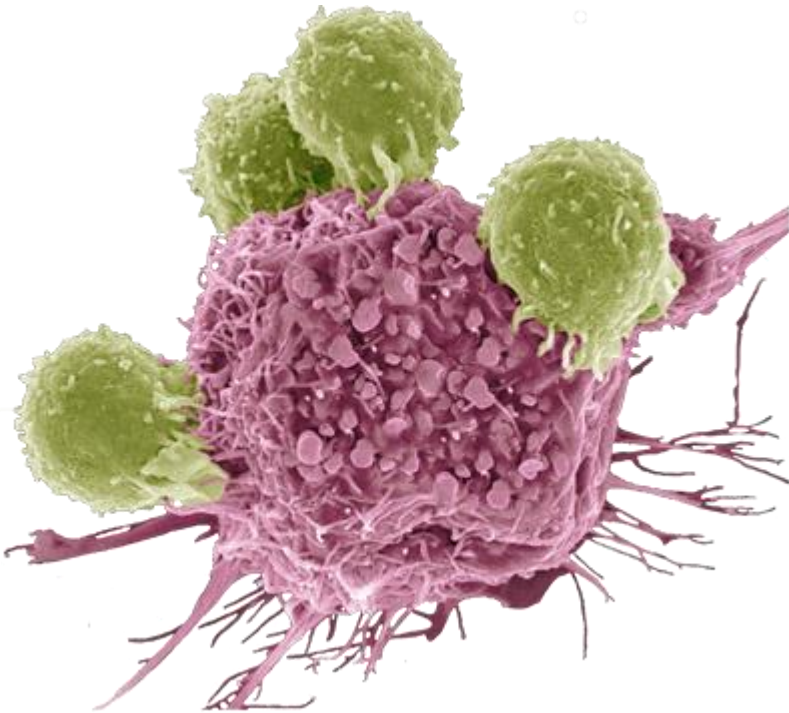


Limfocitele B și imunitatea mediată umoral

Curs 3



Objective

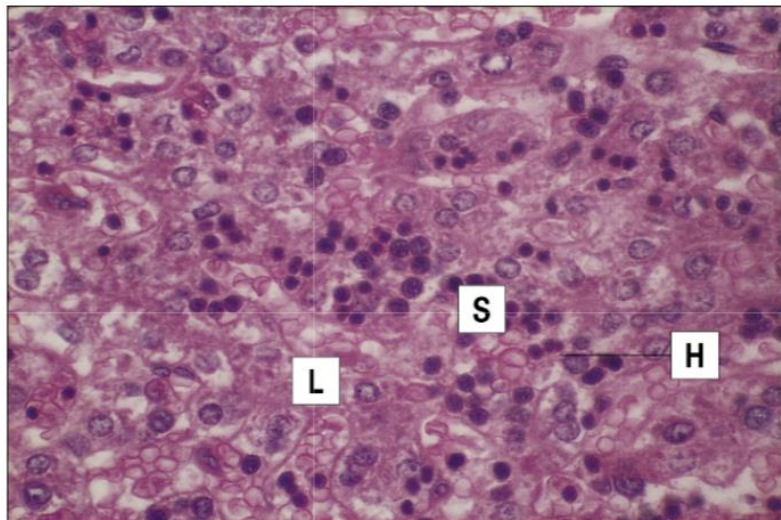
- Descrierea structurii de bază a moleculelor imunoglobulinice
- Explicarea funcțiilor anticorpilor și a rolului imunității umoral în prevenirea și eliminarea infecțiilor virale
- Enumerarea izotipurilor imunoglobulinice și descrierea relației dintre structura acestora, localizare și funcție
- Discutarea modalității prin care recombinarea somatică a genelor imunoglobulinice duce la diversitatea recunoașterii antigenice
- Descrierea dezvoltării antigen-independentă a limfocitelor B
- Descrierea dezvoltării antigen-dependentă a limfocitelor B
- Sumarizarea relevanței clinice a imunoglobulinelor în stare de sănătate/boală

Cuprins

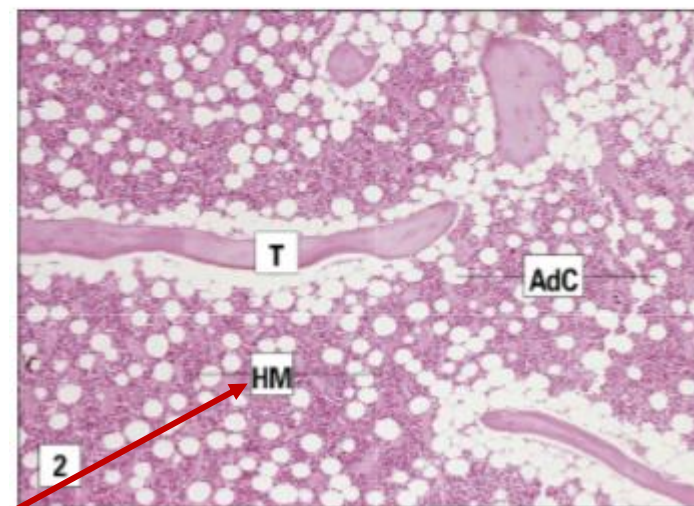
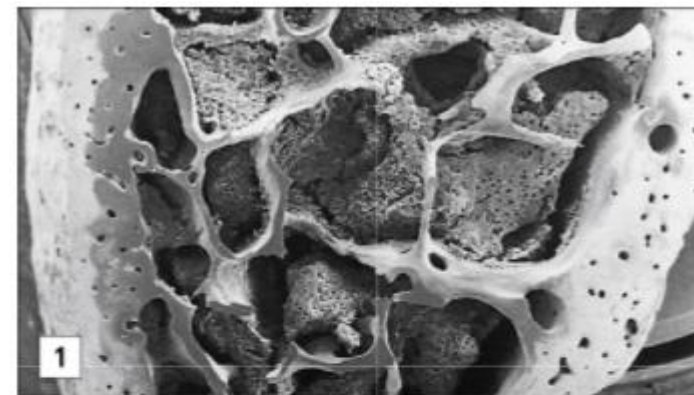
1. Dezvoltarea limfocitelor B
2. Receptorii limfocitelor B
3. Activarea limfocitelor B
4. Structura anticorpilor și generarea diversității de recunoaștere
5. Funcțiile anticorpilor
6. Clasele de anticorpi
7. Răspunsul imun primar și secundar
8. Imunoterapia pasivă
9. Anticorpii monoclonali

1. Dezvoltarea limfocitelor B – măduva osoasă hematogenă

1.1. Limfocitele B se dezvoltă la nivelul ficatului fetal și al măduvei osoase hematogene



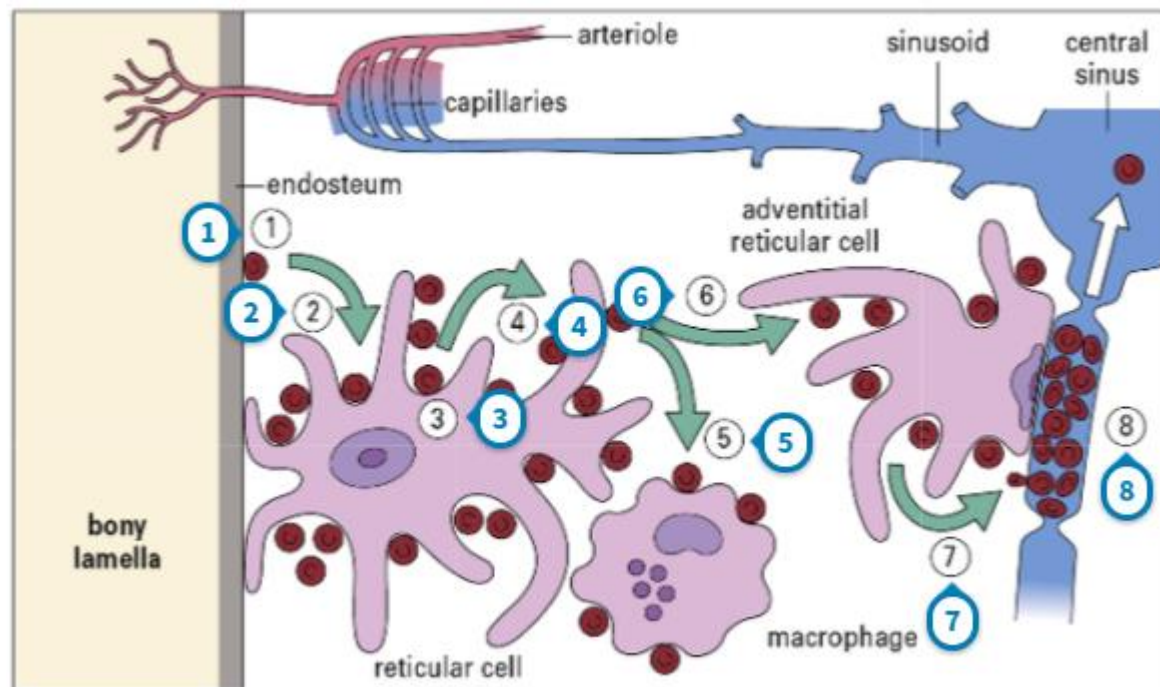
Hematopoieza la nivelul ficatului fetal – S8-S9 de gestație; H= insule de hematopoieză; L = celule hepatice; S = spații sinusoidale cu celule stem



Măduva osoasă hematopoietică

1. Dezvoltarea limfocitelor B – măduva osoasă hematogenă

1.1. Limfocitele B se dezvoltă la nivelul ficatului fetal și al măduvei osoase hematogene



1. Progenitorii timpurii – endosteum
2. Celulele reticulare stromale → proliferare și maturare
3. Suferă procese de **selecție pozitivă și negativă**
4. Celulele apoptotice sunt fagocitate de macrofage
5. LB care au supraviețuit interacționează cu celule reticulare adventițiale, situate la nivelul sinusoidelor → sinusurile venoase centrale → circulație

1. Dezvoltarea limfocitelor B – organele limfoide secundare

1.2. Splina

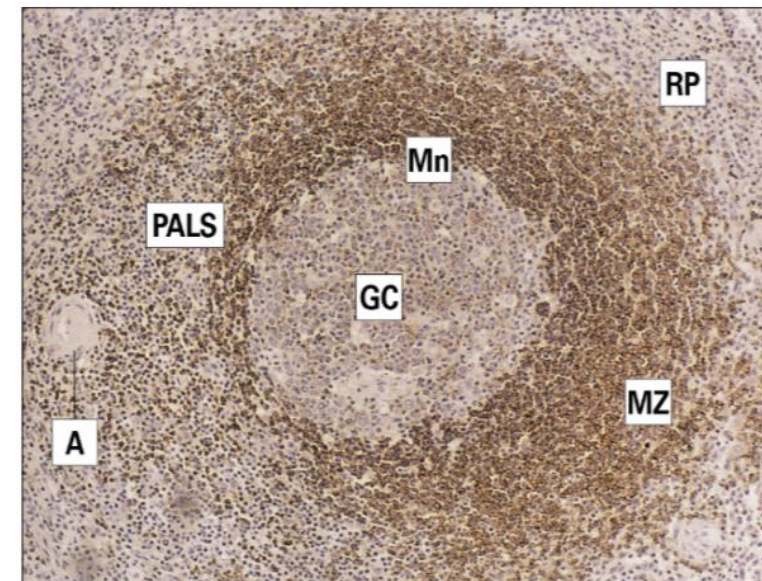
Organ încapsulat cu pulpă albă și pulpă roșie

Pulpa roșie:

- Eritrocite și macrofage (“cimitirul eritrocitelor”), PLT, granulocite, limfocite, numeroase plasmocite
- Funcție - sinteză de anticorpi față de antigenele circulante

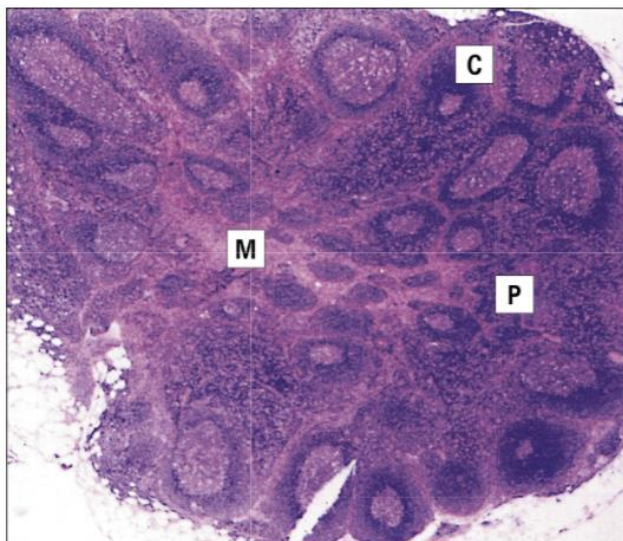
Pulpa albă:

- Țesut limfoid organizat în jurul unei arteriole centrale, pentru a forma tecile limfoide periarteriolare (PALS), formate din:
 - Limfocite T – în jurul arteriolei centrale (A)
 - Limfocite B – foliculi primari nestimulați (LB naive) și foliculi secundari stimulați (LB de memorie)
- **Zona marginală** – conține LB cu fenotip distinct ($\uparrow$ IgM, $\downarrow$ IgD, celule cu durată de viață lungă, recirculante, răspund la antigene timo-independente), macrofage, DC



1. Dezvoltarea limfocitelor B – organele limfoide secundare

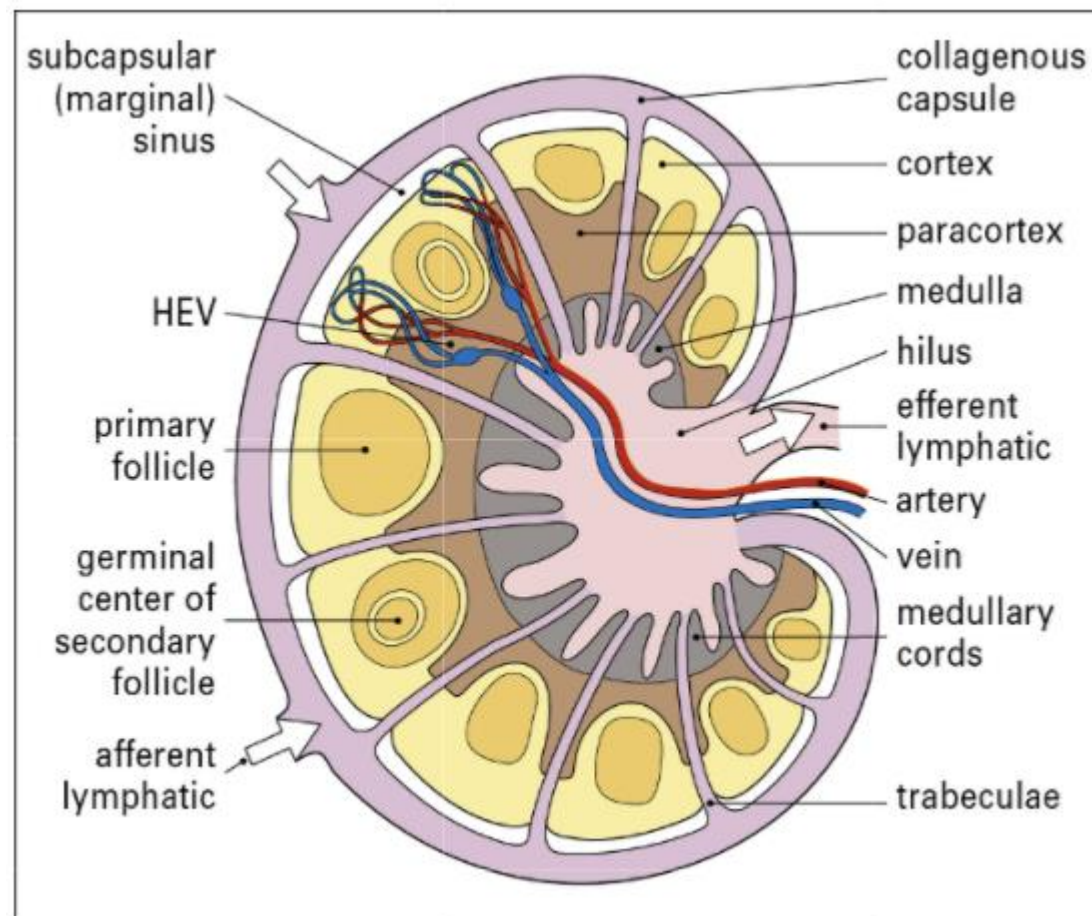
1.3. Ganglionii limfatici



C = cortex – LB

P = paracortex – LT

M = medulara – LB și LT, cu plasmocite și macrofage

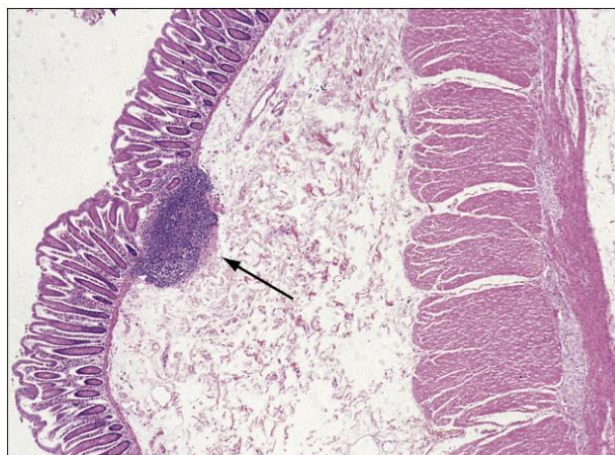


1. Dezvoltarea limfocitelor B – organele limfoide secundare

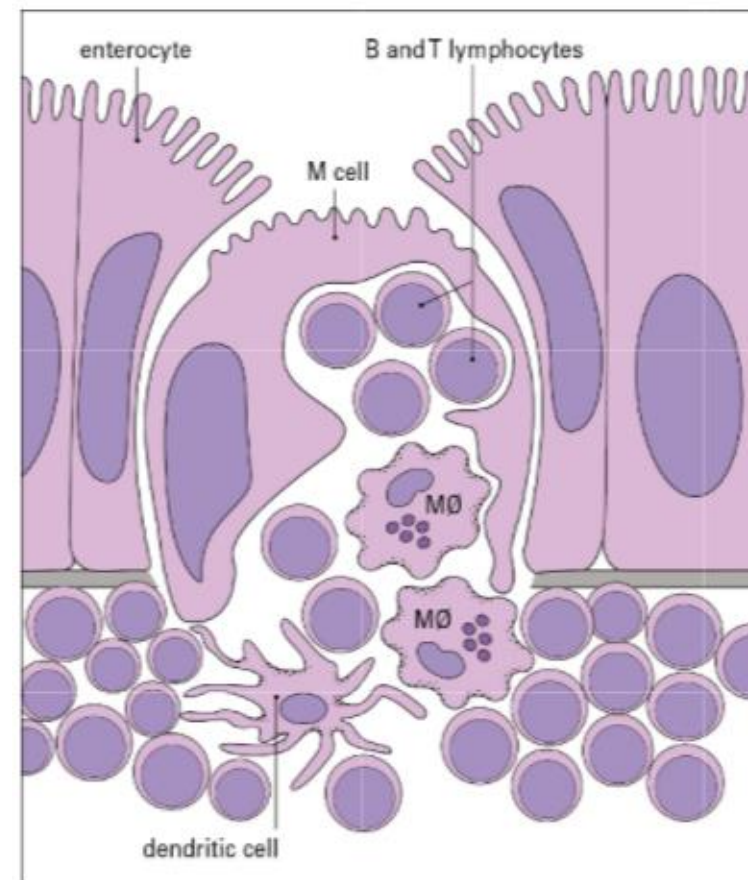
1.4. MALT

La nivelul lamina propria și ariile submucoase ale tractului gastrointestinal, respirator și genitourinar

- Waldeyer ring – amigdale palatine, linguale, faringiene
- Noduli solitari (intestin) sau agregate nodulare (apendice)
- Plăcile Peyer



- **Limfocitele din lamina propria (LPL)** sunt limfocite T activate, numeroase limfocite B activate, plasmocite – secretă în principal IgA, transportat prin epiteliu și eliberat în lumen
- **Limfocitele intraepiteliale (IEL)** sunt predominant limfocite T - $\uparrow \gamma\delta$ LT (10-40%) și LT CD8+ (70%)

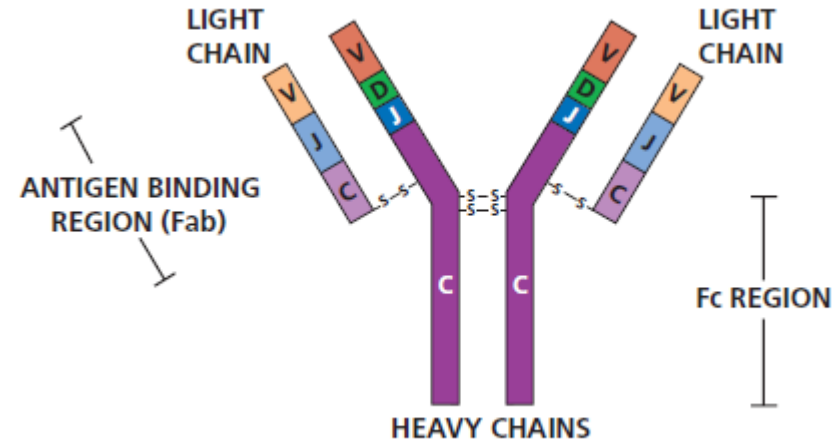


Transportul Ag este asigurat de celule epiteliale specializate –
celule M

2. Receptorii limfocitelor B (BCR = B Cell Receptors)

- Receptorii limfocitelor B sunt de 2 tipuri:

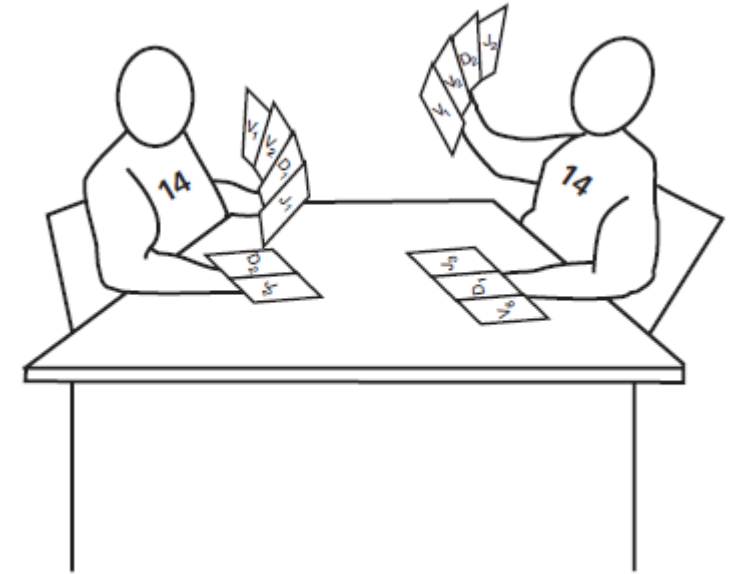
- IgM
- IgD



- Sunt formați din două tipuri de proteine:

- lanțul greu (Hc, heavy chain)
- lanțul ușor (Lc, light chain)

- Segmentele genice pentru generarea proteinelor sunt localizate pe cromozomul 14 (fiecare dintre cei 2 cromozomi contribuie cu segmente genice) – **excluziune alelică**



2. Receptorii limfocitelor B (BCR = B Cell Receptors)

BCR trec prin următoarele procese:

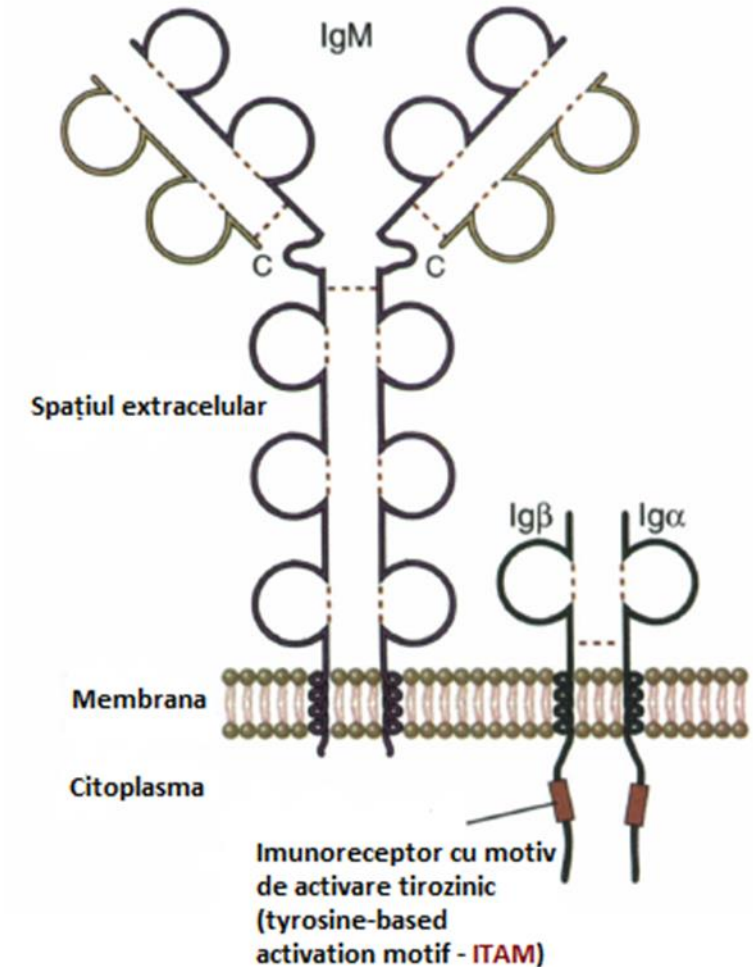
- Rearanjament genic (gene rearrangement)
- Rearanjament productiv (productive rearrangement)

Dacă limfocitul B nu reușește să producă Hc și Lc care să fie corect asamblate
→ moarte celulară ("sinucidere")



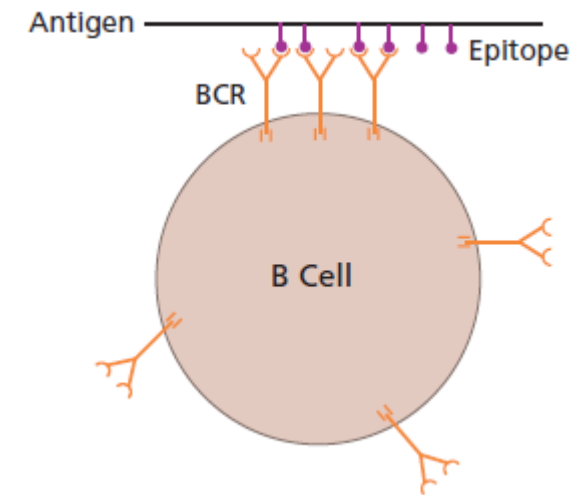
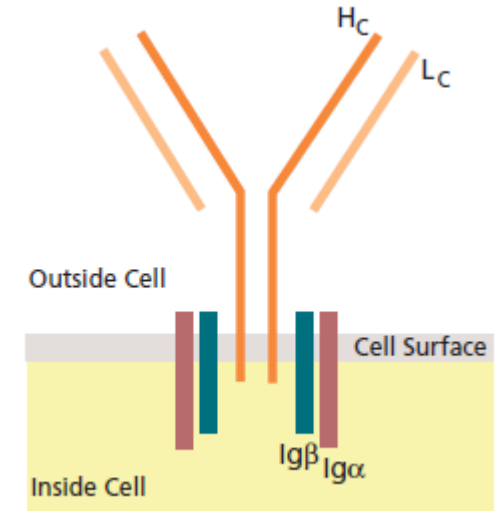
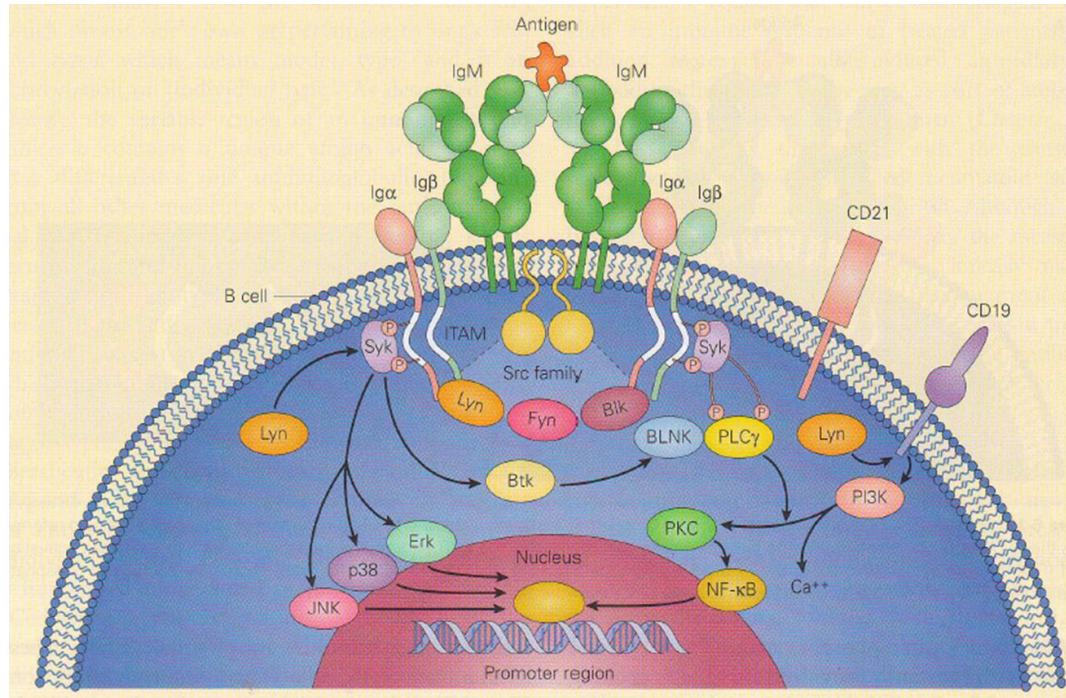
Dacă LB reușesc să sufere rearanjamente genice productive, se exprimă pe suprafața receptorul LB = **BCR**

- Fiecare limfocit B matur produce doar **un singur tip de BCR sau anticorp**
- Fiecare BCR este format **dintr-un singur tip de Hc și Lc**
- Mare diversitate a limfocitelor B de a recunoaște teoretic orice tip de moleculă organică (**3×10^{11} anticorpi**)



2. Receptorii limfocitelor B (BCR = B Cell Receptors)

- BCR se leagă de antigenul corespunzător "cognate" – epitop (6-12 AA)
- Semnalizează recunoașterea antigenului spre nucleu prin $Ig\beta$ și $Ig\alpha$, localizate intracitoplasmatic
- Pentru generarea unui semnal de activare, mai mulți BCR trebuie poziționați unul lângă celălalt pe suprafața limfocitului B = clusterizare sau crosslinking
- Clusterizarea BCR are loc dacă există mai mulți epitopi de același fel pe un singur antigen



Fiecare limfocit B are aproximativ 100000 BCR pe suprafață

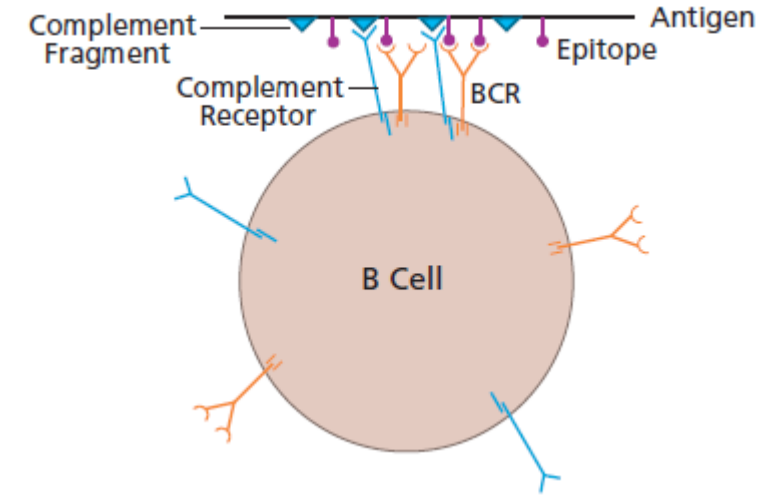
2. Receptorii limfocitelor B

Receptorul pentru complement (C3b) = co-receptor

Limfocitele B naive

Este suficient pentru activarea completă a limfocitelor B?

- Limfocitul B prezintă receptori pentru fragmentul C3b al complementului → recunoaște antigene opsonizate
- Clusterizarea BCR împreună cu receptorii pentru complement amplifică semnalizarea de aproximativ 100x



3. Activarea limfocitelor B

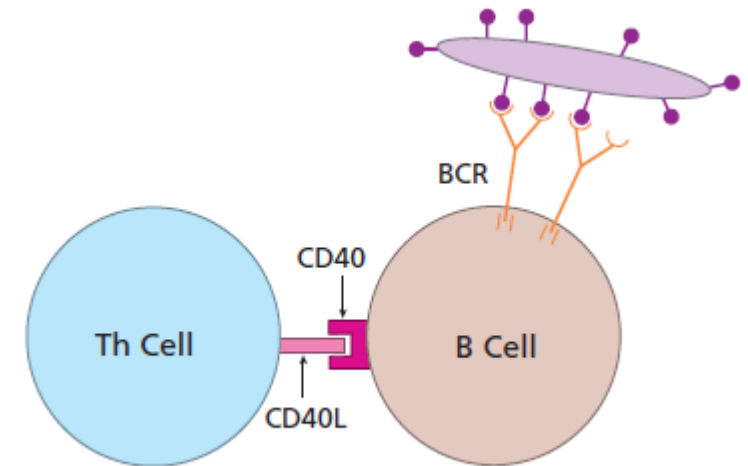
3.1. Activarea limfocitelor B dependentă de limfocitele Th

3.2. Activarea limfocitelor B independentă de limfocitele Th (depenentă de antigen)

3.3. Activarea limfocitelor B de mitogen

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

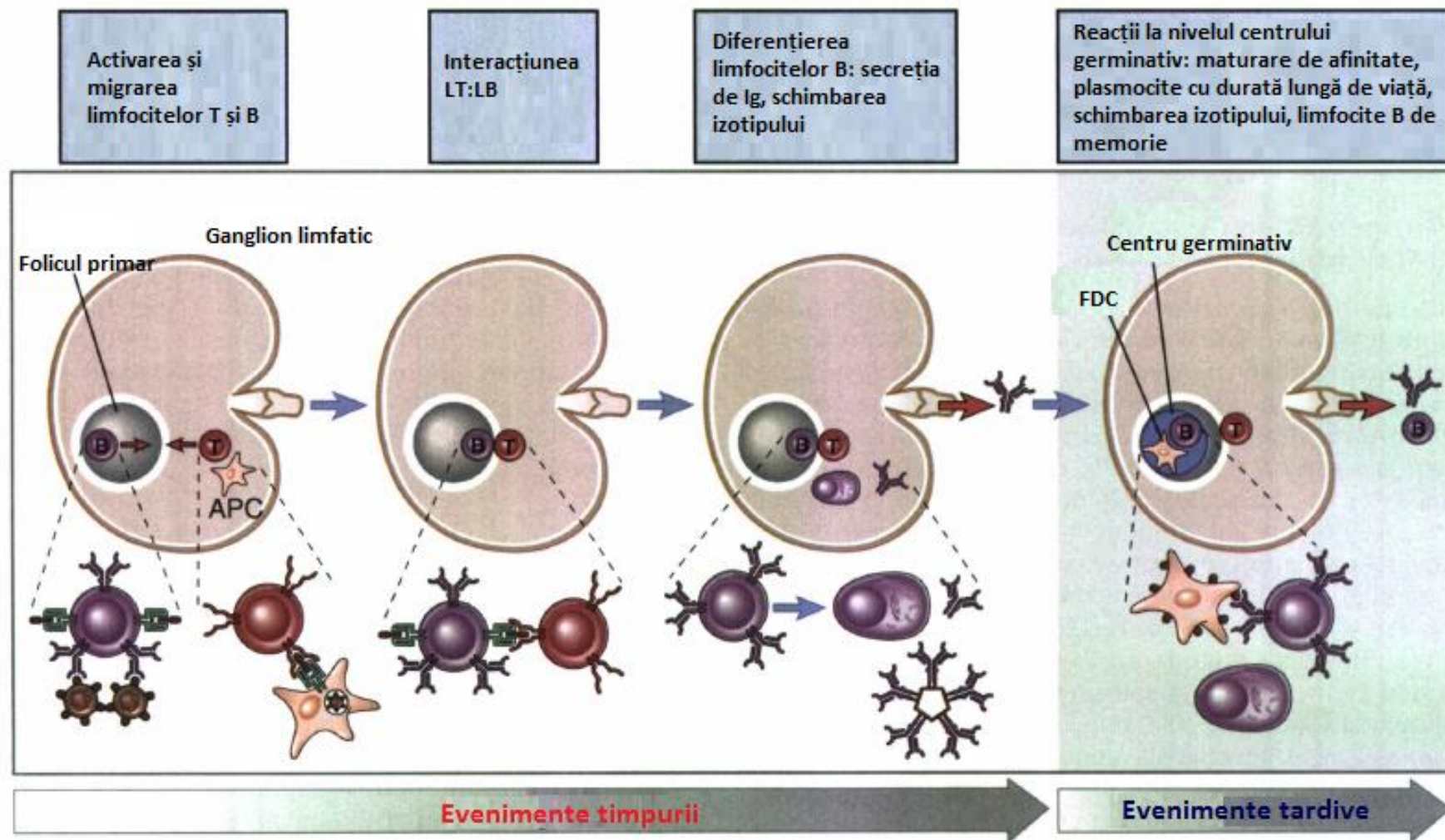
- Semnal co-stimulator
- Activarea prealabilă a limfocitelor T
- Procesarea antigenului și prezentarea împreună cu molecule MHC
- Eficient în activarea limfocitelor B și producția de anticorpi împotriva **antigenelor proteice**
- Deficiența de CD40L (CD154): sindrom hiper-IgM



3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

- Răspunsul imun este inițiat de recunoașterea antigenului de către LB și LT;
- Limfocitele activate migrează unele spre altele și interacționează → proliferarea LB, diferențierea în celule secretante de anticorpi și schimbarea timpurie de clasa a Ig;
- Evenimentele tardive au loc la nivelul centrilor germinativi și includ: maturare de afinitate și schimbare izotipului, precum și generarea limfocitelor B de memorie.

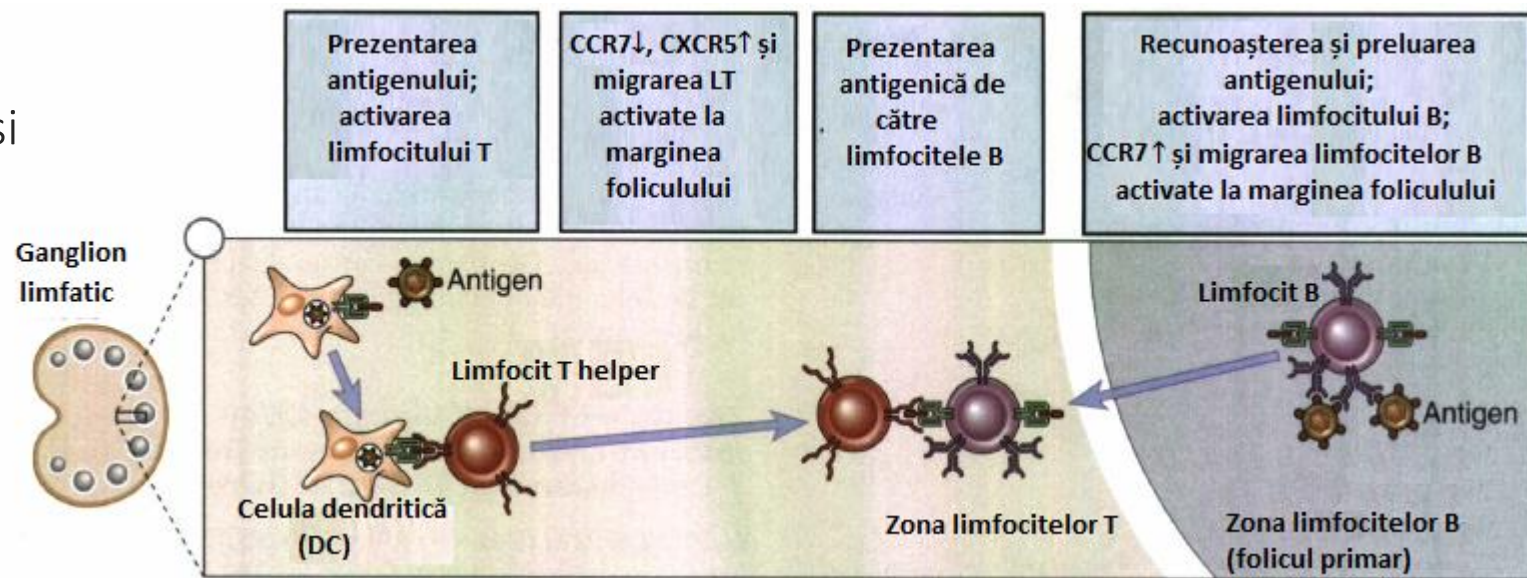


3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Etape:

1. Antigenul este preluat de DC și prezentat LT helper
2. LT helper sunt activate și exprimă CD40L și secretă citokine
3. LT helper activate sunt "instruite" să migreze spre folicul, pe baza gradientului chemokinelor
4. LB sunt activate de antigen în forma solubilă
5. LB procesează și prezintă antigenul, își modifică receptorii de chemokine de pe suprafață și migrează spre zona LT
6. Limfocitele T și B interacționează la interfața T-B, iar limfocitele B sunt activate de CD40L și citokine



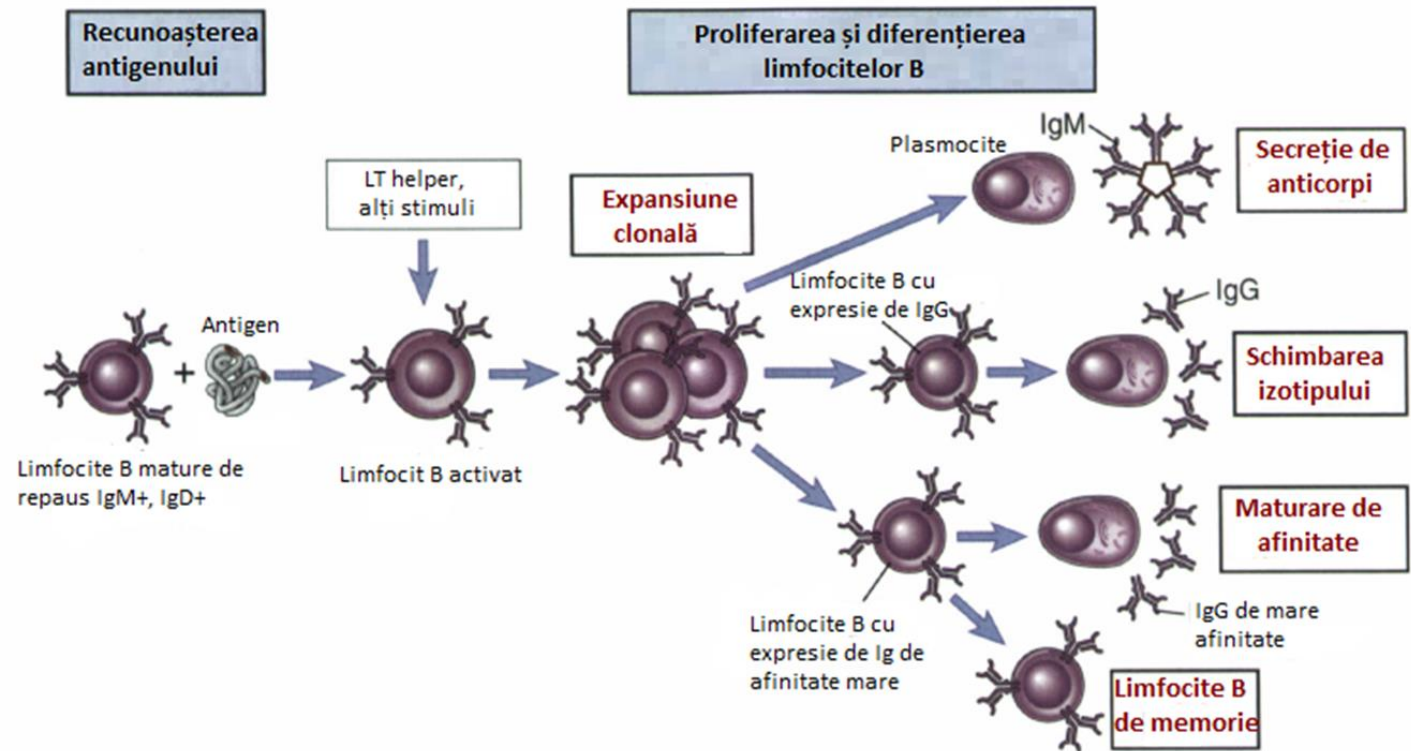
- **CXCR5** este receptorul pentru CXCL13, chemokină secretată de FDC
- **CCR7** este receptorul pentru CCL19 și CCL21; importantă pentru activarea DC și migrarea limfocitară

3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Etape:

7. În zona LT se formează focare mici extrafoliculare de LB și au loc procese de schimbare de clasă și excreție de Ig
8. LB activate migrează înapoi la nivel folicular. La nivel folicular se formează centri germinativi, locul schimbării masive de clasă, al mutațiilor somatice și evenimentelor de selecție care duc la maturarea de afinitate și generarea LB de memorie
9. La nivelul **centrilor germinativi** sunt generate plasmocitele cu durată mare de viață, unele dintre ele migrând la nivelul măduvei osoase

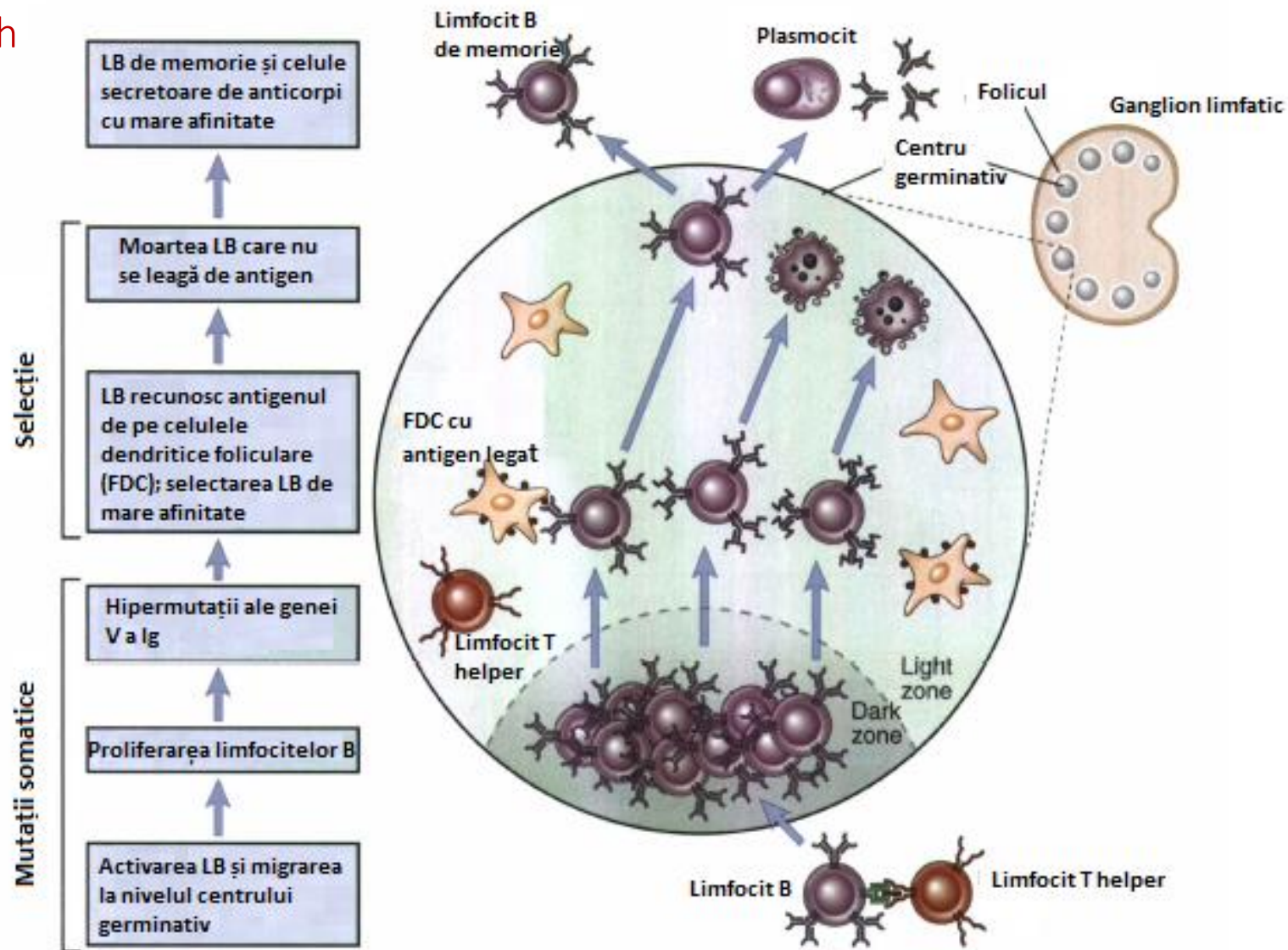


3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Evenimente la nivelul centrilor germinativi:

- Limfocitele B activate de LT la marginea foliculului primar migrează în folicul, proliferează și formează "dark zone";
- Aceste LB suferă mutații somatice ale genelor V ale Ig și migrează în "light zone" unde întâlnesc celulele dendritice foliculare (FDC) prezentatoare de antigen;
- LB cu Ig cu cea mai mare afinitate de legare sunt selectate să supraviețuiască și se diferențiază în limfocite B de memorie secretante de Ig

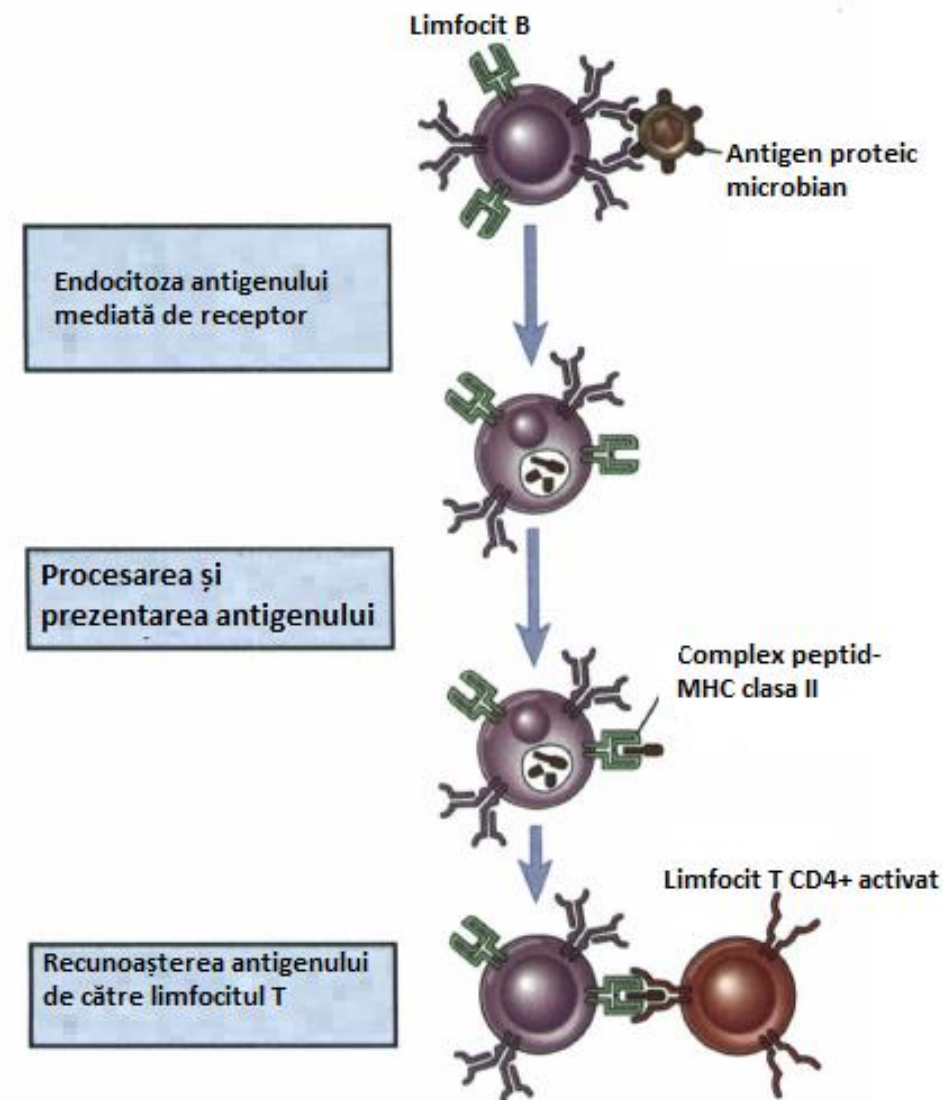


3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Interacțiunea LT-LB:

- Limfocitul B recunoaște specific Ag proteic
- Endocitează Ag
- LB este celulă prezentatoare de Ag → exprimă molecule MHC clasa II
- Procesează antigenul și îl prezintă pe suprafață împreună cu molecule MHC II
- Limfocitul T recunoaște specific complexul MHC – Ag prezentat de limfocitul B

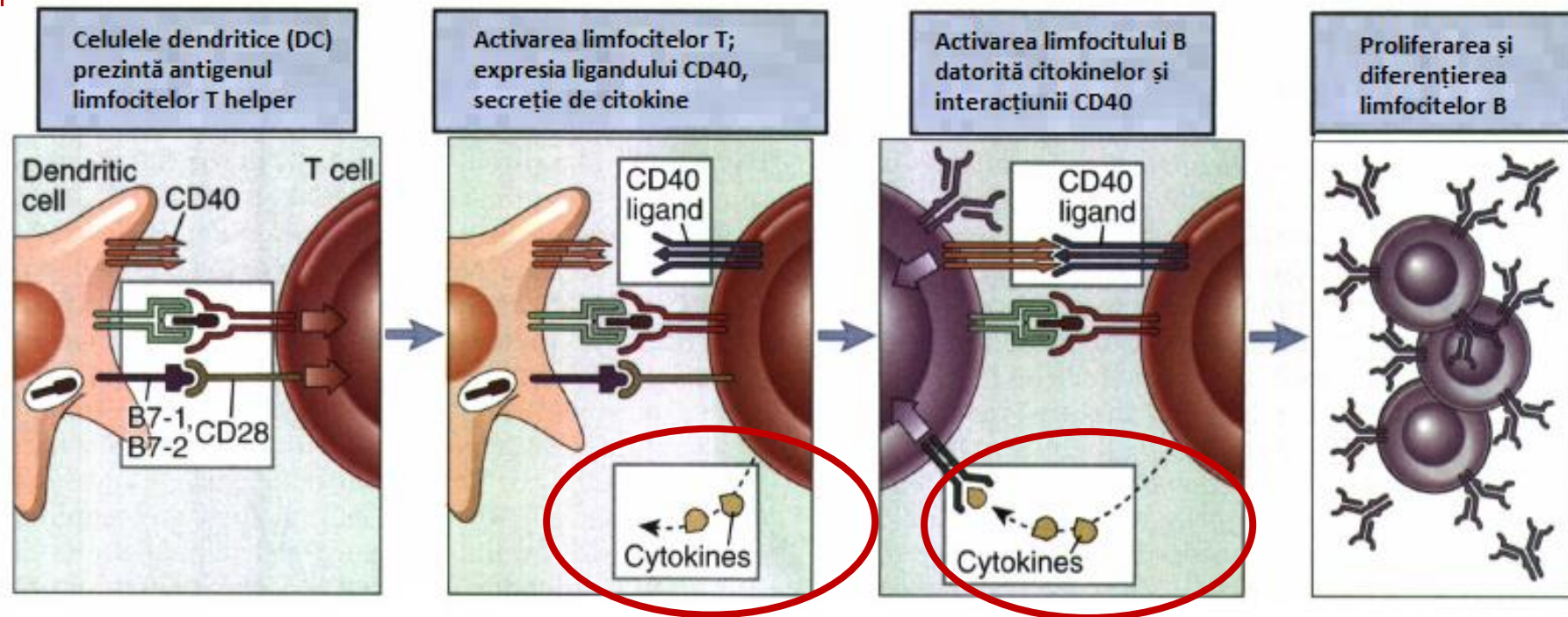


3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Interacțiunea LT-LB:

- Celulele dendritice (DC) prezintă inițial peptide procesate derivate din antigenele proteice endocitate și exprimă moleculele costimulatorii B7-1 și B7-2 (CD80 și CD86);
- Limfocitele T helper recunosc antigenul (sub forma complexului peptid-MHC) și semnalele costimulatorii și sunt stimulate să exprime CD40L și să secrete citokine;
- Prezența CD40L pe suprafața limfocitelor T helper induce legarea de CD40 de pe suprafața limfocitelor B și inițiază proliferarea și diferențierea limfocitelor B;
- Citokinele secretate de LT helper se leagă de receptori de pe suprafața limfocitelor B și stimulează diferențierea suplimentară a LB.



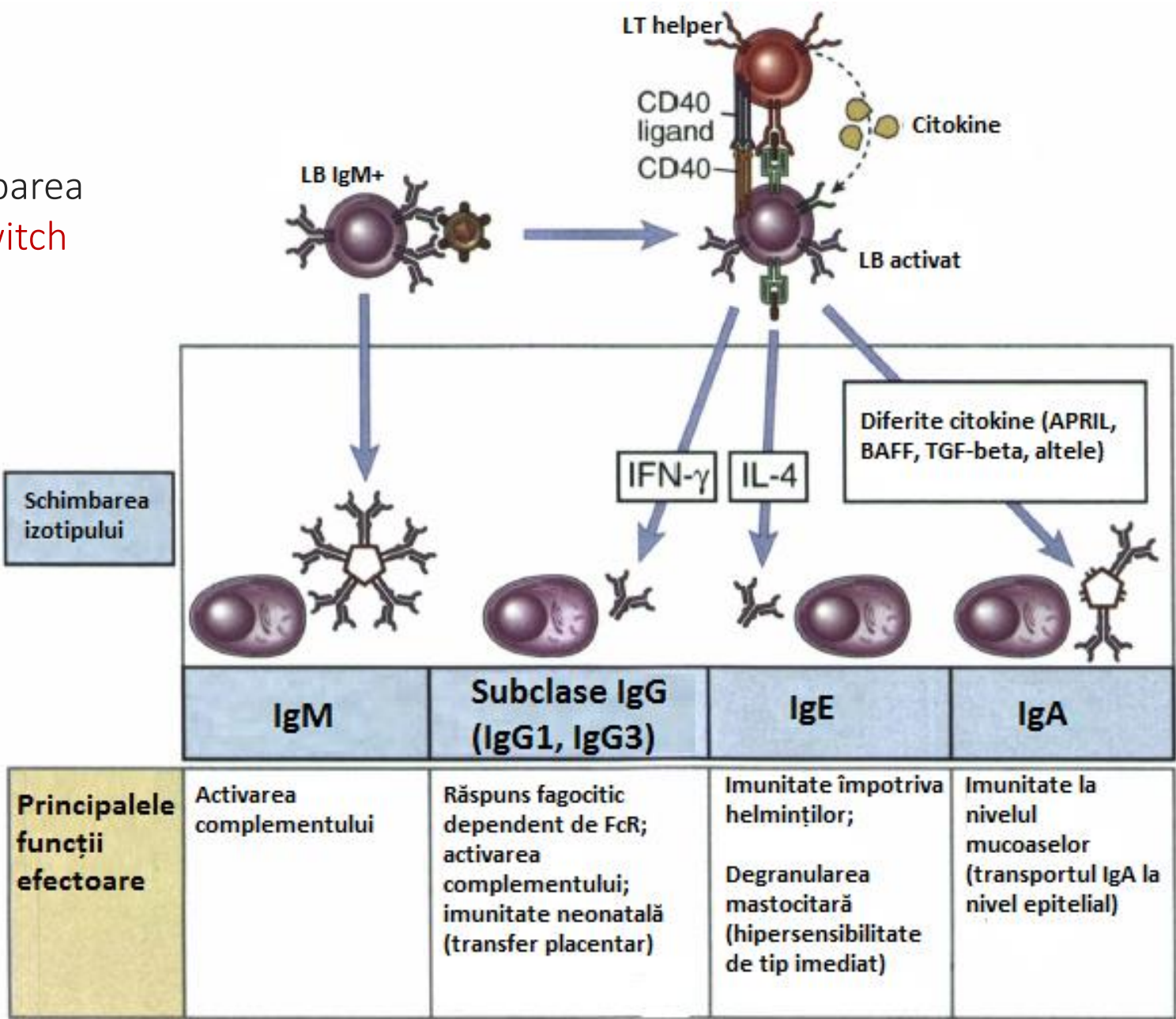
3. Activarea limfocitelor B

3.1. Activarea limfocitelor B depenentă de Th

Schimbarea clasei de imunoglobuline – schimbarea izotipului Ig / schimbarea clasei Ig = **isotype switch**

Care ar fi abordarea terapeutică pentru: ↓ sintezei de IgE, ↓ activării eozinofilelor, ↓ secreției de mucus și ↓ remodelării căilor respiratorii asociate cu astmul bronșic?

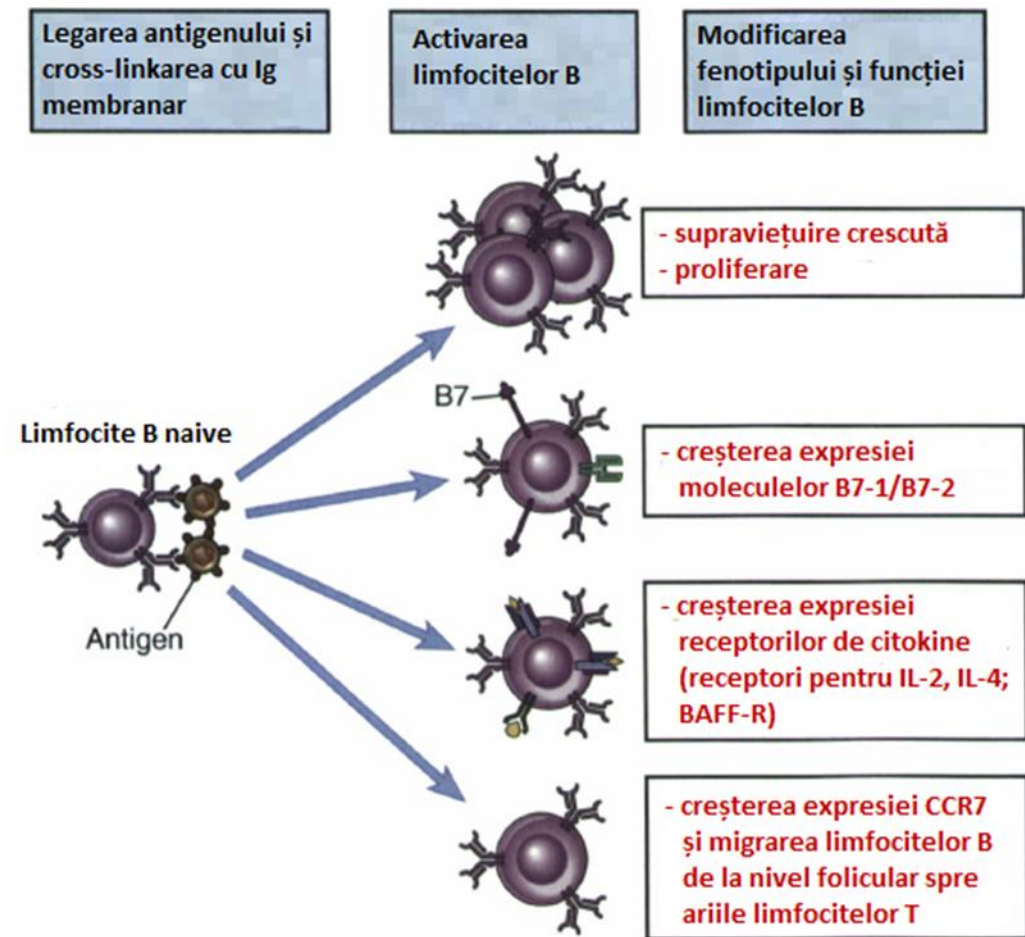
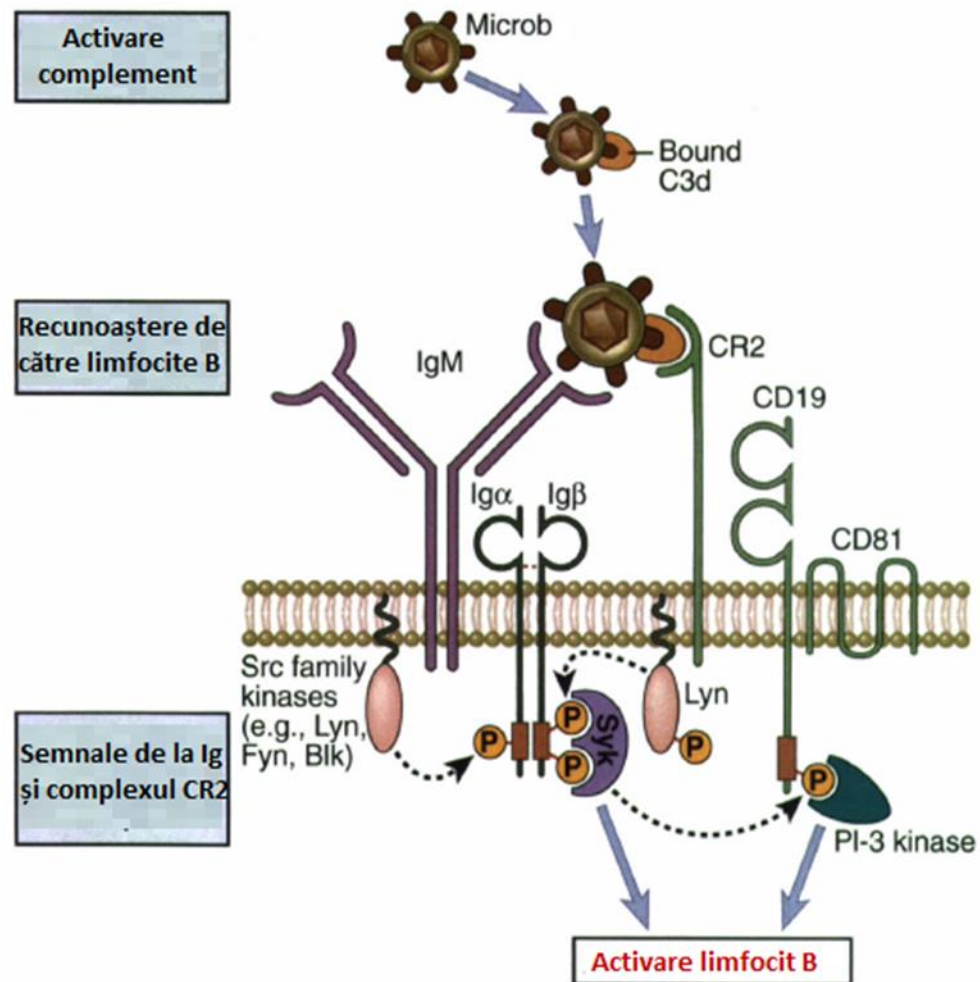
IL-4 și IL-13 au receptori comuni și căi de semnalizare comune
Anti-IL-13: anrukinzumab, lebrikizunab și tralokinumab
Anti IL-4: pascolizumab, pitakinra și dupilumab



3. Activarea limfocitelor B

3.2. Activarea limfocitelor B independentă de Th (dependentă de antigen)

+ Semnal de pericol = danger signal (PAMP-PRR)



3. Activarea limfocitelor B

3.2. Activarea limfocitelor B independentă de Th (TI, dependentă de antigen)

- Multe dintre antigenele TI (T-independent) sunt rezistente la degradare
- Antigenele TI sunt subdivizate în:
 - Ag. TI-1: sunt componente ale peretelui bacterian, de tip LPS (bacteriile Gram negative)
 - Ag. TI-2: sunt molecule mari de polizaharide, cu determinanți antigenici repetitivi (ex.: Ficoll, dextran, flagelina bacteriană polimerică, virusul poliomielitei)

Antigen	Polimeric	Activare policlonală	Rezistență la degradare
Lipopolizaharid	+	+++	+
Ficoll	+++	-	+++
Dextran	++	+	++
Levan	++	+	++
Poli-D aminoacizi	+++	-	+++
Flagelina bacteriană polimerică	++	++	+

Ce caracteristici comune se observă la multe dintre antigenele TI și cum sunt recunoscute astfel de antigene de către sistemul imun?

3. Activarea limfocitelor B

3.2. Activarea limfocitelor B independentă de Th (TI, dependentă de antigen)

Ag. TI-1

- În concentrație mare, au abilitatea de a activa clone de limfocite B specifice pentru alte antigene = activarea policlonală a limfocitelor B
- În concentrație scăzută activează doar limfocite B specifice
- Nu necesită un al doilea semnal de activare

Ag. TI-2

- Activează limfocitele B prin clusterizarea și cross-linkarea moleculelor de Ig de pe suprafața LB → semnalizare prelungită și persistentă
- Necesită co-semnalizare a LT non-cognate (secreție de citokine)
- Ag. TI induc memorie de scurtă durată a LB, nu induc schimbarea de clasă a IgM → IgG
- Ag. TI sunt importante pentru un răspuns mai rapid față de unele clase de bacterii
- Ag. TI se pot converti în Ag TD prin modificarea structurii, de ex.: polizaharidele pneumococice sunt Ag TI, care nu induc memorie imunologică sau producerea de Ac. la copii; conjugarea polizaharidelor pneumococice cu o proteină carrier induce apariția Ac. polizaharid-specifici și a memoriei imunologice, similar Ag. TD
- Ag. TI tind să activeze subsetul B-1 (CD5+) de LB, localizate în special la nivelul peritoneului

3. Activarea limfocitelor B

3.2. Activarea limfocitelor B independentă de Th (dependentă de antigen)

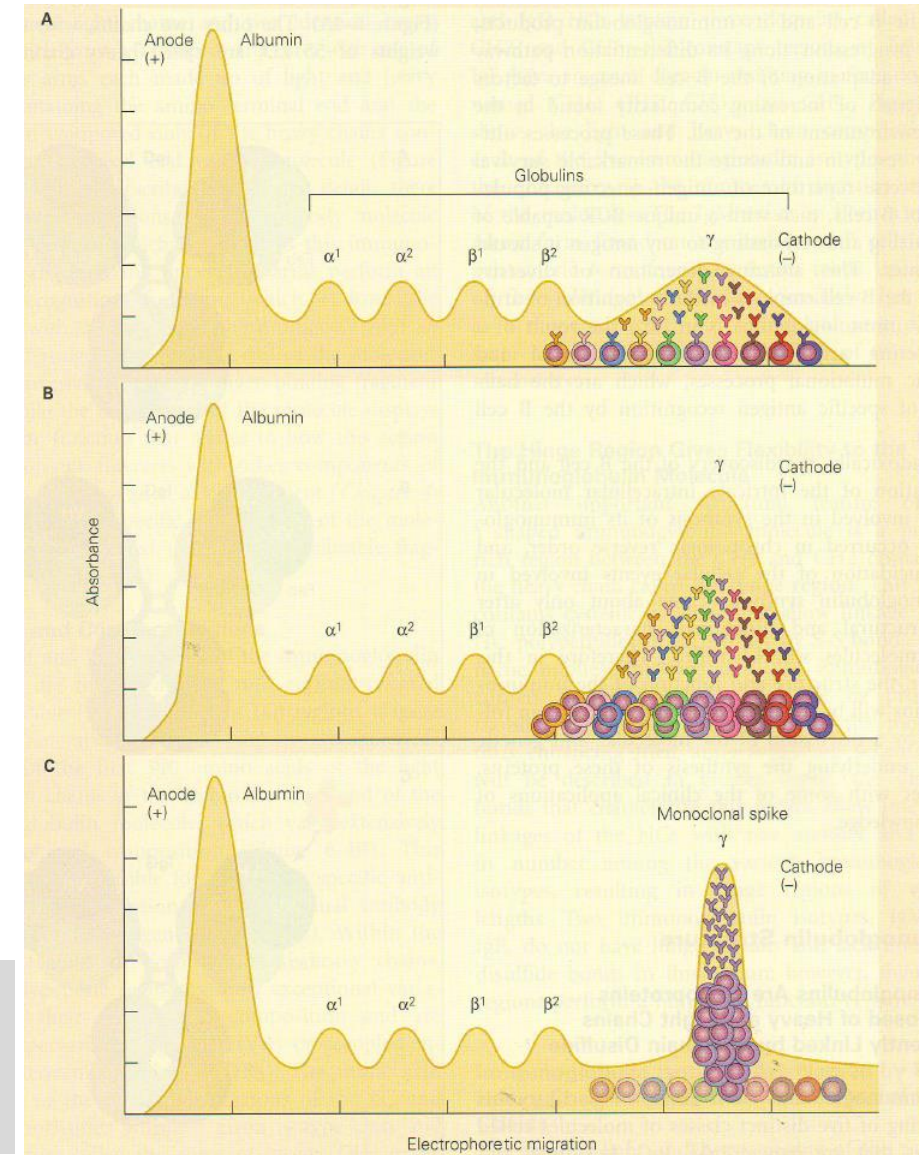
Răspunsul limfocitelor B la antigen	Importanță
Intrarea în mitoză	Expansiune clonală
Creștere expresiei de molecule costimulatoare B7	Abilitatea de a activa limfocitele T
Creșterea expresiei de receptori citokinici	Abilitatea de a răspunde la citokinele produse de limfocitele T
Migrarea în afara foliculilor limfatici	Interacțiunea cu limfocitele T heper
Secreția de IgM în cantitate scăzută	Răspuns imun umoral primar

3. Activarea limfocitelor B

3.3. Activarea limfocitelor B de mitogen

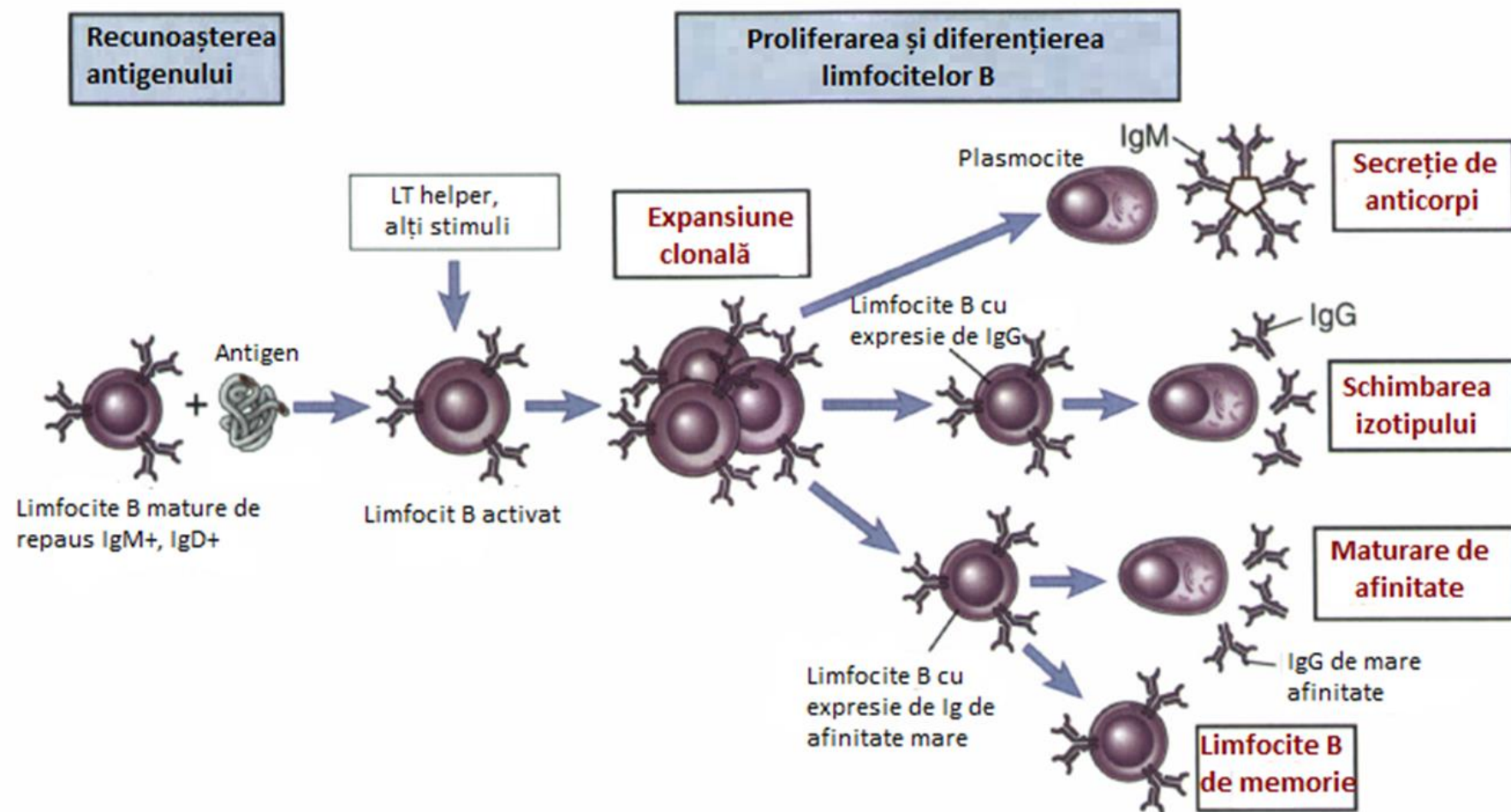
- **Mitogen** = agent care induce proliferarea celulară (virusuri, bacterii, paraziți, substanțe chimice)
- Se leagă de alți receptori decât BCR pe suprafața limfocitelor B (receptori pentru mitogeni)
- Induce activarea policlonală a limfocitelor B
- Nu depinde de antigenul specific
- Este o modalitate de a distinge sistemul imun de la producerea unui răspuns specific
- Ex.: virusul influenza H1 și H6, virusul Epstein-Barr, mitogeni tumorali care acționează pe MAPK, levan (carbohidrat non-structurat), dextran, Ficoll (polizaharid hidrofilic)

- A. Secreție normală policlonală de Ig la un adult sănătos
B. Secreție normală policlonală de Ig ca urmare a infecției
C. Secreție monoclonală în mielom multiplu



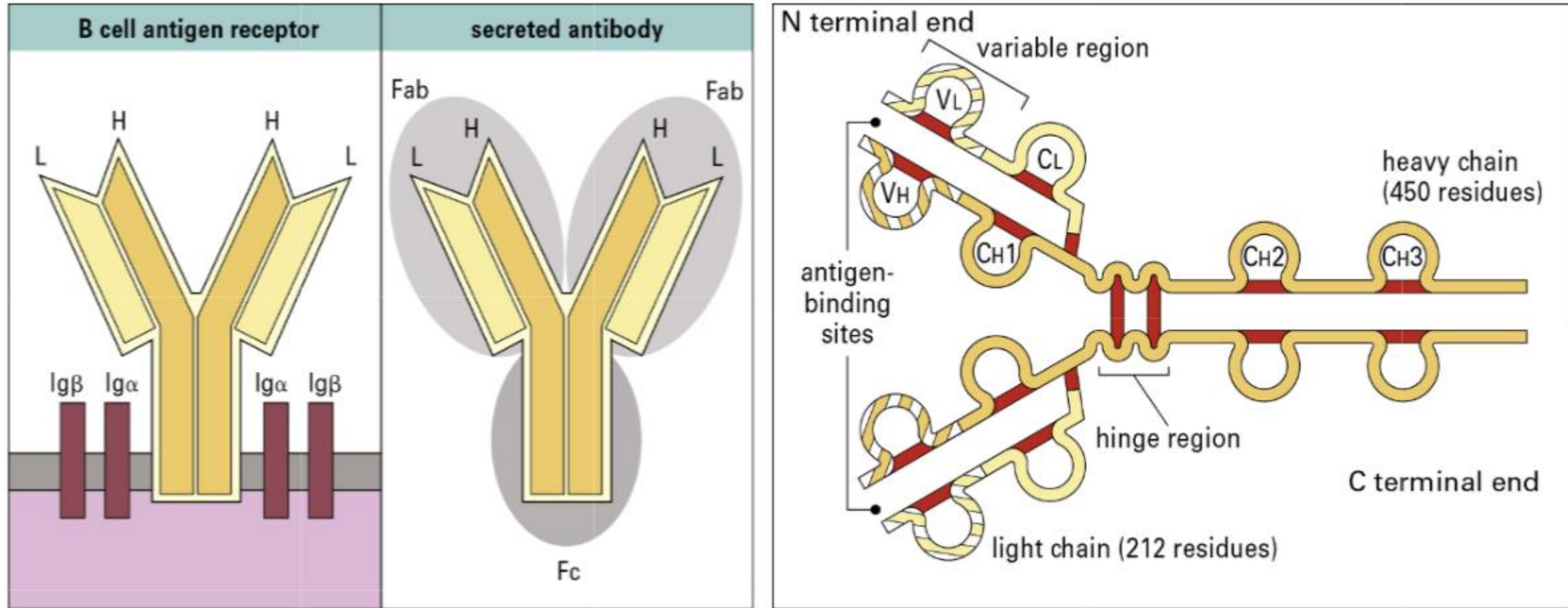
3. Activarea limfocitelor B

Cea mai eficientă activare a limfocitului B este activarea dependentă de limfocitul T!

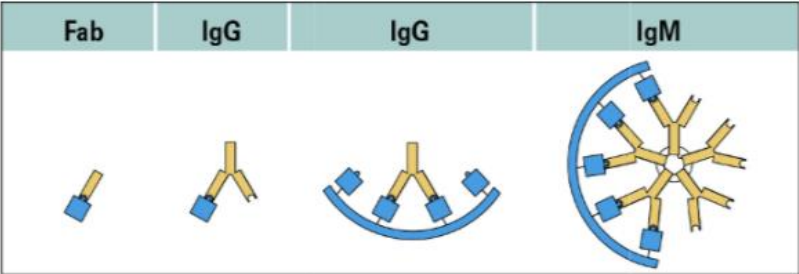


4. Structura anticorpilor și generarea diversității de recunoaștere

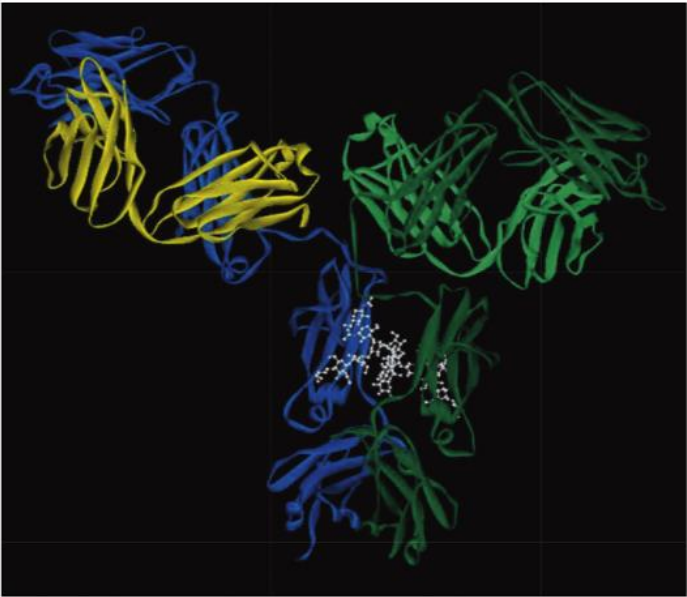
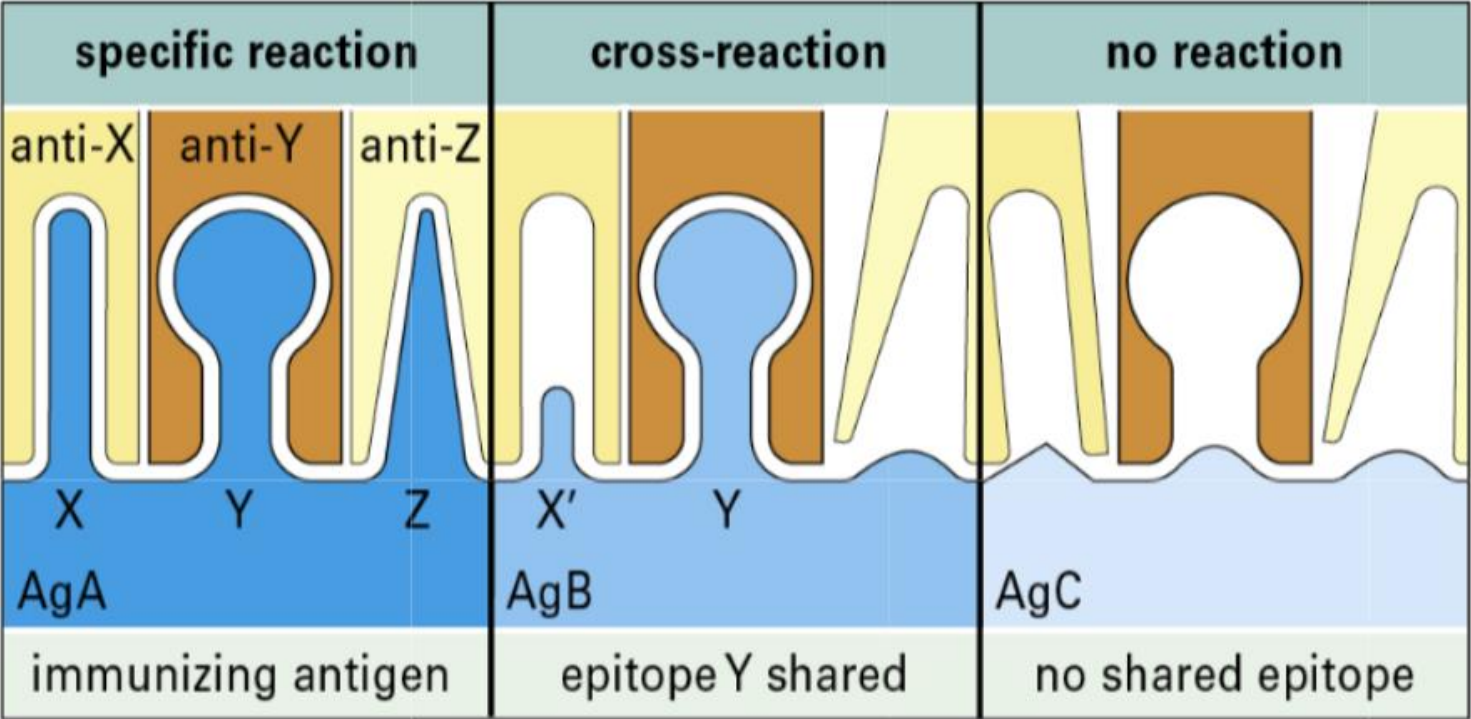
- Immunoglobulinele se găsesc sub 2 forme: receptori ai limfocitului B și imunoglobuline secretate (anticorpi)



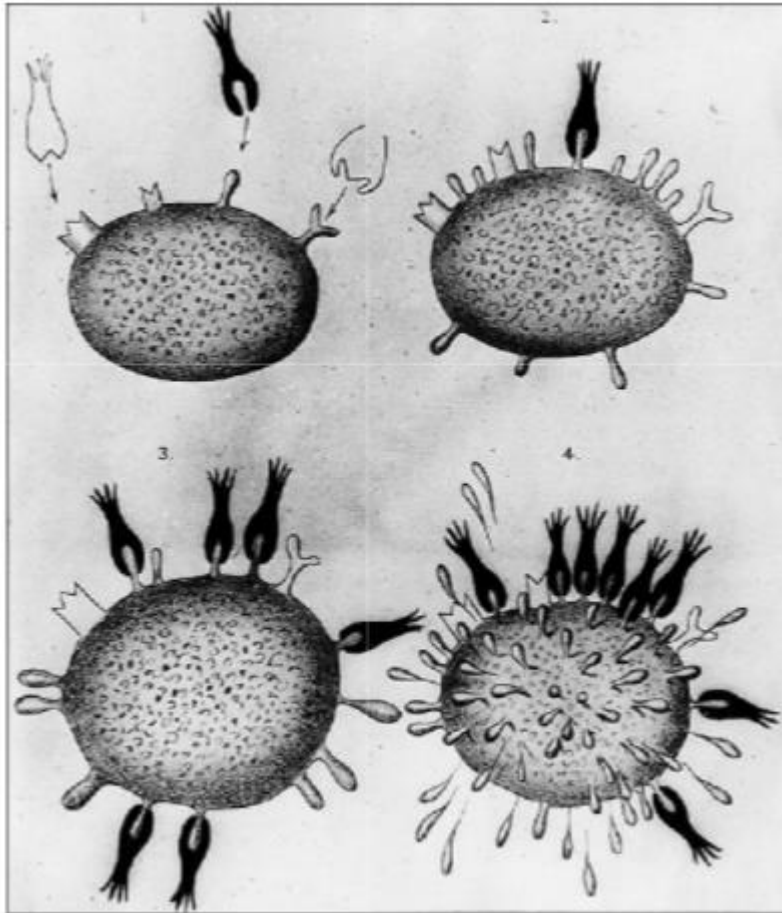
4. Structura anticorpilor și generarea diversității de recunoaștere



antibody	Fab	IgG	IgG	IgM
effective antibody valence	1	1	2	up to 10
antigen valence	1	1	n	n
equilibrium constant (L/mol)	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁷	10 ¹¹
advantage of multivalence	–	–	10 ³ -fold	10 ⁷ -fold
definition of binding	affinity	affinity	avidity	avidity
	intrinsic affinity		functional affinity	



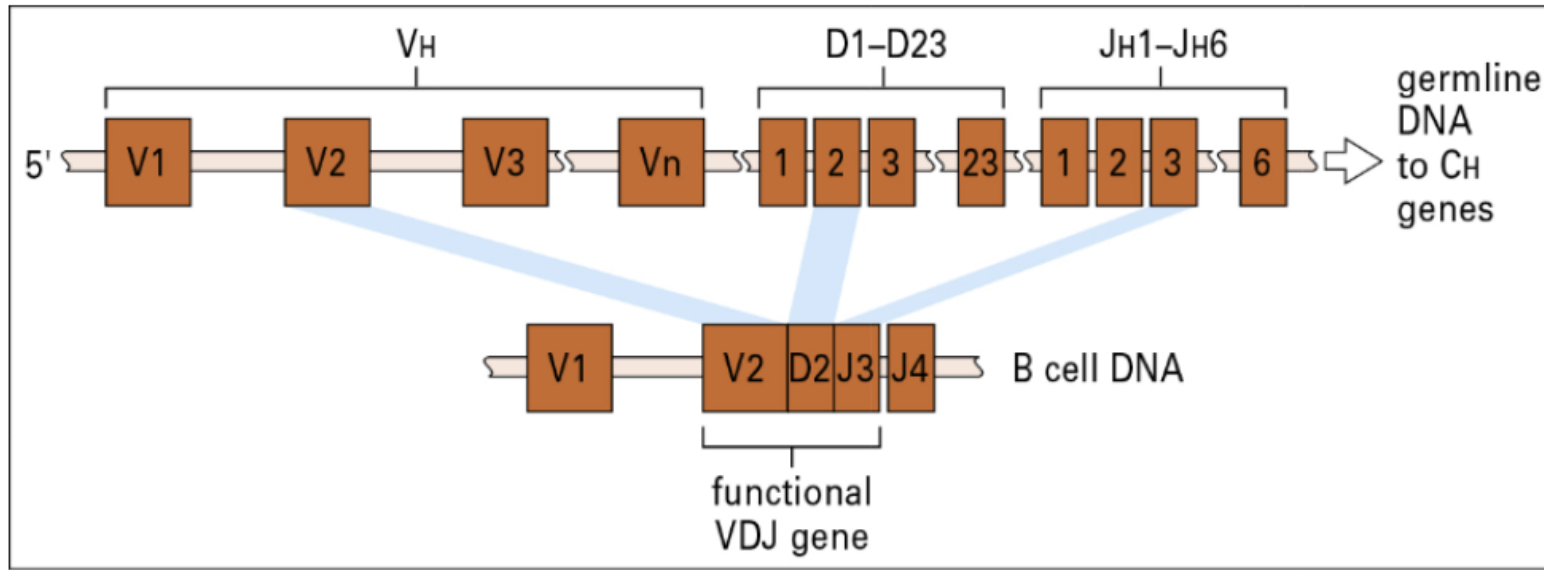
4. Structura anticorpilor și generarea diversității de recunoaștere



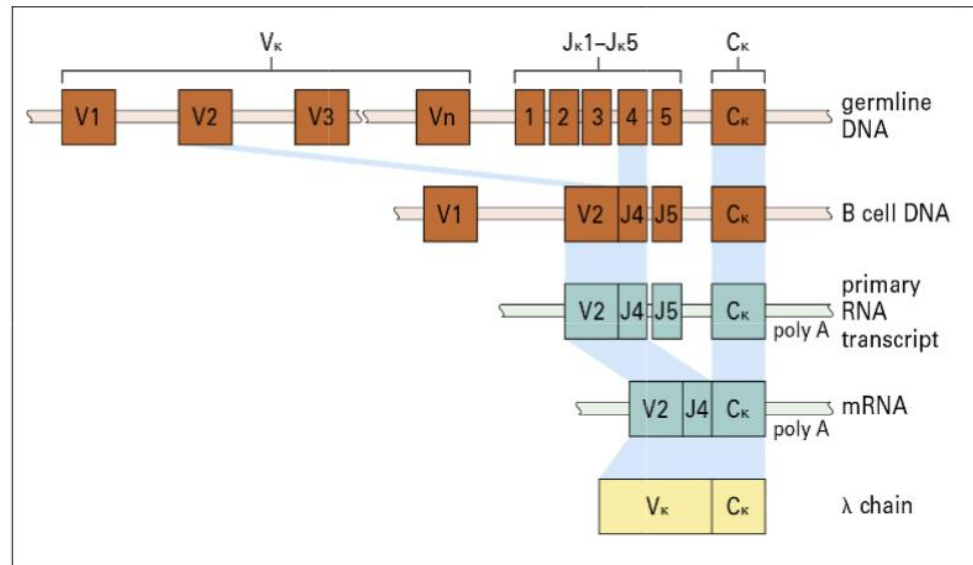
Modelul Paul Ehrlich de producere a anticorpilor

- Combinarea antigenelor cu receptori ai LB pre-formați induce producerea și secreția unei cantități mai mari de astfel de receptori
- Se credea că o singură celulă poate produce anticorpi pentru mai multe antigene
- A anticipat selecția clonală
- A anticipat teoria conform căreia sistemul imun poate genera receptori înainte de contactul cu antigenul

4. Structura anticorpilor și generarea diversității de recunoaștere



Generarea lanțurilor grele H_c și ușoare L_c ale imunoglobulinelor prin **recombinare VDJ**

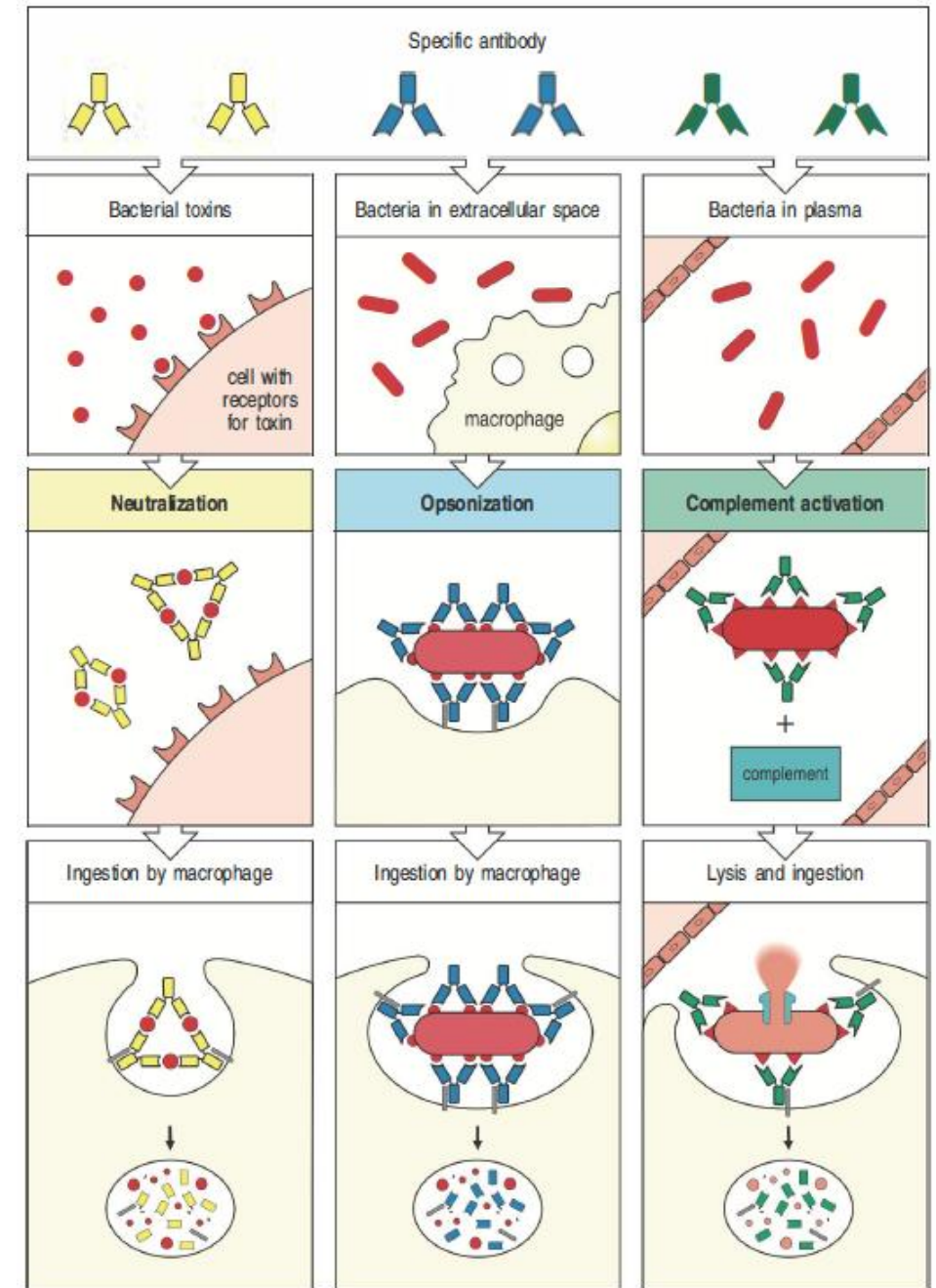


- Lanțurile ușoare pot fi de tip kappa (**κ**) și lambda (**λ**) (Korngold și Lipari)
- Fiecare imunoglobulină prezintă 2 lanțuri ușoare identice, fie κ (60%), fie λ (40%)

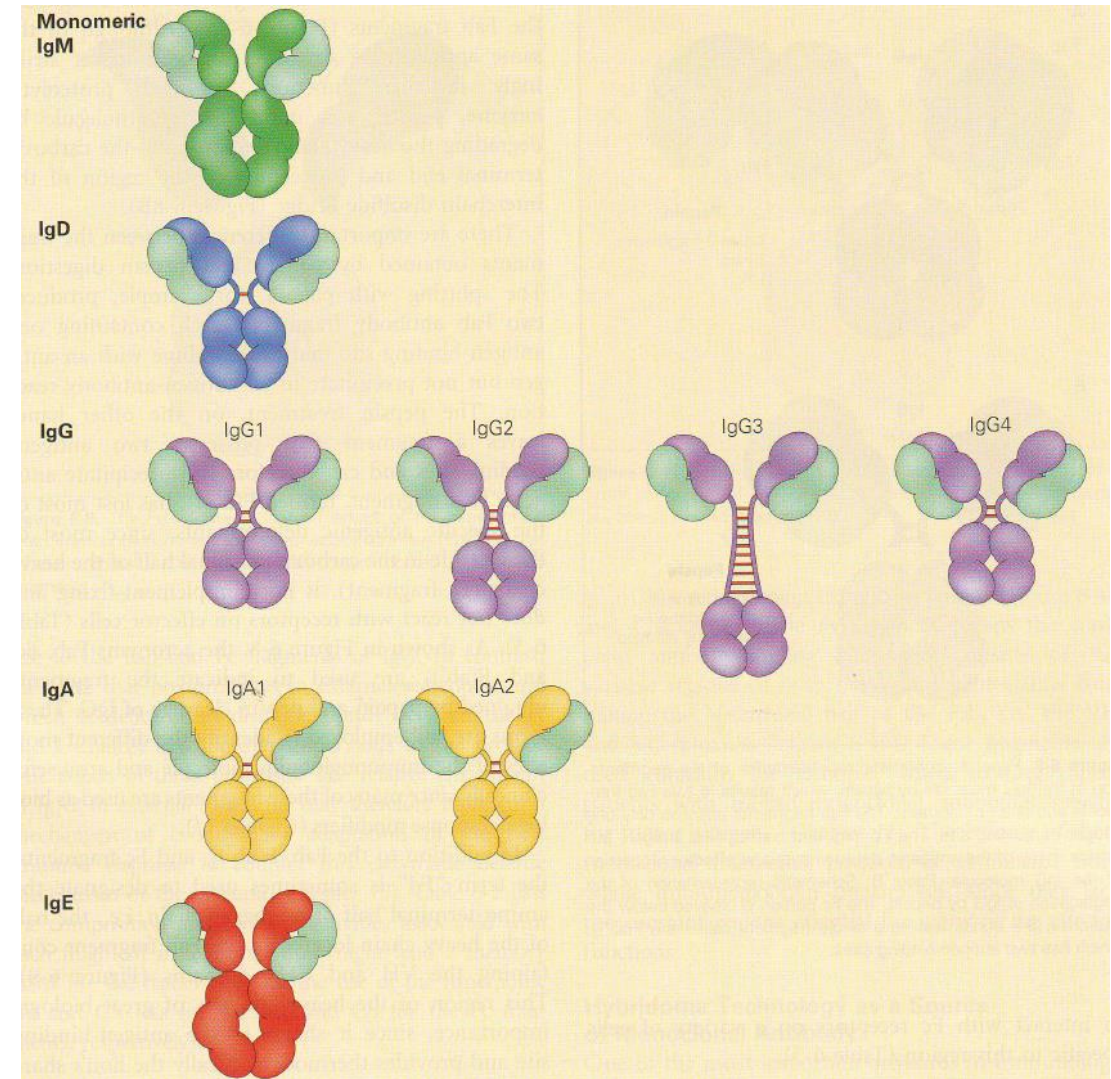
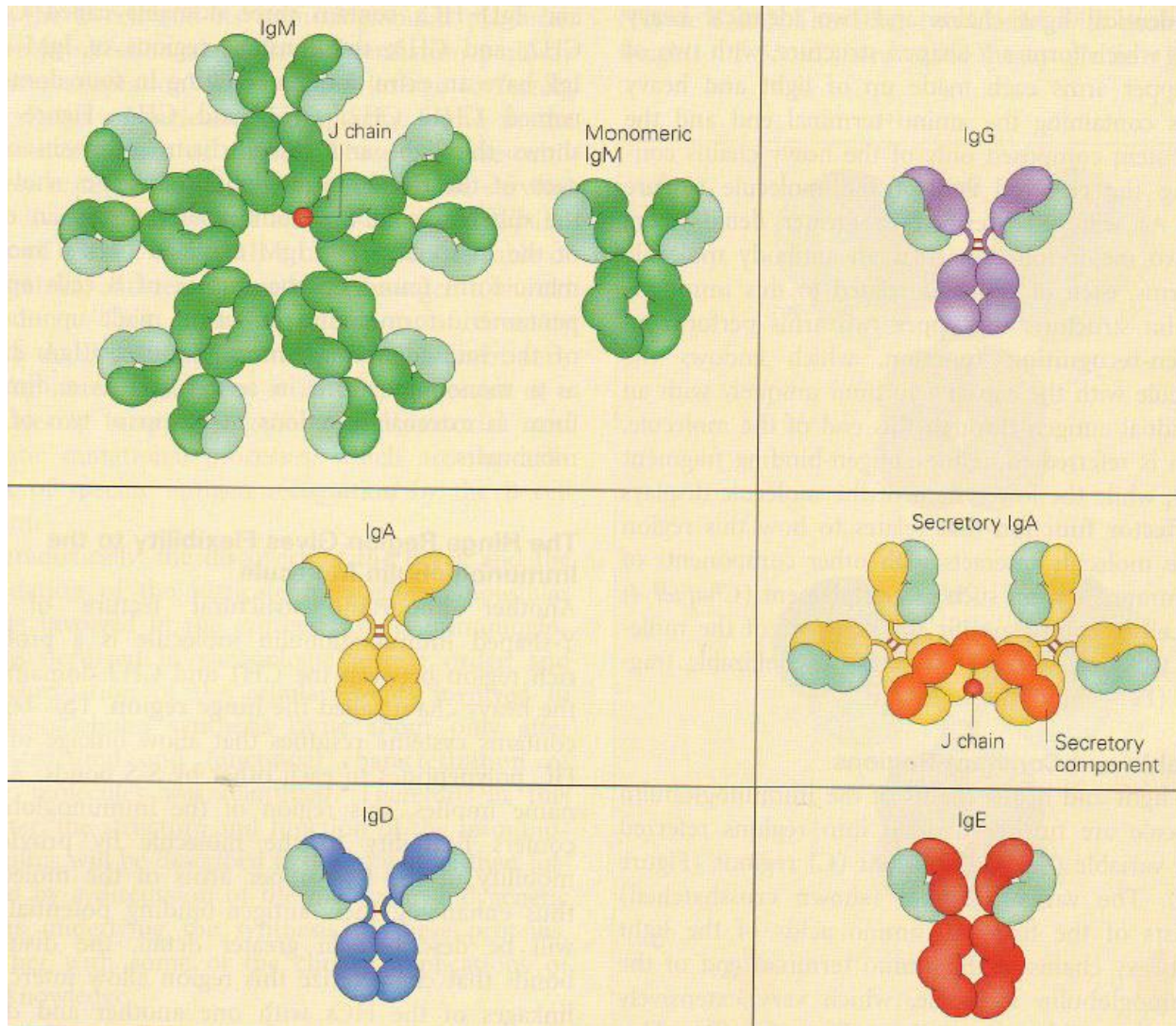
5. Funcțiile anticorpilor

Anticorpii participă la apărarea organismului prin 3 mecanisme:

- **Inactivarea (neutralizarea)** toxinelor bacteriene; neutralizarea particulelor virale și a celulelor bacteriene prin legarea și inactivarea acestora
- **Opsonizarea și fagocitoza** celulelor bacteriene
- **Activarea sistemului complement** de către anticorpii legați de celulele bacteriene



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

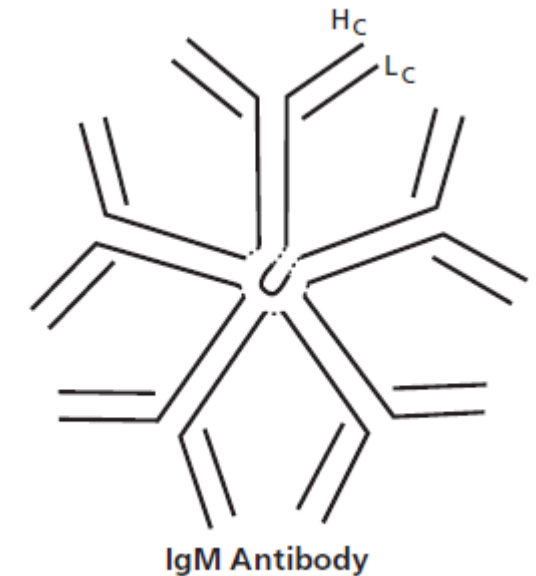
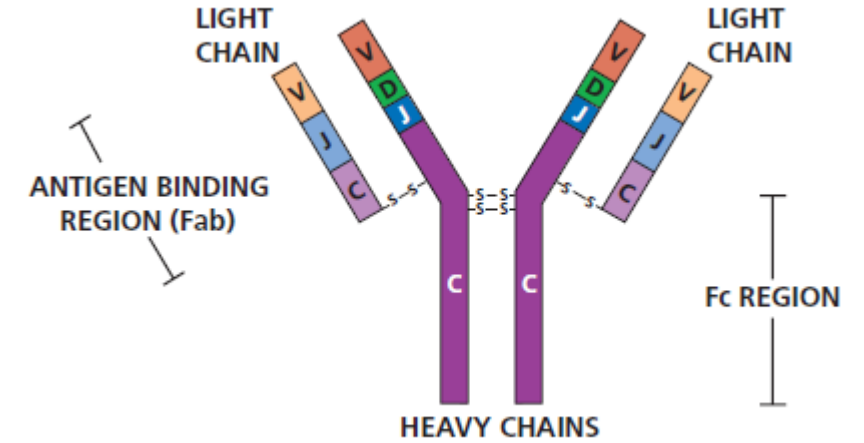
6.1. Anticorpul IgM

Clasa	Conc. serică medie (mg/dl)	Greutate moleculară (kDa)	Timp t ½ (zile)	Funcție biologică	Localizare receptori Fc	Nr. de subclase / denumire	Denumire moleculară
IgM	120	890.000	5	Componentă principală a răspunsului imun primar; receptor al limfocitului B; fixarea complementului; activarea complementului (calea clasică);	Neidentificați	(1) IgM	μ2κ2 μ2λ2

6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

6.1. Anticorpul IgM

- Lanțul greu (Hc) este identificat prin litera μ
 - → denumirea moleculară este: $\mu_2\kappa_2$, $\mu_2\lambda_2$
-
- Activarea limfocitelor B naive induce producția de IgM → primii anticorpi în caz de infecție
 - Sunt capabili de activarea cascadei complementului: fixează componenta C1 și activează cascada complementului prin calea clasică (dependentă de anticorpi)



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

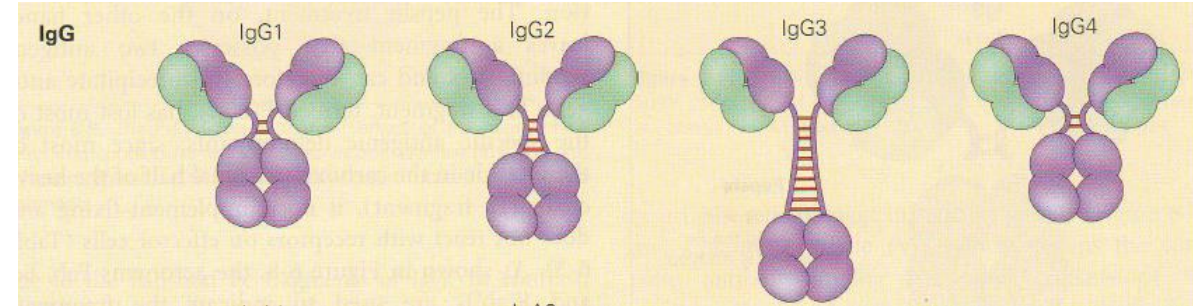
6.2. Anticorpul IgG

Clasa	Conc. serică medie (mg/dl)	Greutate moleculară (kDa)	Timp t ½ (zile)	Funcție biologică	Localizare receptori Fc	Nr. de subclase / denumire	Denumire moleculară
IgG	1.240	150.000	23	Componentă majoră a răspunsului imun secundar; activarea complementului (calea clasică); neutralizare și opsonizare; transfer placentar	PMN, limfocite, macrofage, monocite, DC, NK, mastocite și trofoblast	(4) IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	γ2κ2 γ2λ2

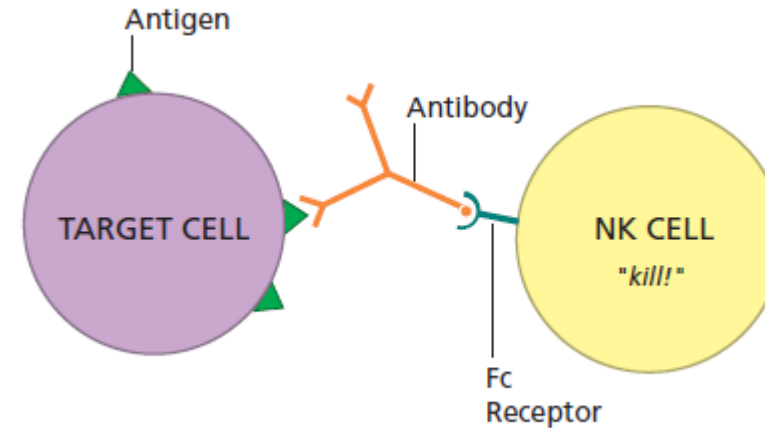
6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

6.2. Anticorprii IgG

- lanțul greu (Hc) este identificat prin litera γ



- 4 subclase, cu Fc diferite
- IgG3 leagă complementul (NK prezintă receptori pentru porțiunea Fc a IgG3 = citotoxicitate dependentă de anticorp, ADCC)
- IgG1 se leagă de agenții patogeni în vederea opsonizării și ingestia de către fagocite (macrofagele și neutrofilele prezintă receptori pentru porțiunea Fc a IgG1)



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

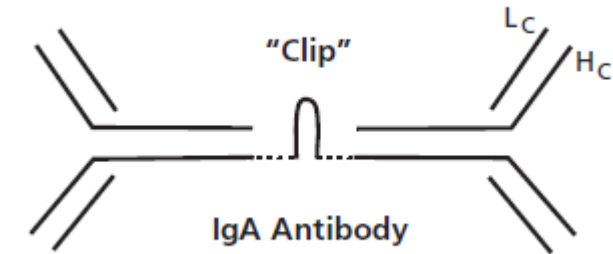
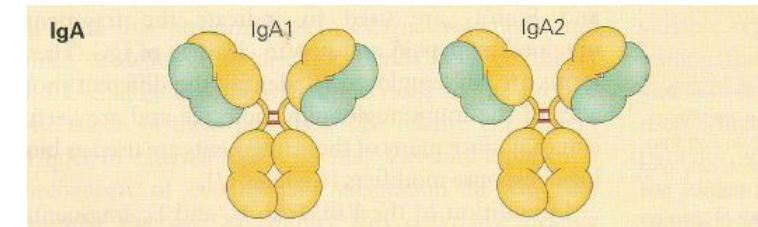
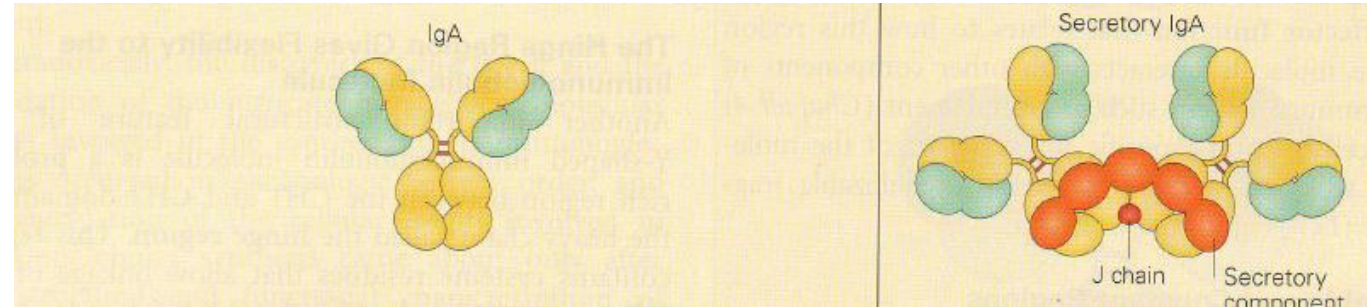
6.3. Anticorpul IgA

Clasa	Conc. serică medie (mg/dl)	Greutate moleculară (kDa)	Timp t ½ (zile)	Funcție biologică	Localizare receptori Fc	Nr. de subclase / denumire	Denumire moleculară
IgA	280	170.000	6	Prezent în ser și secreții externe ca IgA secretor; funcție în neutralizare	PMN monocite	(2) IgA1 IgA2	$\alpha 2\kappa 2$ $\alpha 2\lambda 2$

6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

6.3. Anticorpul IgA

- lanțul greu (Hc) este identificat prin litera α
- Cea mai abundentă imunoglobulină în organism
- Este secretată în laptele matern
- Concentrație plasmatică = 280 mg/dl
- Durată de viață = 6 zile
- Protejează mucoasele (80% din IgA)
- Structura conferă capacitatea de migrare prin pereții organelor (intestin)
- Opsonizează agenții patogeni și formează aglomerări (clumps) care vor fi eliminate prin materiile fecale
- Componenta C1 a complementului nu leagă fragmentul Fc al IgA



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

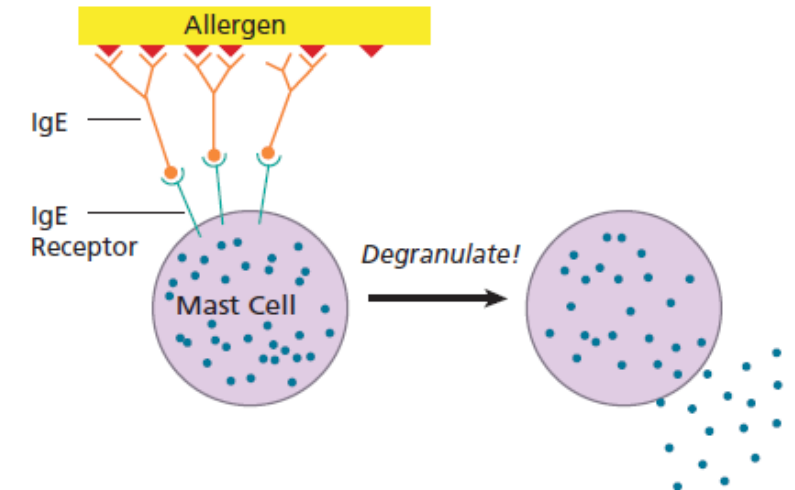
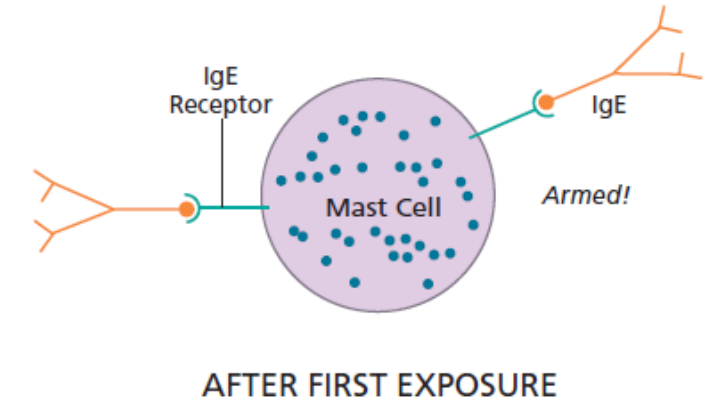
6.4. Anticorpul IgE

Clasa	Conc. serică medie (mg/dl)	Greutate moleculară (kDa)	Timp t ½ (zile)	Funcție biologică	Localizare receptori Fc	Nr. de subclase / denumire	Denumire moleculară
IgE	0.03	196.000	1.5	Anticorp reagic (alergic)	Mastocite, bazofile, LB, trombocite, DC, eozinofile	(1) IgE	ε2κ2 ε2λ2

6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

6.4. Anticorpul IgE

- lanțul greu (Hc) este identificat prin litera **ε**
- Concentrație plasmatică = 0,03 mg/dl
- Durata de viață = 1,5 zile
- 1913, Charles Richet – premiul Nobel pentru anafilaxie (șocul anafilactic este determinat de degranularea mastocitelor)
- Mastocitele – durată de viață foarte mare (ani), prezintă receptori pentru porțiunea Fc a IgE



6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

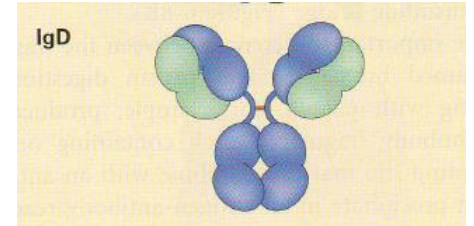
6.5. Anticorpul IgD

Clasa	Conc. serică medie (mg/dl)	Greutate moleculară (kDa)	Timp t ½ (zile)	Funcție biologică	Localizare receptori Fc	Nr. de subclase / denumire	Denumire moleculară
IgD	3	150.000	2.8	Receptor de suprafață al LB	Neidentificați	(1) IgD	δ2κ2 δ2λ2

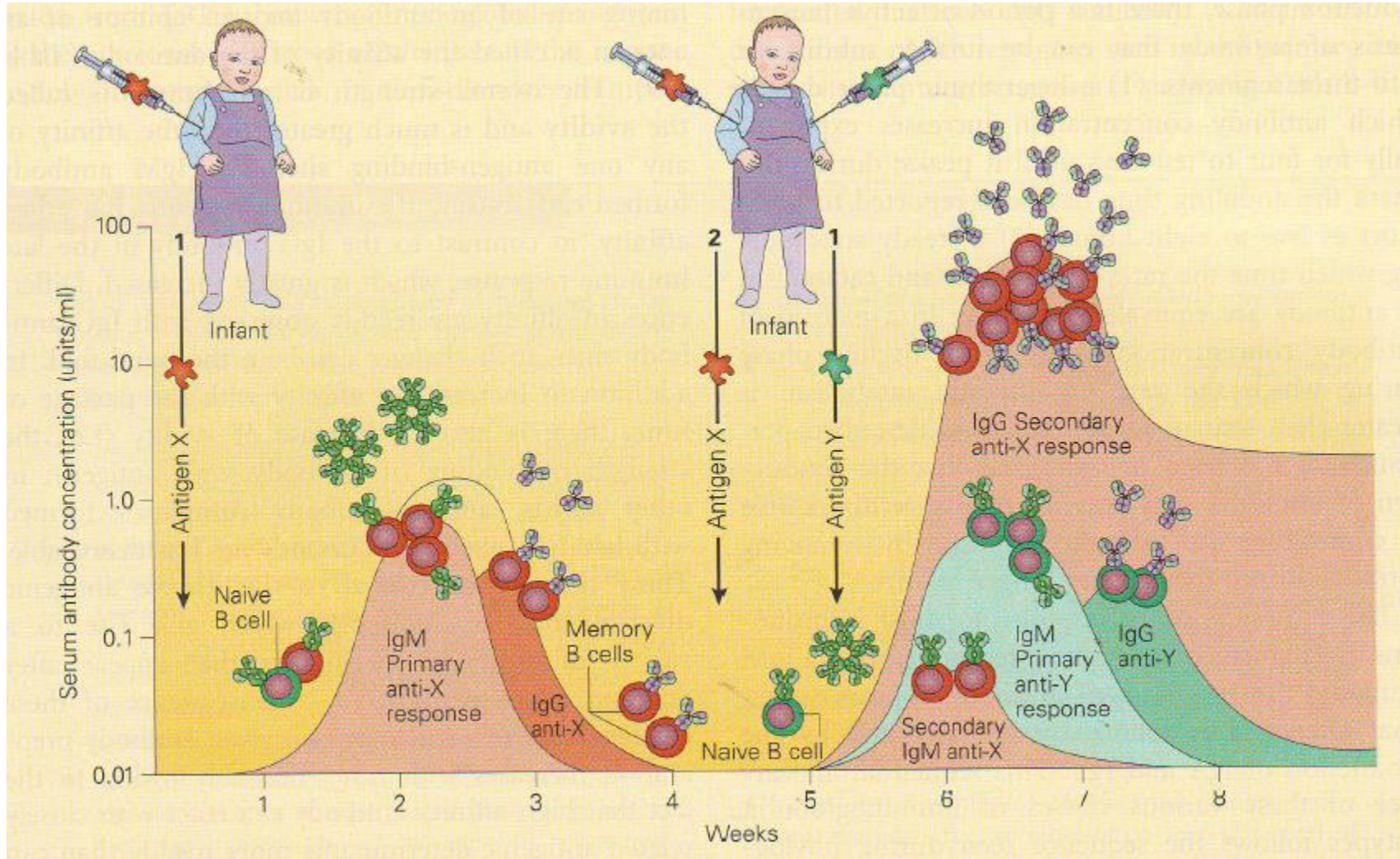
6. Clasele de anticorpi și funcțiile acestora

6.5. Anticorpul IgD

- lanțul greu (Hc) este identificat prin litera δ
- Funcție umorală neclară
- Concentrație plasmatică = 3 mg/ml
- Durată de viață = 2,8 zile
- Descoperiți în 1960 de Rowe și Fahey
- Participă la inițierea răspunsului imun dobândit
- Menționați în unele cazuri de hipersensibilitate la penicilină
- Hiperglobulinemia D asemănătoare febrei mediteraneene (febră recurentă, dureri abdominale, artralgie/artrite, cefalee, leziuni cutanate, IgD crescut) – mutație recesiv autozomală cr. 12



7. Răspunsul imun primar și secundar



7. Răspunsul imun primar și secundar

Diferențe între răspunsul imun primar și cel secundar

Caracteristici	Răspuns primar	Răspuns secundar
Perioada de latență	Lungă	Scurtă
Titrul maxim de anticorpi	Scăzut	Crescut
Persistența titrului de anticorpi	Durată scăzută	Perioadă îndelungată
Afinitatea anticorpilor	Scăzută	Crescută
Cross-reactivitatea anticorpilor	Scăzută	Crescută
Prezența celulelor de memorie	Puține celule (?)	Nr. ↑ de celule
Clasa predominantă de Ig	IgM	IgG
Doza de imunogen necesară pentru producerea anticorpilor	Crescută	Scăzută

8. Imunoterapia pasivă

8.1. Introducere

Imunoterapia pasivă se referă la utilizarea anticorpilor serici sau a imunoglobulinelor gama în tratamentul sau prevenția bolilor infecțioase prin transferul acestora de la o persoană în care au fost produși;

Termenul de imunoterapie se folosește și pentru **imunosupresie** (în boli mediate imun), terapia de desensibilizare (boli alergice), precum și cancer; recent, termenul a fost extins pentru transferul celulelor sau țesuturilor imunocompetente (măduvă osoasă hematogenă, celule stem, timus, produse ale acestora) în imunodeficiențe, cancer sau afecțiuni limfoproliferative;

8.2. Istoric

- În secolul 19 s-a descoperit că serul imun al animalelor sau uman poate fi utilizat pentru tratamentul bolilor infecțioase;
- Emil Adolf von Behring și Shibasaburo Kitasato – au introdus în practica medicală utilizarea imunoglobulinelor policlonale izolate din seruri hiperimune de la animale sau de origine umană
- 1930 – descoperirea Penicilinei și a altor antibiotice → abandonarea imunoterapiei
- Mare parte dintre cei care au beneficiat de imunoterapie cu seruri heterologe au dezvoltat boala serului (febră, frisoane, reacții alergice imediate)

8. Imunoterapia pasivă



Shibasaburo Kitasato

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1901 was awarded to **Emil von Behring** *"for his work on serum therapy, especially its application against diphtheria, by which he has opened a new road in the domain of medical science and thereby placed in the hands of the physician a victorious weapon against illness and deaths"*.



Emil Adolf von Behring



Inventas vitam juvat excoluisse per artes

8. Imunoterapia pasivă

8.3. Principiile imunizării pasive

- Acțiune imediată
- Poate fi administrată înaintea expunerii
- Tratament de elecție pentru pacienții cu imunodeficiențe (primare/secundare)
- Timpul de înjumătățire: IgG $t_{1/2}$ = 23 zile, IgA $t_{1/2}$ = 6 zile, IgM $t_{1/2}$ = 5 zile
- Eliminarea imunoglobulinelor administrate intravenos are loc în 3 faze: 1. perioada de redistribuție/egalizare a concentrațiilor între spațiul vascular și extravascular → scăderea concentrației sanguine la scurt timp după administrare; 2. scăderea lentă a concentrației Ig datorită metabolizării (catabolismului); 3. perioada de scădere accelerată (pentru ser heterolog - cal) datorită degradării și formării de anticorpi anti-Ig = **eliminare imună**
- **Proprietăți imunosupresoare ale imunoglobulinelor** – administrarea pasivă a imunoglobulinelor inhibă producerea activă a anticorpilor prin inhibiție de tip **feedback negativ**

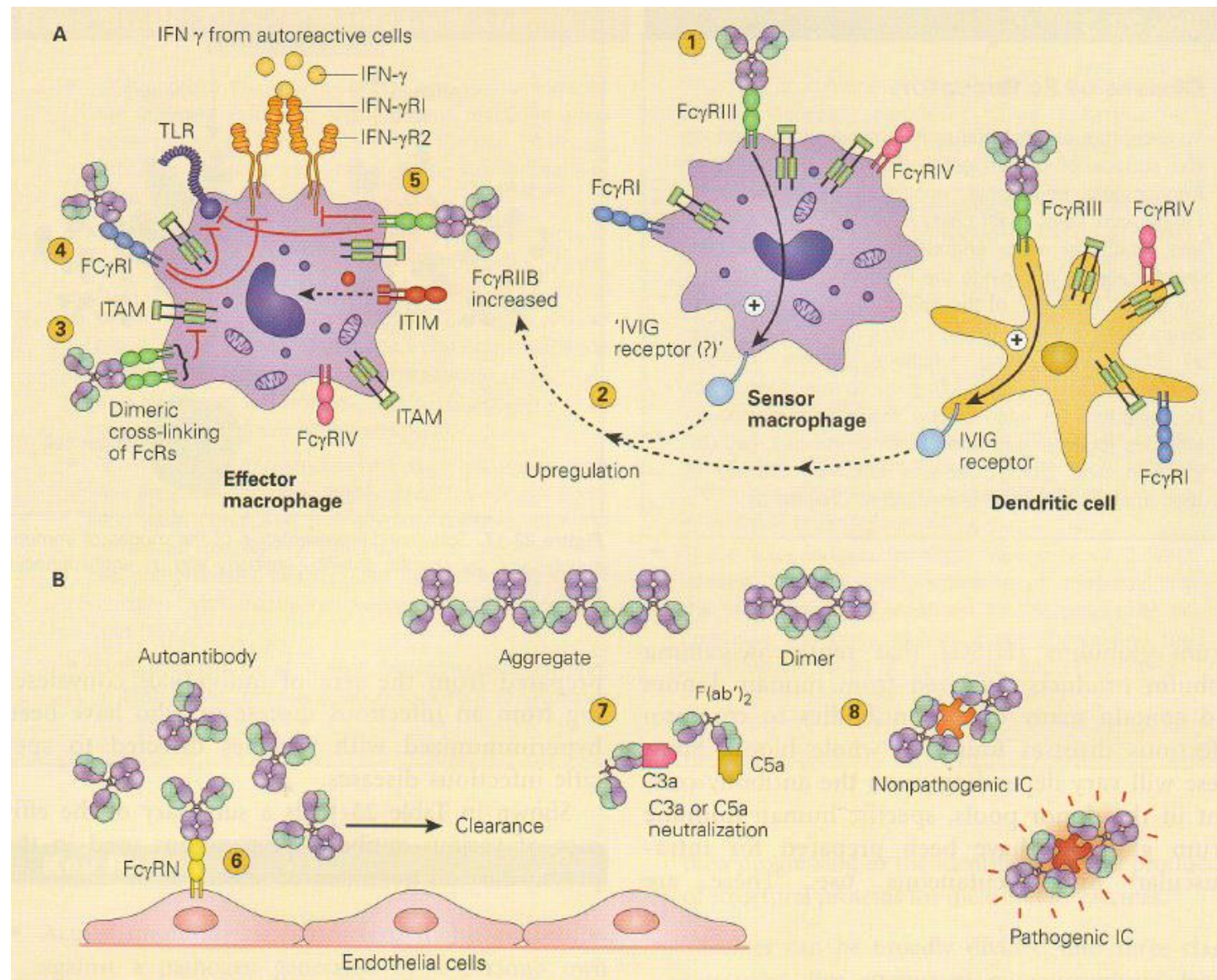
8. Imunoterapia pasivă

A. IVIG pot să suprimă activ răspunsul inflamator prin următoarele mecanisme:

- Legarea IVIG de receptori FcγR – FcγRI, FcγRIII, FcγRIV – de pe macrofage sau DC → expresia și activarea unui receptor pentru IVIG necunoscut încă
- Suprimă activarea macrofagelor efectoare prin FcγRIIB upregulation
- Cross-linkarea dimerilor FcR de IVIG → blocarea căilor de semnalizare intracelulară (ITAM)
- Inhibarea efectelor activatoare ale semnalizării FcγRI și FcγRIII blochează TLR și IFNγ

B. IVIG competiționează pentru FcγR cu IgG

- Clearance crescut al anticorpilor
- Legarea Fab cu C3a și C5a și neutralizarea activității pro-inflamatorie
- Blocarea activării imune cu complexe nepatogenice



Mecanismele imunosupresoare ale IVIG

8. Imunoterapia pasivă

Produs	Abreviere	Utilizare
Imunoglobuline serice umane standard (HISG, gama globuline)		
Imunoglobuline i.v.	IVIG, IGIV	Tratamentul deficiențelor de anticorpi, boala Kawasaki
Imunoglobuline i.m.	IG, ISG	Tratamentul deficiențelor de anticorpi, prevenția rujeolei, hepatitei A
Imunoglobuline serice umane specifice pentru administrare i.m. sau s.c.		
Imunoglobuline pentru Hepatită B	HBIG	Prevenția hepatitei B
Imunoglobuline pentru varicela-zoster	VZIG	Prevenția sau modificarea varicelei
Imunoglobuline anti-rabice	RIG	Prevenția rabiei
Imunoglobuline anti-tetanice	TIG	Prevenția/tratament tetanus
Imunoglobuline anti-boltulinice	BIG	Tratamentul botulismului la nn.
Imunoglobuline umane specifice cu administrare i.v.		
Imunoglobuline anti-CMV	CMV-IVIG, CytoGam	Prevenția/tratamentul infecției cu CMV
Imunoglobuline anti-RSV	RSV-IVIG, RespiGam	Prevenția infecției cu RSV
Anticorpi monoclonali		
Palivizumab (anti-RSV-F)	Synagis	Prevenția infecției cu RSV

9. Anticorpi monoclonali

9.1. Istoric

Nature Vol. 256 August 7 1975

Continuous cultures of fused cells
secreting antibody of predefined specificity

Hibridoame

Milstein & Kohler
(Nobel)



Rituximab
(Ac. himeric)

Adalimumab
(Ac. uman)

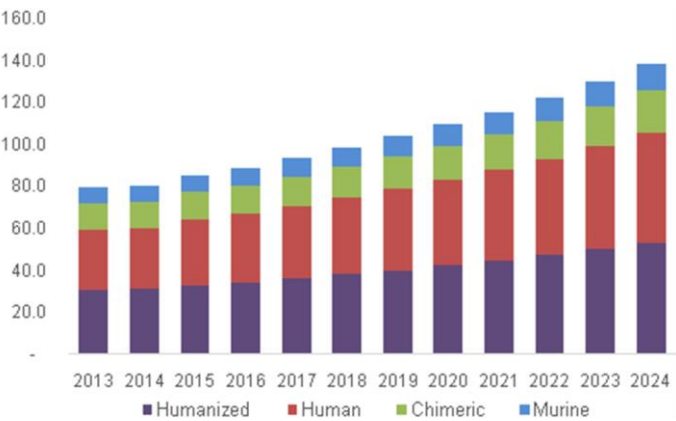
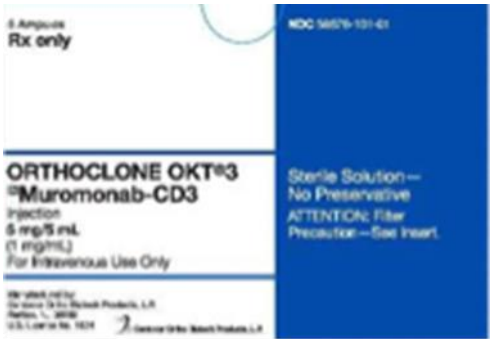
1891 1975 1984 1986 1997 1998 2002 2017

E. von Behring
P. Ehrlich

OKT3
primul
Ac.
aprobat
de FDA

Trastuzumab
(Ac. Umanizat)

±70 Ac.
aprobați pentru
uz clinic,
obținuți în
culturi de celule

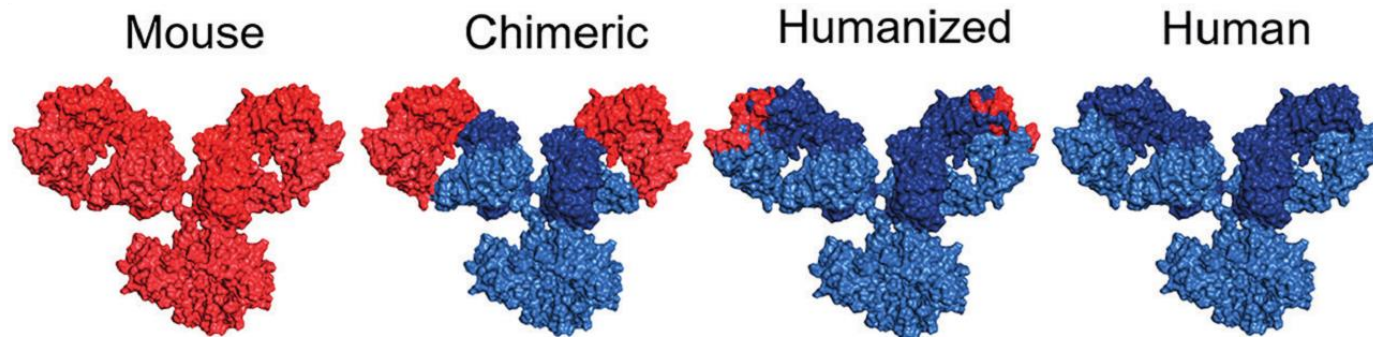
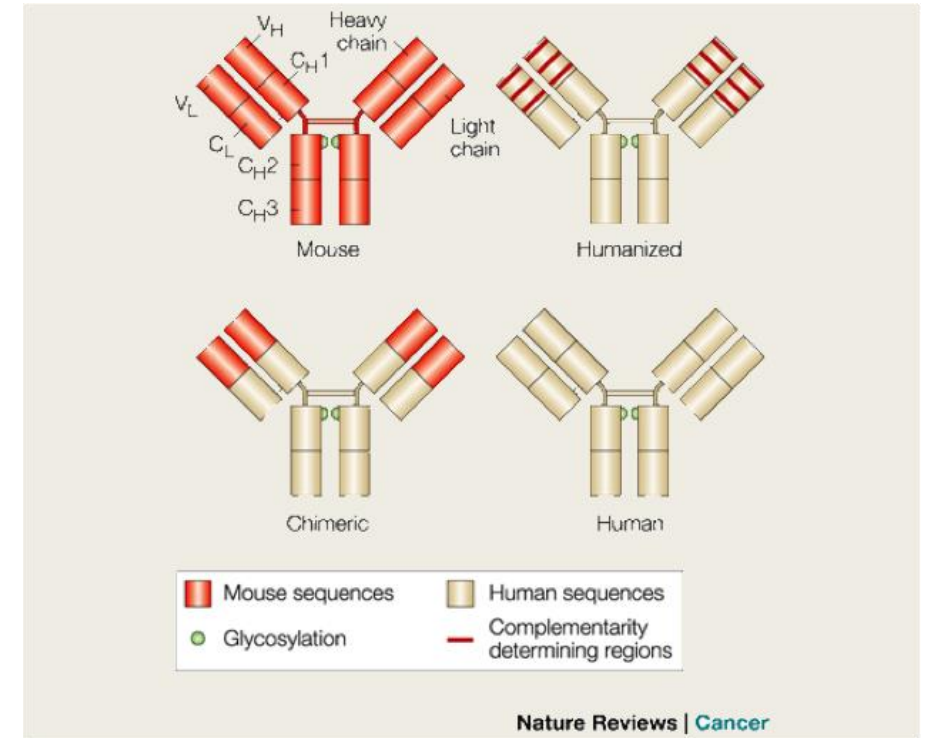


Monoclonal Antibodies Market, By source Type, 2013 - 2024 (USD Billion)

9. Anticorpi monoclonali

9.2. Tipuri de anticorpi monoclonali

- **mAb murin** → răspuns imun anti-mouse (-o-mab)
- **mAb himeric** ($V_{L/H}$ specifice pentru antigen provin de la șoarece) (-xi-mab) - 1984
- **mAb umanizat** (CDR de origine murină) (-zu-mab) - 1989
- **mAb uman** din 'phage display libraries' (fragmente) - 1991
- **mAb uman** produs în animale transgenice (-u-mab) - 1992

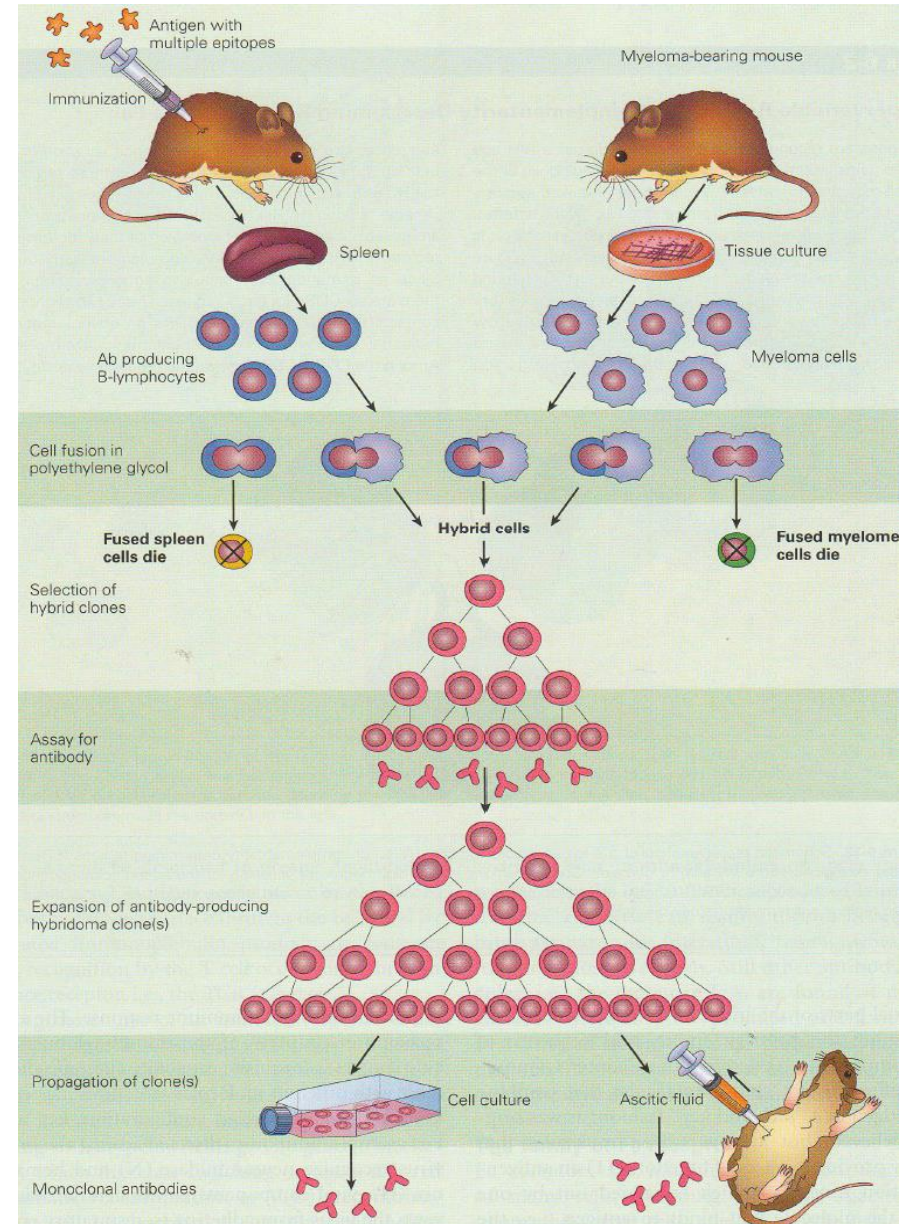


- Anticorpi identici, cu specificitate unică
- Aplicații în cercetare
- Utilizați pentru diagnostic
- Agenți terapeutici

9. Anticorpi monoclonali

9.3. Tehnici de obținere - hibridoame

- Celulele splenice ale unui șoarece care a fost imunizat cu antigenul dorit sunt sursa de celule B secretoare de anticorpi
- Fuzionează cu celule mielomice ale unui șoarece cu mielom
- După fuziune rezultă un număr mare de clone hibride, fiind selectate doar clonele de interes → expandate în culturi celulare pentru a produce cantități ↑ de anticorpi monoclonali
- Metoda veche – injectarea șoarecilor cu celule producătoare de anticorpi și recoltarea fluidului de ascită – nu mai este folosită, prezentând doar interes istoric.



9. Anticorpi monoclonali

9.4. Modul de acțiune al mAb

a. Distrugere tumorală directă

- Agoniști pentru receptori
- Antagoniști pentru receptori
- Anticorpi conjugați cu toxine
- Anticorpi cuplați cu enzime

b. Distrugere tumorală mediată imun

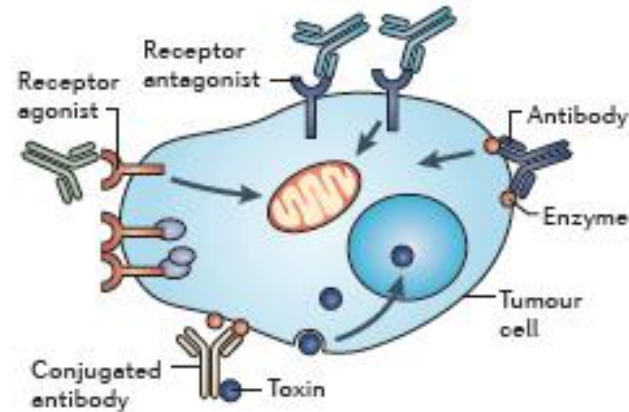
- ADCC (celule NK)
- Receptori pentru complement (CR)
- Receptori pentru Fc (Mø)

- LB – prezentare antigen
- CAR-T cells

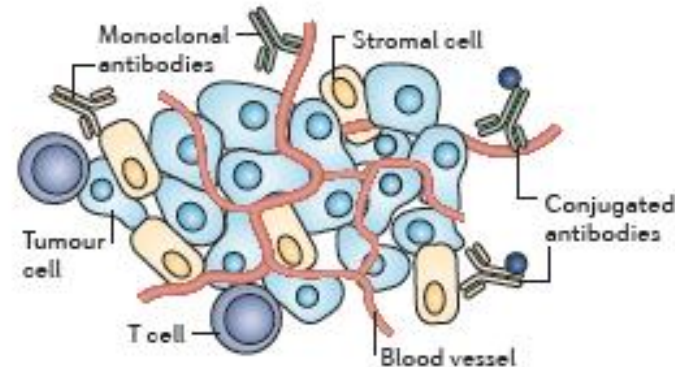
c. Distrugerea stromei și a vascularizației

- mAb împotriva vascularizației – VEGF
- mAb împotriva stromei – FAP (fibroblast-activation protein)

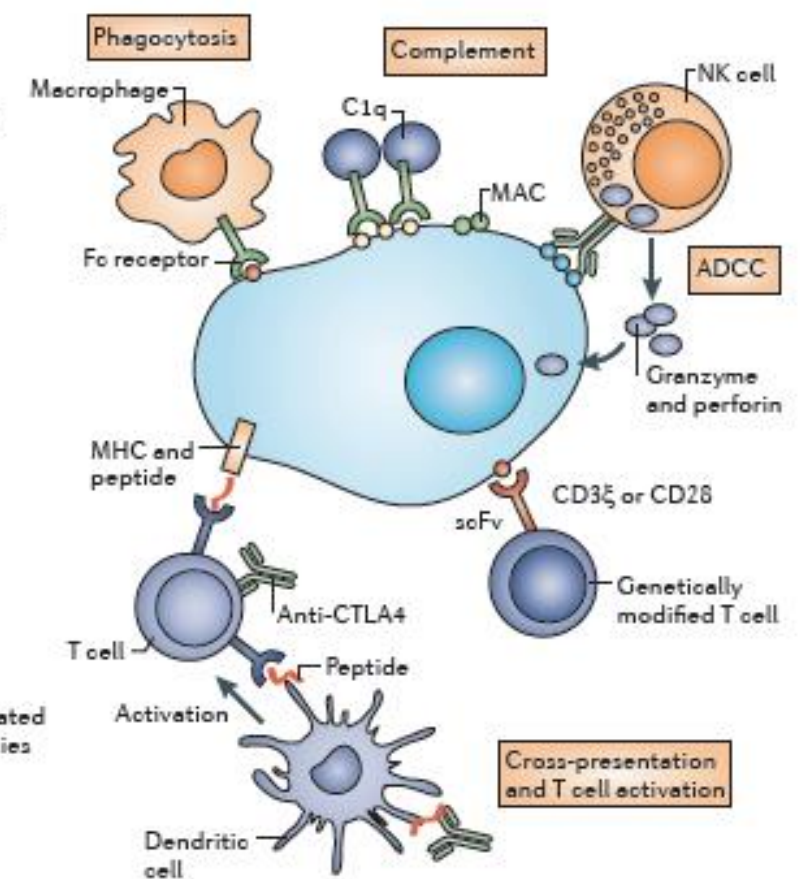
a Direct tumour cell killing



c Vascular and stromal cell ablation



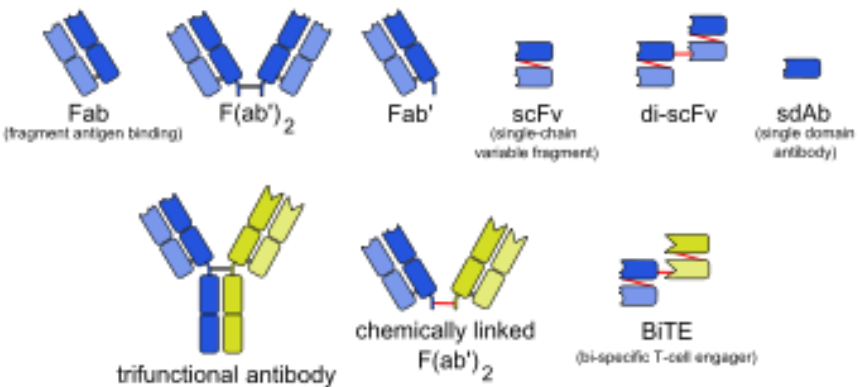
b Immune-mediated tumour cell killing



9. Anticorpi monoclonali

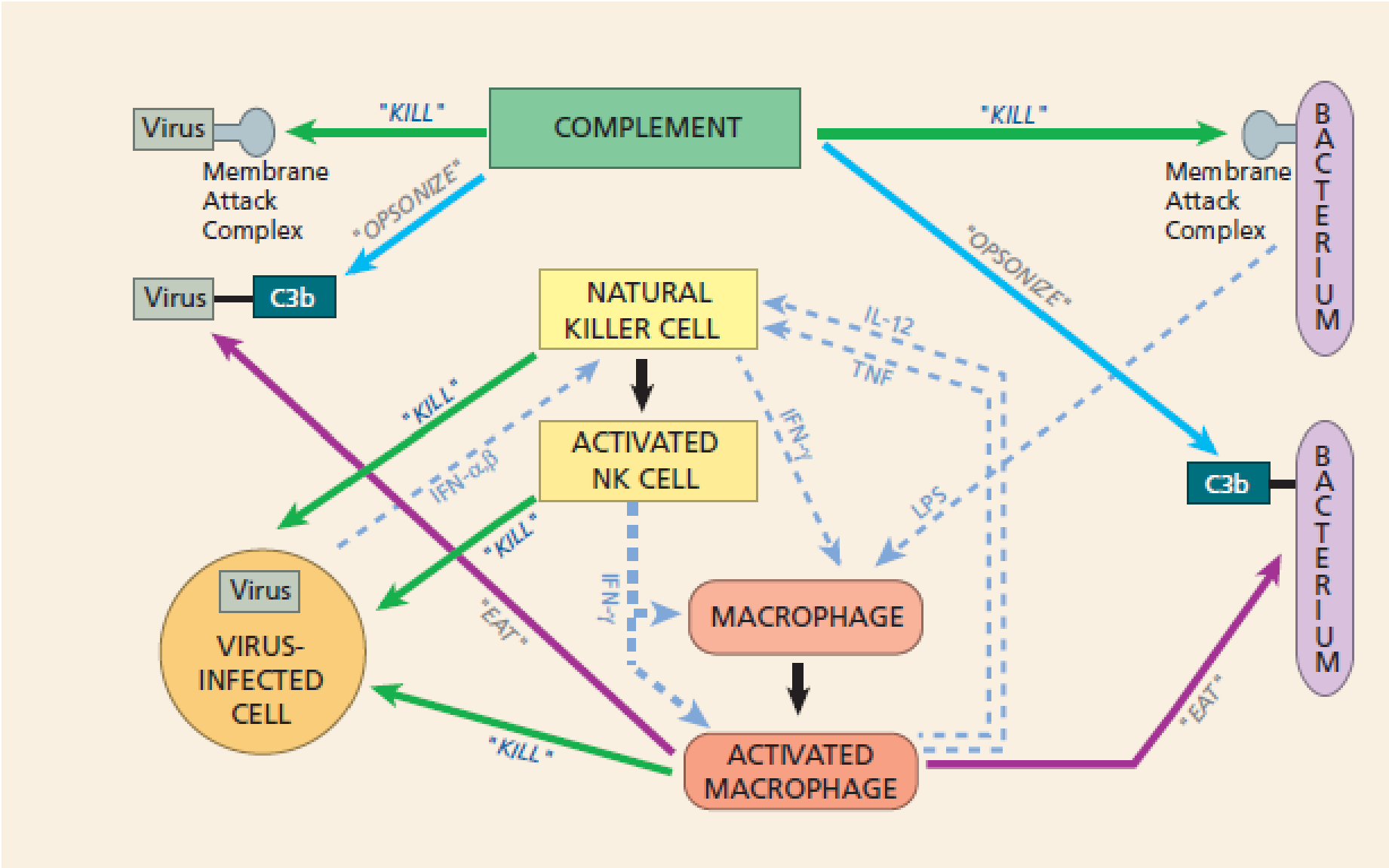
9.5. Generația următoare

- Anticorpi bispecfici
- Anticorpi conjugați
- Anticorpi cu funcție Fc modificată
- Fragmente de Ab - Intracorpi

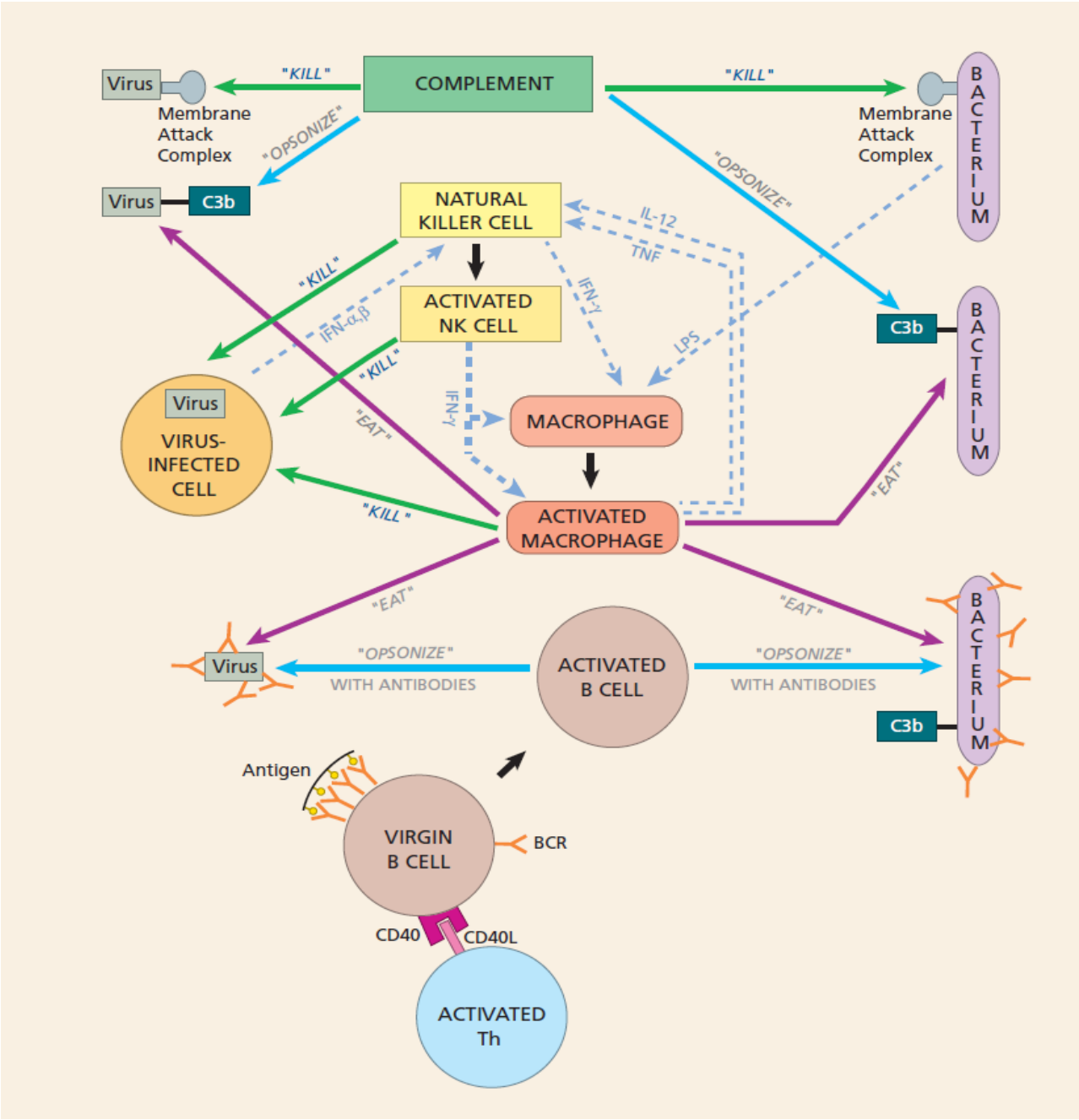


Nume	Format	Ținta	Tip cancer	Stadiu
MDX-210	(Fab') ₂	HER2 x CD64	Mamar / ovarian	Faza I
MDX-H210	(Fab') ₂	HER2 x CD64	Mamar / ovarian	Faza I
MDX-447	(Fab') ₂	EGFR x CD64	Pulmonar, colorectal	Faza I
HRS-3/A9	(Fab') ₂	CD30 x CD16	Limfom Hodgkin	Faza I
Her2Bi	IgG cross-linkate	HER2 x CD3	Mamar / prostată	Faza I/2
CD20Bi	IgG cross-linkate	CD20 x CD3	Mielom multiplu	Faza I
Cantumaxomab	Triomab	EpCAM x CD3	Ascită malignă	Aprobat EMEA
Ertumaxomab	Triomab	HER2 x CD3	Mamar metastatic	Faza 2
Bi20	Triomab	CD20 x CD3	Tumori maligne cu limfocite B	Faza I
rM2B	Dimeric TaFv	NG2 x CD28	Melanom	Faza I/2
Blinatumomab	BITE	CD19 x CD3	NHL și B-ALL	Faza I și 2
MT110	BITE	EpCAM x CD3	Pulmonar, colon	Faza I
TF2	triFab	CEA x HGS	Colorectal	Faza I

Sumar grafic



Sumar grafic



Studiu de caz

- Bărbat 37 ani se prezintă cu dureri de gât, febră, oboseală, care au debutat în urmă cu 3 săptămâni și s-au accentuat progresiv;

Examen clinic obiectiv:

- Amigdale inflamate, dimensiuni crescute, exudat

Tratament:

- Penicilina → îmbunătățirea simptomelor clinice, dar persistă febra și oboseala

Investigații paraclinice:

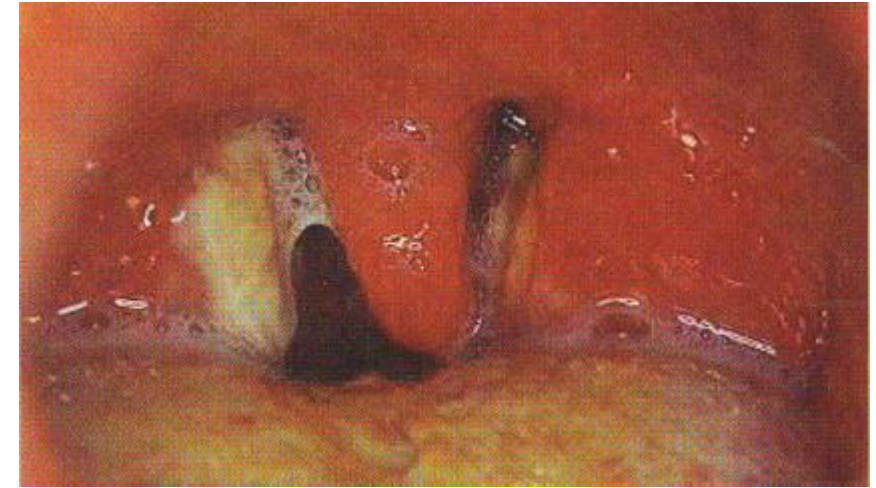
- Mononucleoză spot test +
- HGB = 15 g/dl
- WBC = 23.000/mm³: Ne = 23%, Ly = 57%, > 20% limfocite anormale

Tratament:

- Repaus la pat, tratament suportiv

Evoluție:

- Recuperare completă în 6 săptămâni



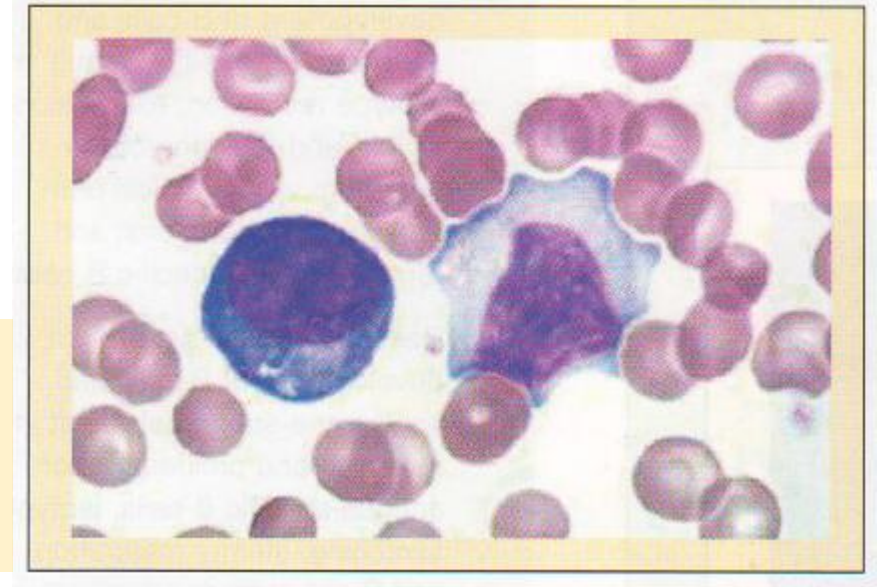
Faringoamigdalită cu amigdale inflamate și exudat la nivelul amigdalei drepte

Relevanța cazului clinic

Mono spot test = mononucleoză spot test, test heterofil, test cu anticorpi heterofili

- Test de laborator care măsoară anticorpii heterofili (anticorpi umani care reacționează cu proteinele altei specii)
- Se efectuează la pacienții cu simptomatologie caracteristică: faringoamigdalită exudativă, febră, cefalee, ganglioni limfatici măriți, oboseală
- Test nespecific
- Poate fi pozitiv la pacienții cu alte infecții
- Rezultate fals-negative se întâlnesc în 10-15% dintre cazuri, mai ales la copii cu vârsta mai mică de 10 ani

Frotiu sânge periferic la un pacient cu mononucleoză infecțioasă, care arată limfocite atipice, caracterizate prin vezicule citoplasmatiche și indentații membranare



Relevanța cazului clinic

Mononucleoza infecțioasă (boala sărutului, boala Pfeiffer, febra glandulară) = boală infecțioasă cauzată de virusul Epstein-Barr (EBV), membru al familiei herpes

- Se întâlnește mai ales la adolescenți și adulți tineri
- Se caracterizează prin febră, dureri faringiene și musculare, oboseală și uneori prin creșterea în dimensiune a splinei (splenomegalie → ruptură splenică)
- Relativ netransmisibilă (necesită contact intim și transmiterea virusului prin salivă); se poate transmite și prin sânge
- **Complicații:** anemie hemolitică, trombocitopenie, anemie aplastică, miocardită, hepatită, ulcerații genitale, ruptură splenică, erupții cutanate și complicații neurologice (sindrom Guillain-Barre, encefalită, meningită)
- EBV este implicat în patogeneza bolilor autoimune (lupus eritematos); a fost asociat cu numeroase procese neoplazice – tumori hematologice, epiteliale, mezenchimale (carcinom nazofaringian, limfoame cu limfocite B – Burkitt, Hodgkin, boli limfoproliferative)
- **Diagnostic diferențial:** infecție streptococică

Relevanța cazului clinic

- Virsul Epstein-Barr infectează limfocitele B → proliferare → producere de anticorpi policlonali (anticorpi heterofili, aglutinine la rece, crioglobuline, anticorpi antinucleari, factor reumatoid)
- ↑ semnificativă a nr. limfocite și monocite
- Limfocitele T (mai ales CD8+) împotriva limfocitelor B infectate cu EBV sunt atipice = corpi Downey
- Majoritatea simptomelor se datorează proliferării și activării limfocitelor T ca răspuns la infecție

Teste specifice de laborator:

- Anticorpi anti-antigene ale capsidei virale (VCA – viral capsid antigen)
- Antigene timpurii (EA – early antigen)
- Antigenul nuclear (EBNA – EBV nuclear antigen)



Combinăția optimă de teste serologice:
IgM și IgG pentru VCA; IgM pentru EA și anticorpi pentru EBNA

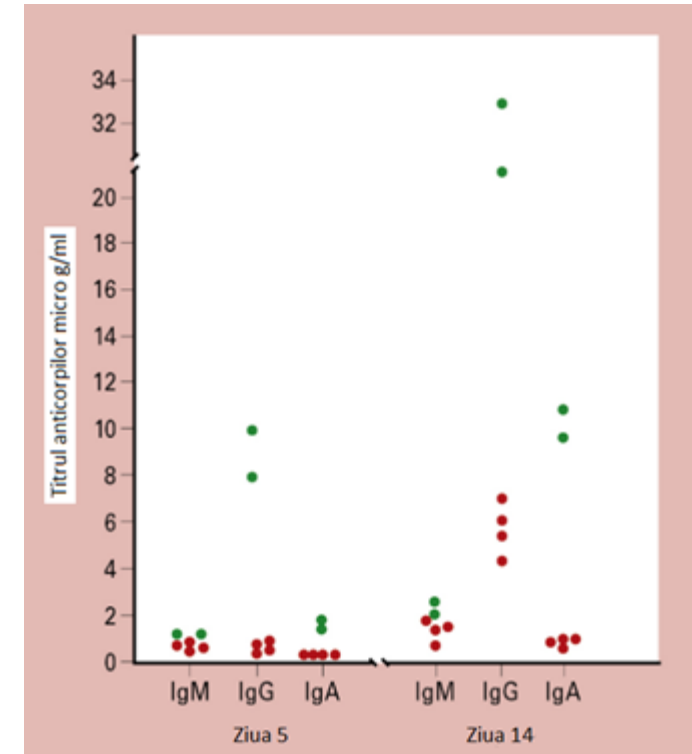
Critical thinking

Se dorește dezvoltarea unui vaccin murin pentru virusul hepatitei, un agent patogen care ar putea determina probleme serioase în coloniile de șoareci. Vaccinul constă în proteinele capsidei virale, care sunt injectate subcutanat dispersate în adjuvantul alum. După 5 și 14 zile, s-au determinat concentrațiile serice ale Ig (IgM, IgA și IgG) împotriva proteinelor capsidei virale la grupul de 6 șoareci. S-a observat că 2 dintre șoareci prezintă titruri crescute ale IgG și IgA, atât în ziua 5, cât și în ziua 14.

1. De ce crește mai repede titrul de anticorpi IgG decât cel al IgM între zilele 5 și 14?
2. De ce credeți că sunt titrurile de anticorpi IgG atât de crescute în ziua 5?

După 14 zile s-a recoltat splina șoarecilor pentru a obține limfocite B producătoare de anticorpi monoclonali împotriva capsidei virale. Dintre clonele de limfocite B, 15 au produs IgG, 3 au produs IgM și nici una nu a produs IgA.

3. De ce credeți că nu s-au obținut clone producătoare de IgA, cu toate că inițial am avut un răspuns imun bun cu IgA?
4. Dacă se dorește utilizarea unui anticorp cu afinitate mare, care dintre clonele produse ar trebui folosite?



MCQs

1. Anticorprii (imunoglobulinele):

- a. Sunt sintetizați și secretați de limfocitele B și T
- b. Se leagă de diverși epitopi simultani
- c. Conțin 4 tipuri diferite de polipeptide ale lanțurilor ușoare
- d. Recunosc epitopi specifici împreună cu molecule self
- ☒ e. Se leagă de antigene pentru a le distruge și îndepărta din organism

2. Regiunile constante ale celor 5 tipuri majore de lanțuri grele ale moleculelor imunoglobulinice dictează:

- a. Epitopul moleculei
- b. Fragmentul Fab al moleculei
- ☒ c. Izotipul imunoglobulinei
- d. Motivul de activare tirozinică
- e. Domeniul variabil al moleculei imunoglobulinice

MCQs

3. Un copil de 2 ani expus la un antigen pentru prima dată prezintă deja limfocite B cu imunoglobuline specifice acestui antigen. Acest lucru este cel mai bine explicat prin:

- a. Rearanjamente genice ale imunoglobulinelor independente de antigen
- b. Stimularea antigenică a limfocitelor T și producția de citokine
- c. Anticorpi materni împotriva antigenului
- d. Limfocite B de memorie care recunosc antigenul
- e. Hipermutații somatice ale imunoglobulinelor

4. Care dintre următoarele izotipuri de anticorpi facilitează legarea secvențială a componentelor sistemului complement:

- a. IgA și IgD
- b. IgA și IgE
- c. IgA și IgM
- d. IgE și IgG
- e. IgG și IgM

MCQs

5. Pulpa albă splenică este îmbogățită cu:

- a. Eritrocite cu hemoglobină
- b. Limfocite T CD4+CD8+ legate de MHC
- c. Celule NK care recunosc ținta
- ☒ d. Plasmocite secretante de imunoglobuline
- e. Celule precursorare ale limfocitelor B mature

6. Care dintre următoarele sunt organe limfoide primare:

- ☒ a. Măduva osoasă
- b. Ganglionii limfotici
- c. Plăcile Payer
- d. Splina
- e. Amigdalele

MCQs

7. La un pacient care a dezvoltat alergie la un anumit antigen, răspunsul imun inițial a fost de tip IgM. Cu timpul, IgE specific antigenului a devenit predominant. Această schimbare din IgM spre IgE este determinată de:

- a. Maturare de afinitate
- b. Excluziune alelică
- ☒ c. Schimbarea izotipului
- d. Diversitate joncțională
- e. Hipermutații somatice

8. Când un limfocit B de memorie este restimulat de antigenul specific, mutațiile punctiforme care au loc la nivelul ADN-ului codant al regiunilor variabile ale lanțurilor grele și ușoare duc la:

- a. Altă specificitate antigenică
- b. Schimbarea izotipului din IgM în IgG
- c. Rearanjamente cromozomiale ale ADN și scăderea specificității antigenice
- d. Inactivarea alelor VL și VH materne sau paterne
- ☒ e. Generarea unui anticorp cu afinitate mare de legare a epitopului (maturare de afinitate)

MCQs

Î: Care sunt cele 2 tipuri de imunoglobuline care activează complementul pe calea clasică?

R: IgM și IgG

Î: În sistemul complement, care este funcția proteinei plasmatice C3b?

R: Opsonizare

Î: Care este numele complexului M C5b, 6, 7, 8 și 9 în ultima etapă a sistemului complement, care lizează celulele țintă?

R: Complexul de atac membranar, MAC

Î: Care celule secretă IL-1?

R: Macrofage

Î: Care este durata de viață aproximativă a anticorpilor transferați de la un organism la altul în imunitatea pasivă?

R: 3 săptămâni

MCQs

Î: Care antigen din laptele matern conferă imunitate pasivă nou-născutului?

R: Imunoglobulina A

Î: Care sunt efectele secreției de IL-1 la nivel vascular?

R: Inflamație acută; interleukina 1 induce recrutarea leucocitelor și activează endoteliul pentru expresia moleculelor de adeziune.

Î: Care proteine de suprafață se găsesc pe suprafața limfocitelor B?

R: IgM, CD19, CD20, CD21, CD40, MHC clasa II, B7

Adevărat sau fals. Toate celulele umane au complex major de histocompatibilitate clasa I.

R: Fals. Eritrocitele mature nu a MHC clasa I.

Î: Ce eveniment declanșează activarea complementului prin calea clasică?

R: Formarea complexelor antigen-anticorp