoléculas de natureza proteica, com função biológica de alto poder catalítico de reações químicas e elevada especificidade ao substrato correspondente. As mais usadas nestes testes são a fosfatase alcalina e a peroxidase.

Para revelar a presença da enzima no complexo formado, utiliza-se uma solução reveladora, que consiste em um tampão adequado, onde se adicionam o substrato correspondente à enzima conjugada e um componente doador de elétrons (cromógeno). A enzima conjugada quebra o substrato e seus produtos atuam no cromógeno, alterando a coloração do sistema (Figura 29).

Figura 29. Esquema do ensaio imunoenzimático ELISA indireto, para pesquisa de anticorpos específicos



A leitura da reação em condições de trabalho de campo pode ser feita de forma visual, simplesmente pela observação da alteração da coloração. Em condição laboratorial utiliza-se espectrofotômetro apropriado para leitura dos

orifícios das placas, que transforma a intensidade de cor em números. Quanto maior a leitura, maior será a concentração de enzima conjugada e, conseqüentemente, maior será a concentração da substância pesquisada em técnicas não competitivas.

○ método **ELISA** pode ser classificado de acordo com sua atividade de amplificação, ou seja, por métodos diretos não competitivos, ou baseados em sua atividade moduladora, que são métodos competitivos.

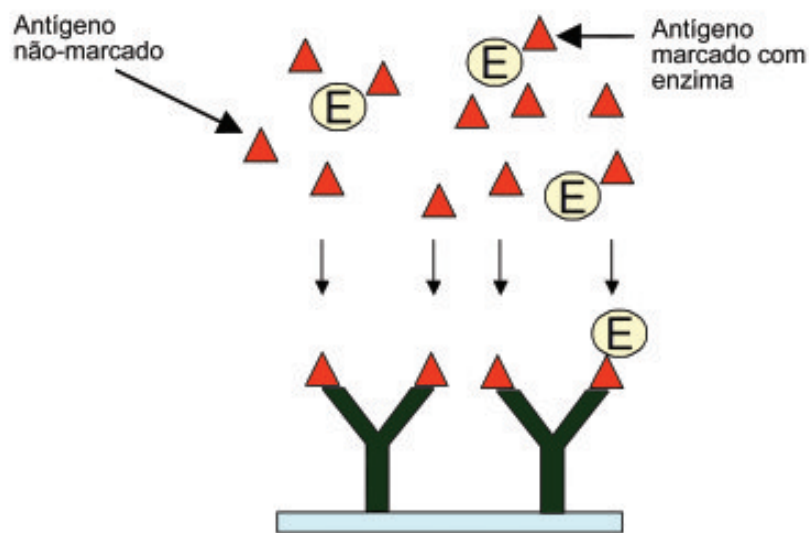
○ **ELISA direto** é mais usado em imuno-histoquímica. Seu fundamento consiste na utilização de anticorpos primários marcados com enzima, que se combinam especificamente aos antígenos presentes em cortes histológicos. A aplicação da solução reveladora destaca o material pesquisado.

○ **ELISA indireto** é empregado para a pesquisa de anticorpos, onde amostras de soro ou plasma são colocadas para reagir com antígenos imobilizados em uma fase sólida (placas de ELISA). Posteriormente, são revelados com auxílio de conjugado enzimático específico levando a formação de um produto corado ao agir sobre substratos cromogênicos. Para pesquisa de antígenos presentes em material biológico, a amostra é posta para reagir com anticorpos específicos imobilizados na fase sólida.

○ **ELISA competitivo** consiste na pesquisa de antígeno, onde o anticorpo é mobilizado na fase sólida e o antígeno correspondente compete com uma quantidade padronizada e marcado para sítios de combinação disponível. Nesse caso, a redução da reação indica maior quantidade de antígeno na solução. Para pesquisar anticorpos, o antígeno é imobilizado e poderá se ligar ao anticorpo da amostra ou ao já conhecido e marcado (conjugado enzimático), para, assim, decrescer a intensidade de coloração da reação. Em ambos os métodos competitivos (Figura 30), dois procedimentos podem ser seguidos: a competição simultânea, cujo antígeno ou anticorpo marcado é adicionado junto com a amostra; ou a saturação sequencial, onde o antígeno

ou anticorpo é adicionado primeiro, seguido de uma incubação com o imunorreagente marcado.

Figura 30. Modelo de método competitivo, onde antígenos marcados e antígenos não marcados de uma amostra competem pelos sítios de ligação dos anticorpos imobilizados em um suporte



### 11.17. Western blotting - WB

A técnica de *Western Blotting*, também chamada de *immunoblotting* ou **imunoeletrotransferência**, é uma ferramenta de grande utilidade para a caracterização de antígenos, ou para pesquisa de anticorpos específicos para um determinado componente antigênico.

A técnica de *WB* baseia-se numa combinação de três métodos muito aplicados em biologia molecular: a separação de macromoléculas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de duodecil-sulfato de

sódio (*SDS-PAGE*); sua transferência eletrolítica para membranas (geralmente de nitrocelulose); e o ensaio de revelação, utilizando anticorpos ou proteína A, marcados por enzimas, radionuclídeos, fluorocromos, metais coloidais ou complexo biotinina-avidina-peroxidase.

Assim, as proteínas de um dado antígeno são separadas, transferidas eletroliticamente para membranas de nitrocelulose e postas a reagir com anticorpos marcados. No final, a reação antígeno-anticorpo é revelada por meio de imunocomplexos formados com proteínas definidas, e facilmente identificadas pelos seus pesos moleculares característicos.

A origem do nome *Western Blotting* partiu de uma brincadeira acadêmica baseada no nome Southern, do autor de um método de eletrotransferência de fragmentos de ácidos nucleicos (DNA), que recebeu o nome de ***Southern Blot***. Pouco tempo mais tarde, Alwine e cols conseguiram fazer uma adequação na técnica de *Southern Blotting*, que se consistiu na eletrotransferência de ácido ribonucleico (RNA), o qual, por sua vez, foi analisado através de sondas de DNA. Assim, seguindo o princípio da brincadeira inicial, resolveu-se chamar a nova técnica de ***Northern Blotting***. Pouco mais tarde, em 1979, Towbin, Staehelin e Gordon desenvolveram o método de eletrotransferência de proteínas. Para seguir a já então tradicional forma de referir-se ao método resolveu-se batizar a nova técnica de ***Western Blotting***.

A razão para transferirem-se proteínas, a partir de um gel de poliacrilamida para uma membrana sintética, está na possibilidade de manuseio contínuo do material para análise, além de se poder trabalhar com vários reveladores ao mesmo tempo, ou com sondas de elevado peso molecular, uma vez que a poliacrilamida não é um material muito adequado para que moléculas de grande tamanho sejam difundidas.

As membranas mais utilizadas para o *blotting* são derivadas da nitrocelulose. Apesar disso, elas são frágeis e apresentam uma baixa capacidade de ligação às macromoléculas eletrotransferidas. As membranas de *nylon*

são muito mais resistentes e ligam-se muito fortemente às proteínas. Sua capacidade de ligação é seis vezes maior que a das membranas de nitrocelulose. Sua limitação está relacionada a não impregnação por corantes, comumente empregados na revelação de proteínas (azul de Comanssie e negro de amido), e à grande quantidade de reações inespecíficas, requerendo, assim, um bloqueio muito bem feito antes de se desenvolver o ensaio imunoenzimático para a revelação do *Western Blotting*. Outro aspecto muito importante é a porosidade da membrana. Recomenda-se a utilização de membranas com 0,45mm para o uso genérico e com diâmetros bastante menores (0,2mm) para estruturas proteicas, com pesos moleculares inferiores a 20 kDa. As melhores membranas, embora sendo bastante caras, são as de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Elas combinam a excelente capacidade ligante e a resistência mecânica à manipulação necessária para a elaboração das fitas, contendo proteínas eletrotransferidas.

### 11.18. Teste imunocromatográfico

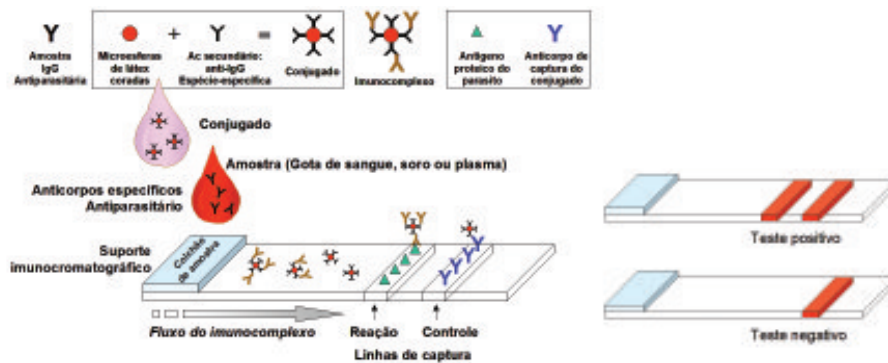
O dispositivo de imunocromatografia é composto de uma membrana porosa de celulose modificada e membranas absorventes acessórias de fibra de vidro, contendo os elementos de reação, ajustadas em um invólucro plástico apropriado com uma janela para se acrescentar a amostra de teste e outra para leitura do resultado da reação. O princípio de funcionamento do teste imunocromatográfico baseia-se na reação específica antígeno-anticorpo e se constitui por uma fase sólida (membrana porosa), onde estão imobilizados elementos de captura, e por uma fase móvel, onde estão suspensos o conjugado (que pode ser a proteína A, ligada ao ouro coloidal ou outros conjugados disponíveis) e a molécula alvo da amostra.

A fase móvel migra sobre a fase sólida por efeito de capilaridade, conduzindo o complexo formado entre a molécula alvo e o conjugado, que, por sua vez, será retido na linha de captura da fase sólida, formando um



complexo macromolecular colorido visível ao olho humano. Caso a amostra não contenha a molécula alvo, esta linha de reação não se formará. Uma segunda linha de reação, denominada linha de controle, se forma pela captura do conjugado livre, que permite a confirmação da migração da fase móvel (Figura 31).

Figura 31. Princípio do Teste Imunocromatográfico



### 11.19. Imuno-histoquímica

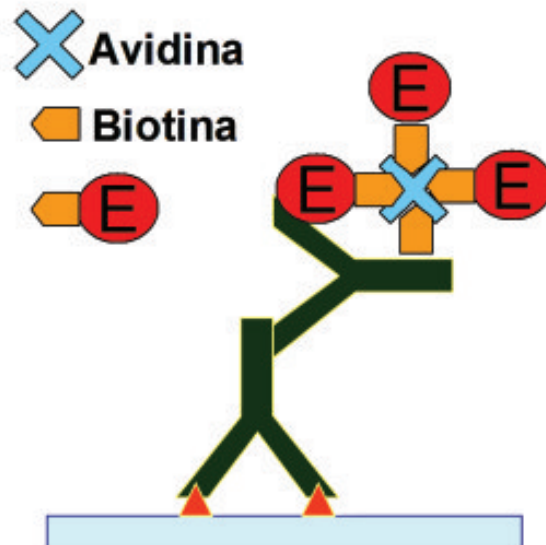
A imuno-histoquímica (IHQ) reúne a interação antígeno anticorpo *in vitro*, técnicas histológicas e reações químicas, em um método que permite detectar diferentes estruturas de tecidos, revelados por diversos tipos de processos de visualização. É utilizada no diagnóstico anatomopatológico de várias doenças degenerativas ou parasitárias, bem como na identificação de estruturas normais em estudos de histologia básica. As técnicas de IHQ permitem a localização de proteínas nas células de uma seção de tecido, fixados em formol ou incluído em blocos de parafina. Existe, atualmente, a disponibilidade de um número crescente de anticorpos para uso em IHQ, o que vem possibilitado uma maior precisão diagnóstica.

Existem dois tipos de técnicas de imuno-histoquímica:

- **Técnica direta** – Os anticorpos primários são ligados a um marcador apropriado, e o corte de tecido, que contém antígenos específicos, é incubado com o anticorpo durante algum tempo. Após a interação entre os anticorpos e as proteínas, os anticorpos que não se ligaram são removidos por lavagem. Dependendo do marcador utilizado, a leitura da reação será realizada pela microscopia adequada; para marcadores fluorescentes, por exemplo, o corte é observado por microscopia de imunofluorescência, enquanto para outros marcadores, utiliza-se a microscopia ótica convencional.
- **Técnica indireta** – Nesta técnica, se utiliza o anticorpo primário específico para uma determinada proteína e para o anticorpo secundário, uma anti-imunoglobulina marcada que reconhece o anticorpo primário. O corte de tecido é incubado com o anticorpo específico para determinada proteína. Depois de lavado, é incubado com o imunocombinado, que se vai ligar ao anticorpo primário. Em seguida, há a observação por microscopia adequada, dependendo do marcador utilizado.

A técnica de IHQ pode também estar associada a um processo enzimático de coloração, como ao complexo avidina-biotina-enzima-cromógeno (Figura 32). O complexo é formado pela ligação de uma molécula de estreptavidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final colorido. O cromógeno mais utilizado é o DAB (diaminobenzidina), que confere cor marrom-ferruginosa ao precipitado permanente.

Figura 32. Amplificação de sinal devido ao maior número de moléculas de enzimas biotinaladas ligadas à avidina



O anticorpo marcado com a peroxidase pode se ligar a sítios teciduais inespecíficos, prejudicando o resultado do exame. A utilização de proteínas inertes alheias ao sistema reacional, tais como soro fetal bovino, soro albumina bovina ou caseína, ao competirem com os sítios de ligação inespecíficos, reduzem a reação inespecífica. A peroxidase endógena, encontrada em diferentes tecidos, também pode mascarar uma reação e deve ser inibida pela incubação prévia do corte com peróxido de hidrogênio. A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos e é encontrada em altas concentrações na mucosa intestinal e nos túbulos proximais dos rins, entre outros tecidos. A biotina endógena, assim como as outras proteínas utilizadas na IHQ, também é encontrada em tecidos, particularmente no fígado, pulmão, baço, tecido adiposo, glândula mamária, rim e cérebro. A atividade da biotina pode ser suprimida pelo uso de tampões alcalinos, pela pré-incubação com avidina ou com leite desnatado.

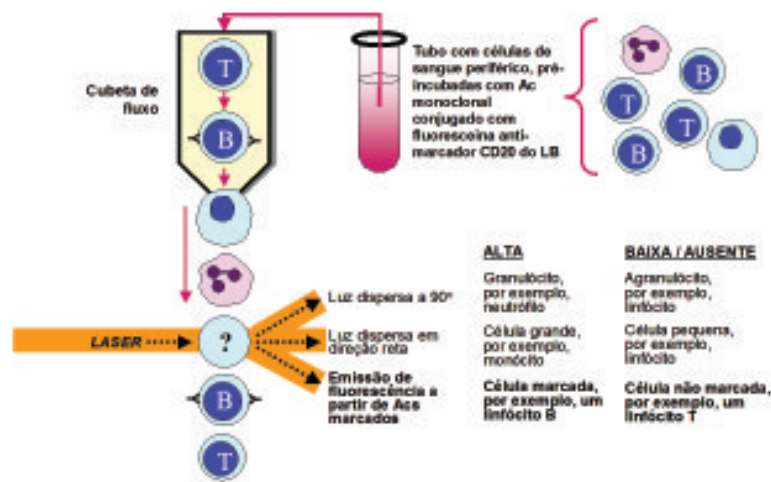
A avidina é uma glicoproteína básica com PM de aproximadamente 68 mil, obtida a partir da clara do ovo de várias espécies de aves. A molécula de avidina é quadrivalente e simétrica, onde cada lado da molécula contém um par de receptores para a biotina. A estreptavidina, obtida a partir do *Streptomyces avidinii*, possui ponto isoelétrico próximo ao neutro e mantém as propriedades de ligação da avidina sem apresentar prejuízos ao resultado final. O sistema avidina-biotina permite a amplificação de sinal, pois muitas moléculas de biotina podem se ligar a um anticorpo. E a adição da avidina marcada com corantes fluorescentes, ou com enzimas, resultam em uma amplificação da reação, facilitando a visualização do corte corado.

### 11.20. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas, em fluxo, em um meio líquido. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por “citometria de fluxo multiparamétrica”. A versão mais aplicada da citometria de fluxo é denominada **FACS** (*fluorescence-activated cell sorter*, separador de célula ativado por fluorescência), que foi projetada para automatizar a análise e a separação das células coradas com anticorpo fluorescente. O FACS utiliza um feixe de *laser* e um detector de luz para contar as células intactas únicas em suspensão. Através de um aparelho de detecção ótico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula.

Em sistemas celulares, as principais propriedades analisadas são o tamanho relativo, a granulosidade relativa, a complexidade interna das partículas e a intensidade relativa da fluorescência. Essas características são determinadas por meio de um sistema de acoplamento óptico-eletrônico que registra a forma como a célula, ou partícula, dispersa a luz do *laser* incidente, emitindo fluorescência (Figura 33).

Figura 33. Detecção de linfócitos B fluorescente, por citometria de fluxo



O fundamento da citometria de fluxo consiste na emissão de um feixe de luz (normalmente *laser*), de único comprimento de onda (cor), direccionado a um meio líquido em fluxo. Um número de detectores é apontado ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz. Um na linha do feixe (*Forward Scatter* ou FSC) e vários perpendiculares a este (*Side Scatter* ou SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa passando através do feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula, ou juntos à partícula, podem ser excitados, emitindo luz de menor frequência do que o da fonte de luz.

Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, analisando as flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula, individualmente. FSC correlaciona-se com o volume celular e SSC depende da complexidade interna da partícula (Ex: forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana). Atualmente, alguns citômetros de

fluxo têm eliminado a necessidade da fluorescência e usado somente dispersão de luz para sua medição. Outros citômetros de fluxo formam imagens de cada fluorescência da célula, dispersão de luz e transmissão de luz.

○ citômetro de fluxo é dividido fundamentalmente em cinco sistemas:

- **Sistema fluido** – Local onde ocorrerá a introdução e o alinhamento das células por diferença de pressão, e que serão interceptadas pela luz do *laser*.
- **Sistema óptico** – Contém a fonte de luz do *laser*. Normalmente são usadas lâmpadas de mercúrio ou xenon, *lasers* de alto poder (argônio, kripton), *lasers* de poder baixo (argônio-488nm, red-HeNe-633nm, green-HeNe e HeCd-UV) e *lasers* diodo (azul, verde, vermelho e violeta).
- **Sistema eletrônico** – Responsável por converter os sinais óticos detectados em sinais eletrônicos proporcionais, através de um sistema analógico para digital (ADC), gerando FSC e SSC, assim como sinais fluorescentes.
- **Sistema de amplificação** – Codifica e processa as informações recebidas em escala linear ou escala logarítmica.
- **Sistema computacional** – Responsável pela análise, processamento dos sinais e emissão do resultado, utilizando *softwares* específicos. Existe ainda um filtro e um sistema detector que capta a luz proveniente das células. A emissão de luz frontal mede o tamanho da célula e a luz lateral avalia a sua granulidade e complexidade interna.

Modernos citômetros de fluxo são capazes de analisar várias partículas em cada segundo, em “tempo real”, e podem separar e isolar partículas com propriedades específicas. Os parâmetros possíveis de medir são: volume e complexidade morfológica das células, pigmentos celulares (como a

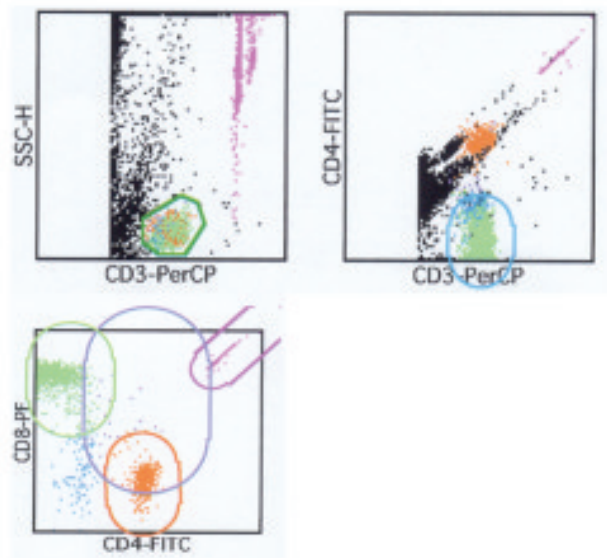
clorofila), DNA, RNA, análise e classificação de cromossomas, proteínas, antígenos à superfície celular (marcadores CD) e antígenos intracelulares, entre outras moléculas.

A hematologia foi uma das primeiras modalidades biomédicas a se beneficiar das aplicações clínicas da citometria de fluxo. Algumas destas aplicações são utilizadas regularmente para o diagnóstico ou o acompanhamento terapêutico de diferentes afecções. Em cancerologia, a detecção da célula tumoral é a aplicação mais desenvolvida. Esta detecção repousa essencialmente sobre a medição de conteúdo anormal de DNA no núcleo da célula tumoral e da expressão proteica dos antígenos tumorais.

Atualmente, a imunologia, a biologia molecular e as análises clínicas são as áreas da ciência que mais utilizam a citometria de fluxo para a detecção ou identificação de subtipos de células implicadas na imunidade. A contagem de linfócitos T consiste em classificar e quantificar as subpopulações desses linfócitos, pela pesquisa imunofenotípica dos CDs, por meio de conjugados fluorescentes específicos. Dependendo dos fluorocromos que estarão ligados aos anticorpos monoclonais, as fluorescências emitidas por eles, quando excitados pelo *laser*, terão comprimentos de ondas diferentes e, conseqüentemente, cores diferentes. Há diversos tipos de fluorocromos, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE), a proteína Clorofil peridina (PerCP) e o *Texas Red*.

Os sinais eletrônicos são usados para analisar as células de acordo com seus marcadores de superfície, e esta análise é interpretada através de um gráfico de separação dividido em janelas (*gates*) (Figura 34). O citômetro fornece o número absoluto de linfócitos, por exemplo, linfócitos T CD3+/CD4+ e de linfócitos T CD3+/CD8+, porque em cada tubo de amostra existe um número conhecido de partículas de referência conjugadas com fluorocromos (valor padrão).

Figura 34. Análise do linfócito feita pelo Citômetro de Fluxo mostrando os Gates e as populações marcadas com FITC, PE e PerCP



### 11.21. Testes de hipersensibilidade celular cutânea tardia

Embora existam métodos *in vitro* para o exame da imunidade celular, como, por exemplo, a linfoproliferação e a citometria de fluxo, a resposta celular também pode ser verificada *in vivo* por meio de **testes de hipersensibilidade celular cutânea tardia**. Estes testes são muito simples e podem ser empregados na avaliação geral da imunidade celular em estudos de deficiência imunológica e na verificação da exposição a determinados agentes infectoparasitários individuais ou em inquéritos epidemiológicos. É importante ressaltar que um teste positivo para um agente infeccioso não significa necessariamente diagnóstico de doença ativa ou infecção por este agente, mas apenas a presença de células Th1 de memória, cuja origem foi induzida por uma infecção primária assintomática ou de uma doença curada. O teste negativo indica que o indivíduo não deve ter tido contato com o agente que se investiga.



Estes testes, além de representarem o principal exame complementar para o diagnóstico e acompanhamento do curso de várias enfermidades infectoparasitárias, são indicados também para a avaliação da diminuição da imunidade celular Th1, ou anergia, que se configura pela ausência de resposta a uma bateria de antígenos comuns, determinada por fatores genéticos ou ambientais. Como ocorre, por exemplo, em indivíduos com infecções recorrentes, com infecções causadas por microrganismos que normalmente não são patogênicos, indivíduos em uso de imunossuppressores, indivíduos com imunodeficiências primárias ou com doenças que levam à imunodeficiência secundária, como a AIDS, neoplasias, doenças autoimunes, etc. Na suspeita de anergia, é feita a aplicação na pele, de certos produtos químicos que reagem com proteínas que induzem sensibilização sistêmica a vários metabólitos do agente sensibilizante. O dinitroclorobenzeno (DNCB) é um agente que tem sido utilizado desta maneira, com a finalidade de testar a imunidade celular em pacientes com suspeita de anergia. Este não deve ser um procedimento de rotina, e deve ser reservado a pacientes que apresentaram ausência de resposta celular aos antígenos comumente testados.

Dentre os antígenos mais utilizados, para a avaliação da resposta celular de hipersensibilidade tardia, figuram os seguintes: a tuberculina, também chamada de PPD (derivado proteico purificado), empregada no teste de Mantoux, que é utilizado para a avaliação da exposição ao *Mycobacterium tuberculosis*; a lepromina, ou antígeno de Mitsuda ou mitsudina, que é utilizada diante da suspeita de hanseníase; o extrato de *Leishmania* contido no teste de Montenegro, utilizado no diagnóstico complementar e em inquéritos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar; os antígenos de *Candida albicans*, candidina ou oidiomicina, empregados diante da suspeita de candidíase; a tricofitina, para as dermatofitoses causadas por fungos; a paracoccidiodina, utilizada sob a forma de filtrado de cultura na avaliação da resposta celular ao *Paracoccidioides brasiliensis*, e outros.

O teste se procede pelo inóculo, após antissepsia da pele com álcool, de 0,1 mL de antígeno específico, por via intradérmica na face anterior do antebraço, usando seringas de 1 mL com agulhas nº 8x0,25mm, estéreis e descartáveis. Como controle, deve-se injetar o mesmo volume de solução salina em outro ponto do antebraço. A formação de uma pápula pequena e uniforme indica injeção correta. A injeção subcutânea leva à diluição do antígeno e pode gerar resultados falso-negativos. A leitura é realizada por medição dos maiores diâmetros do eritema e da endureção após 48-72 horas na maioria dos procedimentos. Endureção maior que 5 mm de diâmetro geralmente indica resposta positiva.

## **12. Alguns parâmetros utilizados no controle de qualidade do diagnóstico sorológico**

O controle de qualidade para o diagnóstico sorológico das doenças infectoparasitárias, da mesma maneira que para todos os outros procedimentos laboratoriais, deve ser criteriosa em todas as etapas do processo. Começando pela fase **pré-analítica**, que inclui a indicação e solicitação corretas do teste adequado, coleta da amostra do paciente convenientemente preparado, além do transporte e manuseio da amostra em condições apropriadas até o laboratório de análise. A fase **analítica** compreende a escolha do método adequado, a realização do teste de acordo com as recomendações do fabricante e o registro do resultado obtido. A fase **pós-analítica** inclui os eventuais cálculos e a apresentação do resultado em forma de laudo final. A partir desta fase, deve ser feita a interpretação do resultado, em conjunto com os dados clínicos e demais exames laboratoriais, para que seja definida a melhor conduta.

### **12.1. Construção de banco de soros**

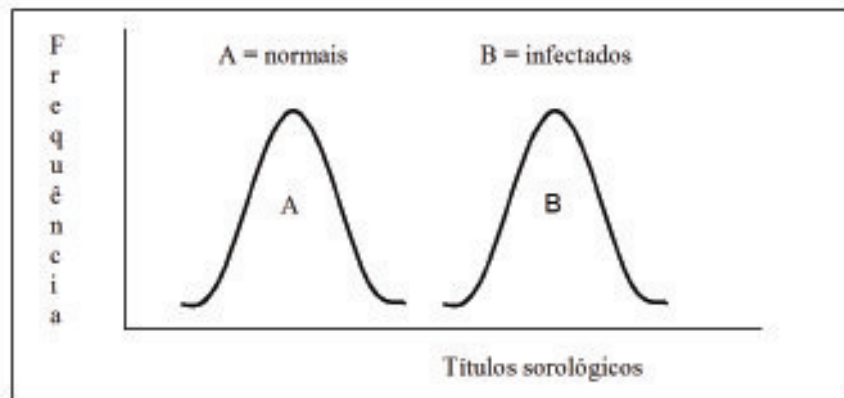
O banco de soros é uma coleção catalogada de amostras representativas de uma população que se mantém para preservar suas características imunológicas.

Para a adequada constituição, é necessário a inclusão de amostras provenientes de pessoas infectadas e de pessoas não infectadas. As amostras de pessoas infectadas, chamadas **controles positivos**, devem ser pertencentes às áreas endêmicas (se a doença possuir tal característica) e vir com diagnóstico conclusivo que demonstre o parasito ou por provas que deem tais indicações, como, por exemplo, os testes intradérmicos de hipersensibilidade celular, reação de hibridização ou a reação polimerásica em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). As amostras de indivíduos não infectados, considerados “normais” e chamados de **controles negativos**, são selecionadas mediante a apresentação de resultados negativos obtidos com as mesmas provas utilizadas para seleção das amostras positivas e, se possível for, provenientes de áreas não endêmicas da modalidade estudada. Se houver a inclusão de soros provenientes de indivíduos com outras doenças, para a verificação de respostas cruzadas, as mesmas provas diagnósticas de certeza devem ser realizadas. Todo banco de amostras necessita da aprovação de comissão de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, bem como da aprovação de comissão de ética para uso de animais (CEUA), quando envolve amostras não humanas.

## 12.2. Avaliação dos métodos sorológicos

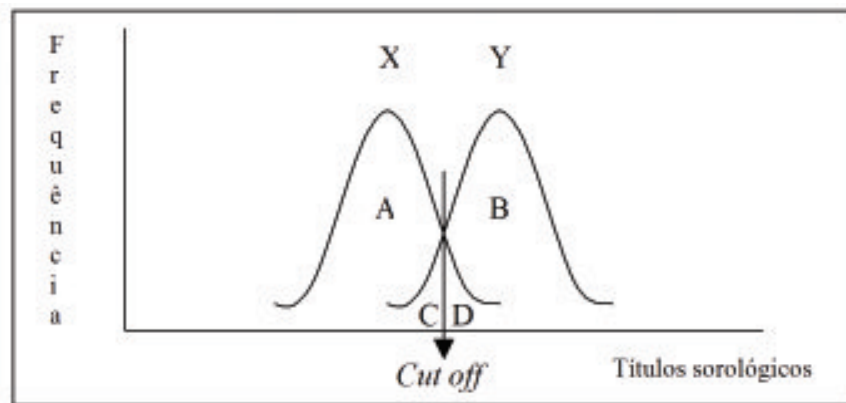
Ao analisar o comportamento sorológico de duas populações, onde uma delas seja constituída por amostras provenientes de pessoas infectadas e a outra de pessoas não infectadas, ao se comparar os resultados sorológicos obtidos em ambas, com frequência relativa em porcentagem, encontram-se duas curvas gaussianas bem definidas (Figura 35).

Figura 35. Distribuição de frequências dos títulos sorológicos de duas populações hipotéticas, uma normal A e outra infectada B, encontradas com um teste sorológico hipoteticamente ideal



Entretanto, estes dados hipotéticos ideais não refletem o que se observa em uma rotina de diagnóstico sorológico. Os resultados dos testes sorológicos se agrupam em quatro categorias, de acordo com a existência ou não da doença e a positividade ou não do teste. Para qualquer infecção que se analise, observa-se sobreposição entre as curvas de distribuição da população normal (A) e a de infectados (B), como se mostra na Figura 36, onde os soros, com resultados positivos ao teste e provenientes de pacientes nos quais o diagnóstico de certeza era positivo, denominam-se **verdadeiros-positivos**. Soros com resultados negativos obtidos de controles normais são chamados **verdadeiros-negativos**. Soros com resultados negativos provenientes de pacientes infectados são denominados **falsos-negativos** e aqueles com resultado positivo ao teste sorológico, porém obtidos de controles normais, são os **falsos-positivos**.

Figura 36. Distribuição de frequências dos títulos sorológicos, semelhantes ao que se encontra habitualmente: uma normal A e outra infectada B, obtidas com um teste sorológico hipoteticamente ideal



Neste exemplo hipotético, a sobreposição das curvas é simétrica e a linha de corte (*cut off*) encontra-se marcada ao centro, fornecendo assim, igual quantidade de resultados falsos-negativos (C) e falsos-positivos (D). Os dados com que se obtêm as curvas podem ser extraídos de um quadro de dupla entrada, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Demonstração de populações de indivíduos infectados e não infectados, onde: *a* = Verdadeiros-positivos, *b* = Falsos-positivos, *c* = Falsos-negativos, *d* = Verdadeiros-negativos e *P* = Prevalência.

TESTE	INDIVÍDUOS		TOTAL
	INFECCÃO		
	PRESENTE	AUSENTE	
POSITIVO	a	b	a + b
NEGATIVO	c	d	c + d
TOTAL	a + c (P)	b + d	n

Apesar de testes sorológicos produzirem muitos resultados verdadeiros, alguns resultados falsos, como já mencionado, podem ser gerados, sejam eles positivos ou negativos; e, por conseguinte, é comum dizer que os testes sorológicos são presuntivos, ou seja, de valor probabilístico. Estes testes, obrigatoriamente, devem ser avaliados para definir parâmetros importantes quanto às suas qualidades fixas (sensibilidade, especificidade e acurácia), uma vez que estes valores independem da prevalência da infecção estudada na população.

Um teste de triagem sorológica ideal deve ser capaz de identificar todos os indivíduos com a condição estudada e de excluir todos os indivíduos que não apresentem esta condição. A probabilidade do teste em identificar corretamente, em uma população, os indivíduos que apresentem a infecção, denomina-se **sensibilidade** (S) e pode, também, ser conceituada como a capacidade de um teste sorológico proporcionar resultados positivos nos indivíduos infectados ou, ainda, como a capacidade do método sorológico em detectar quantidades mínimas do material desejado. Calcula-se a sensibilidade com a seguinte relação:

$$\text{Sensibilidade} = a : (a + c)$$

De acordo com os dados do quadro 3

$$\text{Sensibilidade} = 300 : 400 = 0,75 \text{ ou } 75\%$$

Os resultados podem ser apresentados em uma escala de 0 a 1, mas normalmente são expressos em porcentagem.

A capacidade do teste para excluir aqueles que não são afetados é chamada **especificidade** (E), que também pode ser conceituada como a qualidade que um teste apresenta em distinguir moléculas diferentes, porém, com elevado grau de homologia. Aproveitando os dados do Quadro 3, a especificidade calcula-se por:

Especificidade =  $d : (b + d)$  onde Especificidade =  $540 : 600 = 0,9$  ou 90%

Quadro 3 – Resultados sorológicos hipotéticos encontrados em duas populações de indivíduos infectados e não infectados

TESTE	INDIVÍDUOS		TOTAL
	INFECÇÃO		
	PRESENTE	AUSENTE	
POSITIVO	300 a	60 b	360 a + b
NEGATIVO	100 c	540 d	640 c + d
TOTAL	400 a + c (P)	600 b + d	1000 n

A **acurácia** (A), também chamada de confiabilidade ou eficiência do teste, refere-se ao somatório dos resultados verdadeiros positivos e negativos em relação à população estudada.

Acurácia =  $(a + d) : n$  onde Acurácia =  $(300 + 540) : 1000 = 0,84$  ou 84%

O coeficiente de **prevalência** (P) pode ser conceituado como a porcentagem de indivíduos infectados, parasitologicamente comprovados em uma população. Esse conceito difere da soroprevalência, (SP) que considera a porcentagem de indivíduos soropositivos na população estudada.

Prevalência =  $(a + c) : n$  onde Prevalência =  $400 : 1.000 = 40\%$

Soroprevalência =  $(a + b) : n$  onde Soroprevalência =  $360 : 1.000 = 36\%$

A determinação das qualidades fixas de um teste sorológico, por si só, não satisfaz suficientemente às necessidades do controle sob os resultados sorológicos, uma vez que a ocorrência de resultados falsos pode alterar, em função da prevalência de infecção. Como as técnicas sorológicas são utilizadas em diversos lugares do mundo em áreas com diferentes coeficientes de

prevalência, é importante conhecer a probabilidade de que os resultados positivos segundo a técnica empregada sejam realmente positivos, bem como os resultados negativos sejam realmente negativos. Estas probabilidades são os valores de predição (VP) da técnica. O parâmetro mais frequentemente utilizado é o valor de predição de positividade (VPP), que permite identificar os doentes em um grupo de indivíduos considerados soropositivos. O valor de predição de negatividade (VPN) é conceituado como a probabilidade de que a doença estudada não exista em um grupo de indivíduos considerados como soronegativos. Disto deduz-se que o valor de predição pode ser dado pelo teorema de Bayes:

$$VPP = (P \times S) : (P \times S) + (1 - P) \times (1 - E)$$

$$VPN = E \times (1 - P) : E \times (1 - P) + (1 - S) \times P$$

Por outro lado, os cálculos podem expressar-se de uma forma mais simples, mediante os valores do Quadro 3 apresentado anteriormente:

$$VPP = a : (a + b) \quad \text{onde } VPP = 300 : 360 = 0,83 \text{ (83\%)}$$

$$VPN = d : (c + d) \quad \text{onde } VPN = 540 : 640 = 0,84 \text{ (84\%)}$$

É feita a aplicação do mesmo teste sorológico, com sensibilidade e especificidade invariáveis, em duas áreas endêmicas para uma determinada doença, onde a única diferença entre estas populações seja a prevalência de infecção encontrada, representada por uma população (A) de baixa prevalência e uma (B) de alta prevalência. A alteração no comportamento do teste se verifica pela modificação dos valores de predição de positividade e de negatividade. A partir dos valores apresentados no quadro 4, pode-se verificar tais modificações.



Quadro 4 - Quadro explicativo para os cálculos do valor de predição de positividade em duas populações hipotéticas: população A = baixa prevalência e população B = alta prevalência, para uma determinada infecção.

Resultado do teste	(A) Prevalência de infecção = 1%			(B) Prevalência de infecção = 10%		
	Infectados	Não infectados	total	Infectados	Não infectados	total
Positivo	980	990	1970	9800	900	10700
Negativo	20	98010	98030	200	89100	89300
Total	1000	99000	100000	10000	90000	100000
P = 1%    S = 98%    SP = 99%                  P = 10%    S = 98%    SP = 99% VPP = $980 / 1970 \times 100 = 49,7\%$ VPP = $9800 / 10700 \times 100 = 91,6\%$						

Conforme demonstrado, embora o teste sorológico tenha sensibilidade e especificidade elevadas, 98% e 99% respectivamente, sua aplicação em área de baixa prevalência gerou valor de predição de positividade inferior a 50%. Contrariamente, em área de alta prevalência o valor de predição de positividade elevou-se acima de 90%.

O Quadro 5 ilustra, com maiores detalhes, como o valor de predição de positividade dos testes sorológicos, com diferentes níveis de sensibilidade e de especificidade, sofrem alterações em função dos valores crescentes do coeficiente de prevalência. Via de regra, o teste sorológico não deve ser empregado em áreas de baixa prevalência em consequência da geração de numerosos resultados falsos-positivos.

Em técnicas parasitológicas dificilmente ocorrem resultados falso-positivos, como, por exemplo, a identificação de hemoparasitos em exames microscópicos pela extensão sanguínea em lâmina, ou enteroparasitos em fezes, é definitivo para comprovar uma infecção. Por outro lado, não podem ser utiliza-

dos para estimar a prevalência real de infecção, por apresentarem resultados falso-negativos.

Quadro 5 - VPP de testes com diferentes índices de sensibilidade e especificidade para diversas taxas de prevalência

VARIAÇÃO DO VALOR DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE										
Prevalência %	especificidade = 99%					sensibilidade = 99%				
	sensibilidade %					especificidade 99%				
	70	80	90	95	99	70	80	90	95	99
0,5	2	2	5	9	33	26	29	31	22	33
1,0	3	5	9	17	50	41	45	48	49	50
5,0	15	21	34	51	84	79	81	83	83	84
10,0	27	35	52	69	92	89	90	91	91	92
20,0	45	55	71	83	96	95	95	96	96	96
Valores de predição de positividade										

Os resultados dos testes sorológicos também podem ser confrontados para a verificação da copositividade, da conegatividade e da concordância bruta. Estes parâmetros podem ser obtidos em função da distribuição dos resultados dos testes sorológicos, como representados no Quadro 6 de maneira semelhante à sensibilidade, especificidade e confiabilidade. A concordância ajustada *Kappa* (K) é um parâmetro que se baseia na comparação do índice de concordância esperada com o índice de concordância observada.

Quadro 6 - Quadro explicativo para os cálculos da Cointeratividade, e da Conegatividade, Concordância bruta e Concordância ajustada – *Kappa* (K.)

TESTE 2	TESTE 1 (Teste de referência)		
	PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
POSITIVO	a	b	a + b (p1)
NEGATIVO	c	d	c + d (q1)
TOTAL	a + c (p2)	b + d (q2)	a + b + c + d
Cointeratividade = a : (a + c) Conegatividade = d : (b + d) Concordância bruta = (a + d) : (a + b + c + d) Kappa = [2 (ad + bc) : (p1q2 + p2q1)]			

Pode-se utilizar o seguinte critério para conceituar os resultados do controle de qualidade: valores  $\leq 40,0\%$  são considerados pobres, de 40,1 até 79,9% regulares, valores  $\geq 80,0$  a 89,9% são considerados bons e  $\geq 90\%$  são considerados excelentes.

## Resumo do capítulo

O sistema imunitário, assim como os demais sistemas do organismo, possui suas próprias células, tecidos, órgãos e moléculas. A principal célula desse sistema é o linfócito. Os linfócitos são as únicas células do organismo que expressam receptores altamente diversificados para o antígeno, o que permite o reconhecimento de uma grande variedade de substâncias estranhas.

A ativação do sistema imune adaptativo depende da apresentação de antígenos. Um antígeno é qualquer substância que pode ser reconhecida por um anticorpo ou por um receptor de célula T. Os antígenos possuem duas propriedades: a imunogenicidade e a antigenicidade. Os que não são capazes de induzir uma resposta imune são chamados de haptenos e precisam ser acoplados às moléculas carreadoras para adquirirem tal capacidade. O determinante antigênico, ou epitopo, é a menor porção da molécula e é responsável pela propriedade de estimular uma resposta imune. As superfícies celulares, incluindo os microrganismos, geralmente possuem uma grande quantidade de determinantes antigênicos.

Os anticorpos atuam na resposta imune ligando-se especificamente ao agente patogênico ou seu subproduto, ativando o sistema complemento, opsonizando para aumentar a fagocitose e a citotoxicidade dependente de anticorpo, e permitindo, assim, que microrganismos e parasitos sejam destruídos pelas células do sistema imune.

Os anticorpos se encontram distribuídos por todo o organismo, pois os agentes infecciosos podem vencer as diversas barreiras naturais e estabelecer uma infecção em qualquer parte do corpo. Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune são as IgM e tendem a ser de baixa afinidade, mas são muito potentes na ativação do sistema complemento. A IgG é o principal isotipo no sangue e fluidos extracelulares, e é transportada através da placenta diretamente para a corrente circulatória do feto durante a vida intrauterina. A IgA tem papel importante na proteção das superfícies

mucosas contra patógenos ou seus subprodutos. A IgE tem como principal função o recrutamento de células inflamatórias através da ativação de mastócitos e basófilos, como também pode estar envolvida na eliminação de parasitos e processos alérgicos.

Existem vários sistemas proteicos de reação em cadeia no plasma sanguíneo, dentre estes, o sistema complemento, que é um complexo sistema constituído por moléculas termolábeis e termoestáveis, e que tem como função a eliminação de um agente estranho, facilitando a fagocitose, quando algumas proteínas ativadas do complemento opsonizam a superfície do patógeno; por reação Inflamatória, quando os pequenos fragmentos de proteínas recrutam fagócitos ao local da atividade inflamatória; ou por lise direta, quando, uma vez desencadeada a cascata, os componentes terminais do complemento lesam a membrana dos microrganismos.

Todo organismo multicelular possui algum sistema de defesa que distingue os patógenos e elimina-os do hospedeiro. A vantagem de tal imunidade específica é que o sistema imune pode rapidamente adaptar-se àqueles patógenos que são mais frequentemente encontrados no meio ambiente local. Esta capacidade é conseguida através do complexo principal de histocompatibilidade, cujos produtos desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio e o não próprio.

Didaticamente, a imunidade adaptativa se organiza em imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade mediada por células se desenvolve por uma rede de interações que resulta em defesa contra microrganismos, os quais sobrevivem dentro de fagócitos ou de outras células. A resposta é iniciada pelo reconhecimento do antígeno de microrganismos intracelulares por células T através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Na resposta via CD8, somente a célula alvo que porte o antígeno associado à classe I pode ser lisada ou induzida a entrar em apoptose. Em outro mecanismo da resposta celular, as células T CD4+ Th1 ativam, por exemplo, macrófagos

infectados através de citocinas como o IFN- $\gamma$ . Quando um patógeno resiste aos efeitos dos macrófagos ativados, pode-se desenvolver uma infecção crônica. Já a resposta imune humoral conduz à destruição dos microrganismos extracelulares e previne ou diminui a disseminação das infecções intracelulares, por meio da neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento. A ativação das células B e sua diferenciação em células secretoras de imunoglobulinas são deflagradas pelo antígeno específico e requer a participação de células CD4+ Th2, que também controlam a mudança de isotipo e desempenham papel importante na hipermutação somática, o que é necessário para a maturação da afinidade dos anticorpos.

Em algumas infecções, o sistema imunitário não consegue eliminar o parasito, mas reage isolando o agente com células inflamatórias. Na esquistossomose, a formação do granuloma é um exemplo da reação do hospedeiro contra o parasito. A maioria dos parasitos desenvolve mecanismos de escape do sistema imune para garantir sua sobrevivência e alguns comprometem tanto as respostas mediadas por anticorpos como as mediadas por células.

A medida das interações entre antígeno-anticorpo com o propósito de diagnóstico é conhecida como imunossorologia. As técnicas imunossorológicas fundamentam-se na natureza da interação antígeno-anticorpo nas quais podem expressar-se em duas formas distintas, em decorrência da utilização de imunorreagentes livres de marcação ou de reagentes marcados. As técnicas que não empregam marcadores demonstram-se por fenômenos visíveis. Portanto, ao se combinar anticorpos com antígenos solúveis, os complexos resultantes podem formar precipitados insolúveis. Se os antígenos são particulados (bactérias, protozoários, hemácias), os anticorpos os aglutinam. Se o anticorpo pode ativar a via clássica do sistema complemento e o antígeno se encontra em uma superfície celular, o resultado pode ser a citólise. As técnicas que empregam imunorreagentes marcados caracterizam-se pela simples combinação do antígeno com o anticorpo, necessitando que um deles esteja marcado convenientemente.

O imunorreagente pode ser marcado com corantes fluorescentes ou quimioluminescentes, radioisótopos, enzimas, ouro ou prata coloidais, entre outros marcadores.

Apesar de testes sorológicos produzirem muitos resultados verdadeiros, alguns resultados falsos podem ser gerados, sejam eles positivos ou negativos e, por conseguinte, é comum dizer que os testes sorológicos são presuntivos, ou seja, de valor probabilístico. Estes testes, obrigatoriamente, devem ser avaliados para definir parâmetros importantes quanto às suas qualidades fixas (sensibilidade, especificidade e acurácia), uma vez que estes valores independem da prevalência da infecção estudada na população.

### Questões

- 1) Descreva o processo de maturação das células  $T_H$  no timo.
- 2) Comente sobre a importância das moléculas de adesão na resposta imune.
- 3) Defina **imunogenicidade** e **especificidade**.
- 4) Defina **adjuvante** e sua função na resposta imune.
- 5) Descreva as principais propriedades das cinco classes de Imunoglobulinas.
- 6) Como você prepararia um anticorpo contra IgG humana?
- 7) Descreva o processo de ativação da via clássica e da via alternativa do complemento.
- 8) Descreva os principais mecanismos de atuação do sistema complemento na eliminação de patógenos.
- 9) Descreva o processamento e apresentação de um antígeno intracelular presente no citoplasma da célula.

- 10) Descreva o processamento e apresentação de um antígeno, oriundo de uma bactéria extracelular, que foi ativamente fagocitada por um macrófago.
- 11) Descreva os principais mecanismos de atuação da resposta humoral.
- 12) Descreva os mecanismos de ação exercidos pelas células CD8 na resposta celular.
- 13) Descreva os principais mecanismos de imunidade inata e adaptativa contra vírus.
- 14) Descreva os principais mecanismos de imunidade adaptativa e específica contra bactérias extracelulares e bactérias intracelulares.
- 15) Como os helmintos parasitas do lúme intestinal são expulsos do organismo?
- 16) Sempre que encontramos uma reação imunológica positiva, ela determina a presença do agente etiológico? Justifique.
- 17)  que é conversão sorológica?
- 18) Explique o fenômeno **prozona** e como fazemos sua neutralização.
- 19)  que causa reação cruzada em provas sorológicas?  você sugere para impedir esse fenômeno?
- 20) Quais as provas sorológicas realizadas em banco de sangue para prevenção de doenças transmissíveis?
- 21) Quais as vantagens e desvantagens do uso de anticorpos monoclonais em provas sorológicas?
- 22) Como se processam as reações de aglutinação direta? Dê um exemplo de teste comumente usado para fins de diagnósticos.
- 23) Qual o fundamento da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)?
- 24) Fale sobre a reação Imunoenzimática (ELISA), quanto ao seu modo de ação, suas vantagens e desvantagens.



**25)** Na etapa de sensibilização das placas plásticas de microdiluição, da reação imunoenzimática ELISA, utilizamos tampões com pH elevado (por volta de 9,6) para preparar os antígenos proteicos. Por quê?

**26)** Com que propósito utilizamos caseína (proteína do leite) no desenvolvimento do ELISA?

**27)** Fale sobre o fundamento do teste de imunoeletrortransferência (*Western-blotting*).

**28)** Conceitue:

a) Sensibilidade; b) Especificidade

### **Bibliografia consultada**

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BACAL, N. S, FAULHARER, M. H. W. *Aplicação prática em citometria de fluxo*. São Paulo: Atheneu, 2003.

BENJAMINI, E. ; COICO, R. ; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

DUARTE, R. *Ensaio imunoenzimático (ELISA) para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae)*. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

FERREIRA, W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

HALLIWELL, R. E. W. ; GORMAM, N. T. *Imunologia clínica veterinária*. Zaragoza: Acribia, 1992.

JANEWAY, C. A. J.; et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

KINDT, T. J. ; GOLDSBY, R. A. ; OSBORNE, B. A. ; *Imunologia de Kubly*. 6.ed. Bookman, 2008.

O'CONNOR, J. E. et al. *The relevance of flow cytometry for biochemical analysis*. *IUBMB Life*. v. 51, n. 4, p. 231-239, 2001.

- PARHAM, P. *O sistema imune*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- PEAKMAN, M. ; VERGANI, D. *Imunologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.
- PEREIRA, W. A. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.
- ROITT, I. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. *Imunologia*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003.
- ROSEN, F. ; GEHA, R. *Estudos de casos em imunologia*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- SILVA, W. D. ; MOTA, I. *Bier: Imunologia básica e aplicada*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- TERR, AI. *et al. Imunologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- THUSFIELD, M. *Epidemiologia veterinária*. Zaragoza. Acribia, 1990.
- VAZ, N. M. ; FARIA, A. M. C. *Guia incompleto de imunobiologia: imunologia como se o organismo importasse*. Belo Horizonte: COOPMED, 1993.