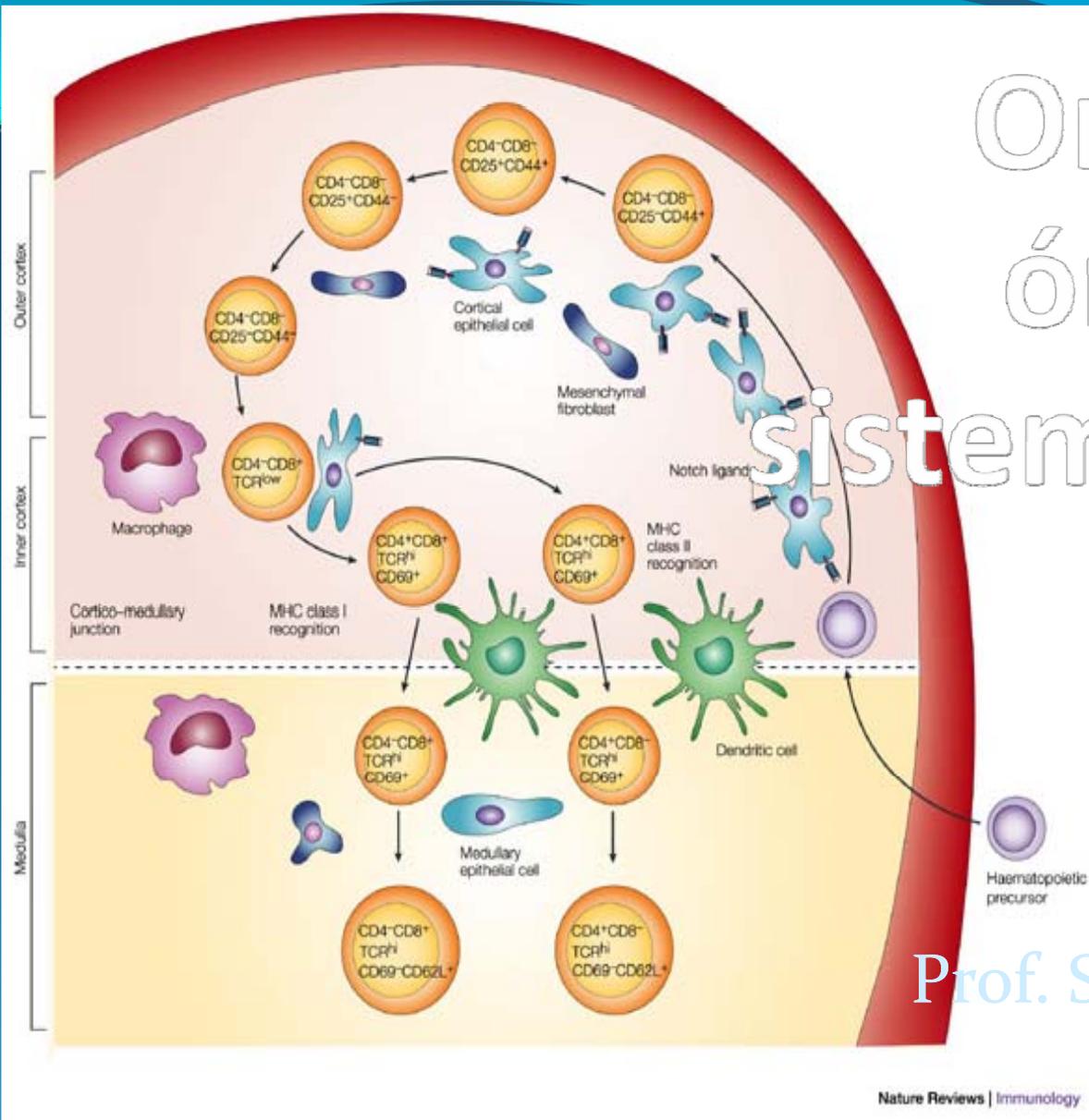


# Ontogenia y órganos del sistema inmune

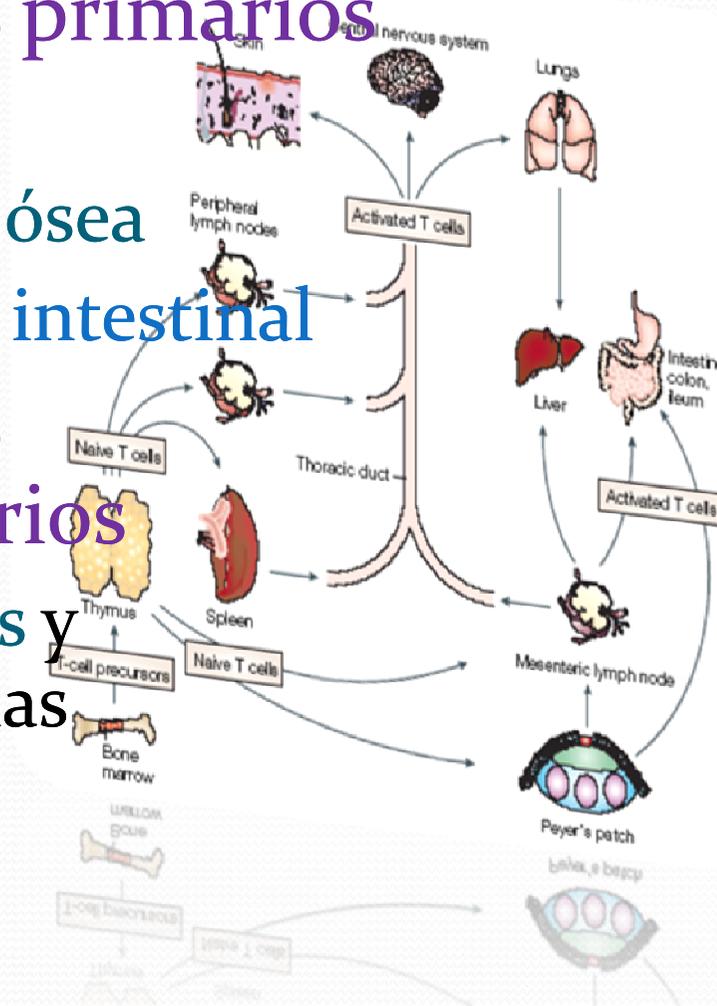


Prof. Siham Salmen Halabi  
Idic-UCLA

Curso de Pre-grado 2013

# Órganos del sistema inmune

- Microambientes
  - Órganos primarios
    - Timo
    - Médula ósea
    - Epitelio intestinal
  - Órganos secundarios
    - Ganglios y amígdalas
    - Bazo
    - MALT



## Elementos de la respuesta inmune:

### Inmunidad innata:

Células mieloides  
(Células dendríticas, Monocitos/macrófagos, PMN, mastocitos)

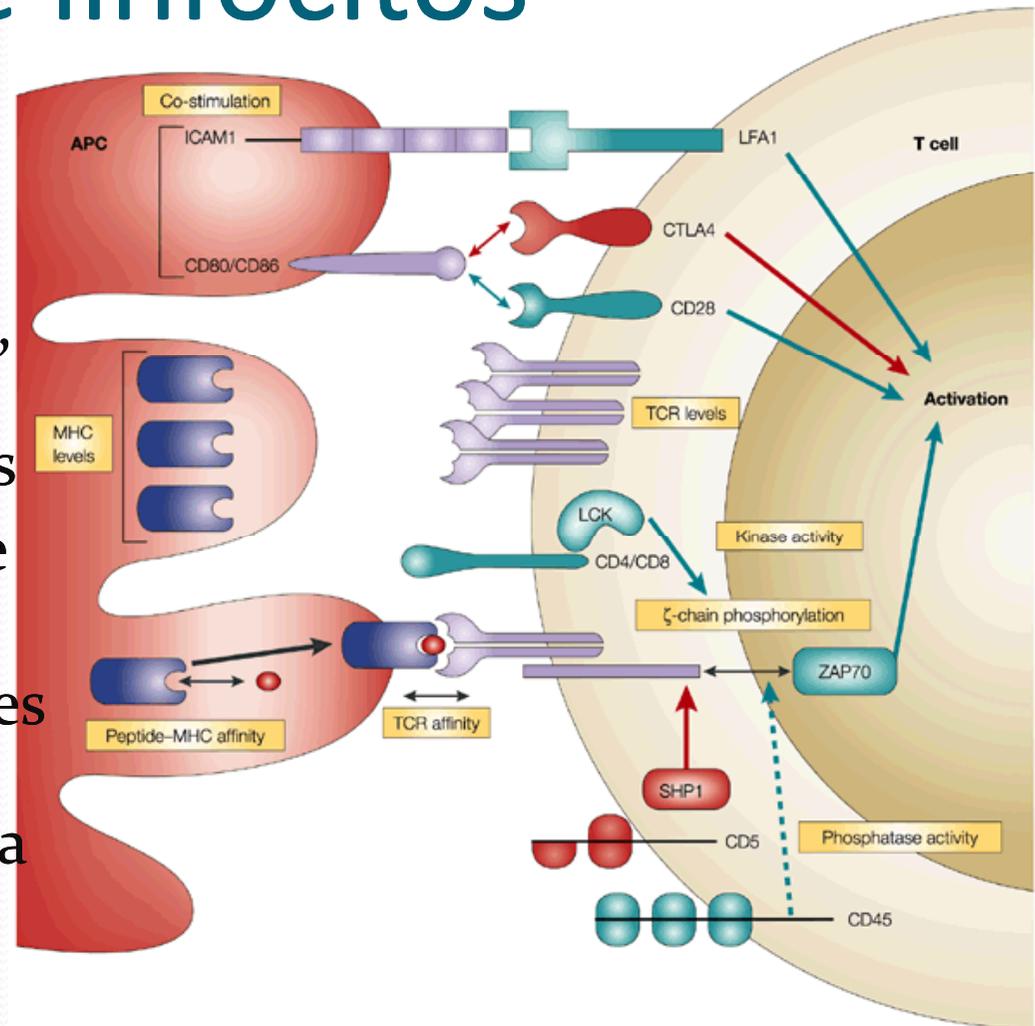
Células linfoides (células dendríticas plasmocitoides, NK, linfocitos  $T\gamma\delta$ ), linfocitos  $B_1$

### Inmunidad adaptativa

Linfocitos T (CD4, CD8, Treg, NKT) y B ( $B_2$ )

# Ontogenia de linfocitos

- Linfocitos son las únicas células del cuerpo con una alta diversidad de receptores, capaces de reconocer a una amplia variedad de antígenos
- Diversidad generada durante el desarrollo
- Responder frente a los agentes extraños, con alta **especificidad** (respetando la integridad de los tejidos propios) y preservando la **tolerancia**

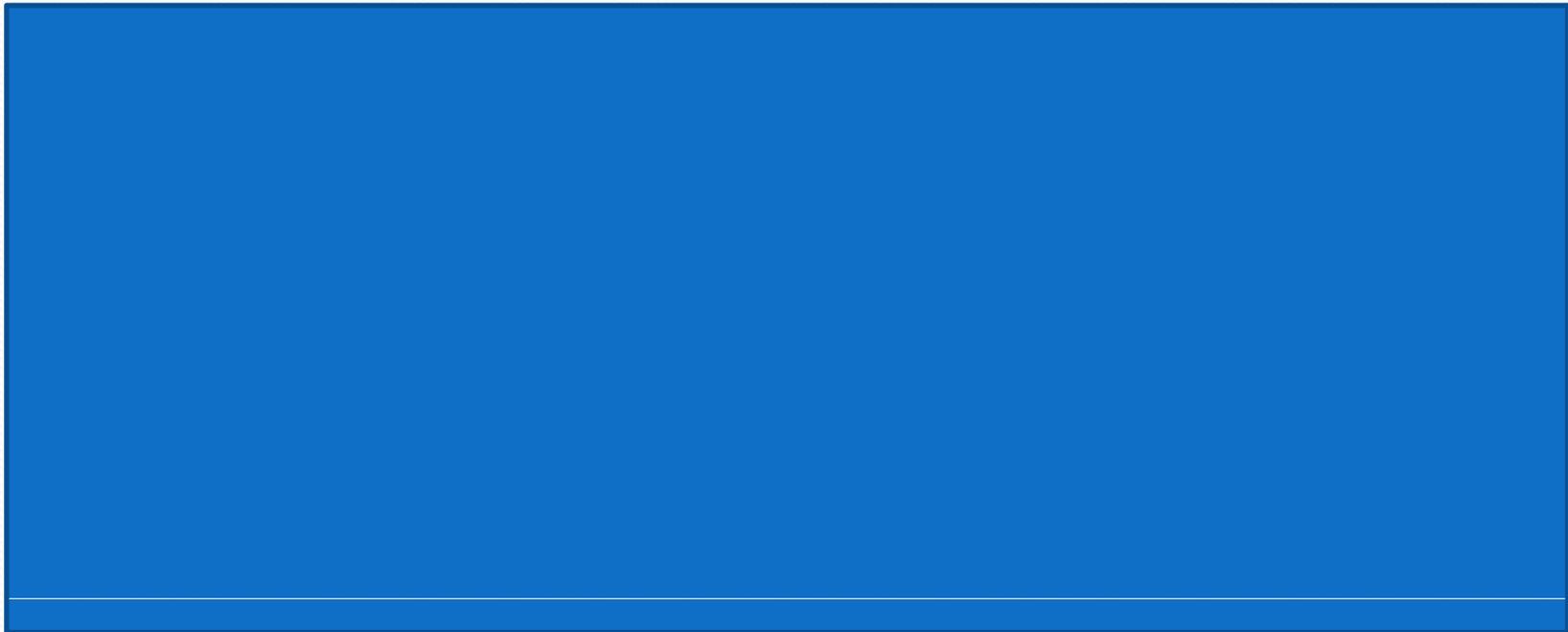


**“La inmunidad efectiva requiere de un balance entre la defensa contra los Ag extraños y la no respuesta contra los antígenos propios”**

- **Preguntas a responder:**
  - **¿A partir de qué célula se generan los diferentes linajes?**
  - **¿Donde maduran las células linfoides?**
  - **¿Que factores median este proceso?**
  - **¿Cuales son las decisiones que deben tomar los linfocitos?**
  - **¿Que factores condicionan la decisión hacia los diferentes linajes?**

**“La inmunidad efectiva requiere de un balance entre la defensa contra los Ag extraños y la no respuesta contra los antígenos propios”**

- **¿Cuál es la razón de la existencia mecanismos de regulación del desarrollo de los linfocitos?**

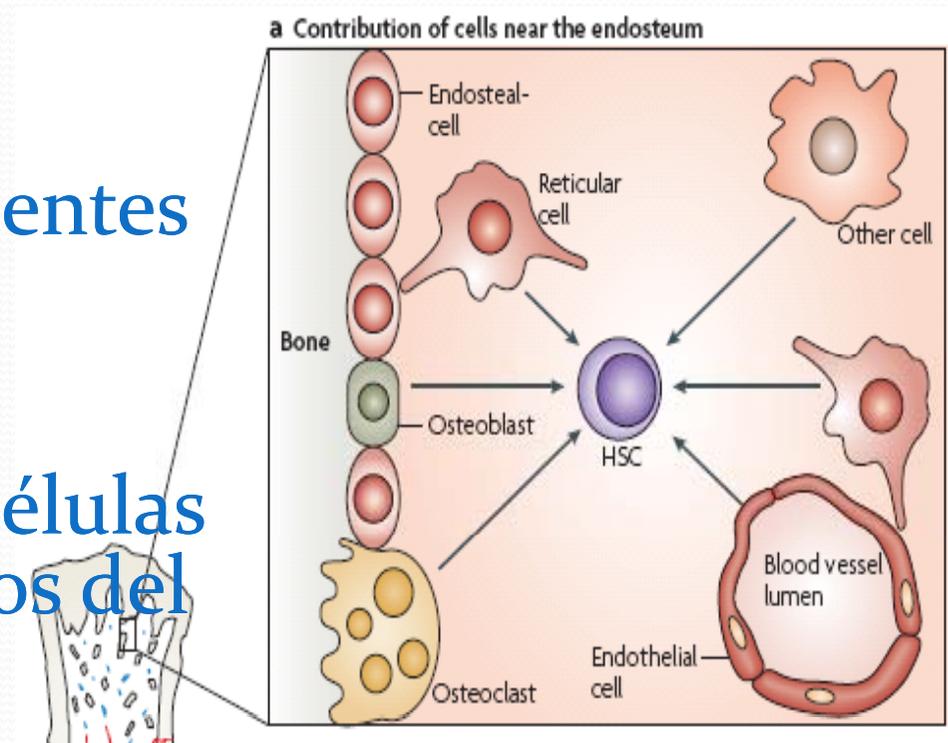


# Ontogenia de linfocitos

- ¿Cuál es la razón de la existencia de mecanismos de regulación del desarrollo de los linfocitos?
  - Asegurarse que los receptores antigénicos (BCR, TCR) sean útiles (selección positiva) y los receptores potencialmente peligrosos y autorreactivos sean eliminados (selección negativa)
  - Asegurarse que los linfocitos puedan comunicarse con las células accesorias (aquellos que no lo hacen sufren muerte por negligencia)

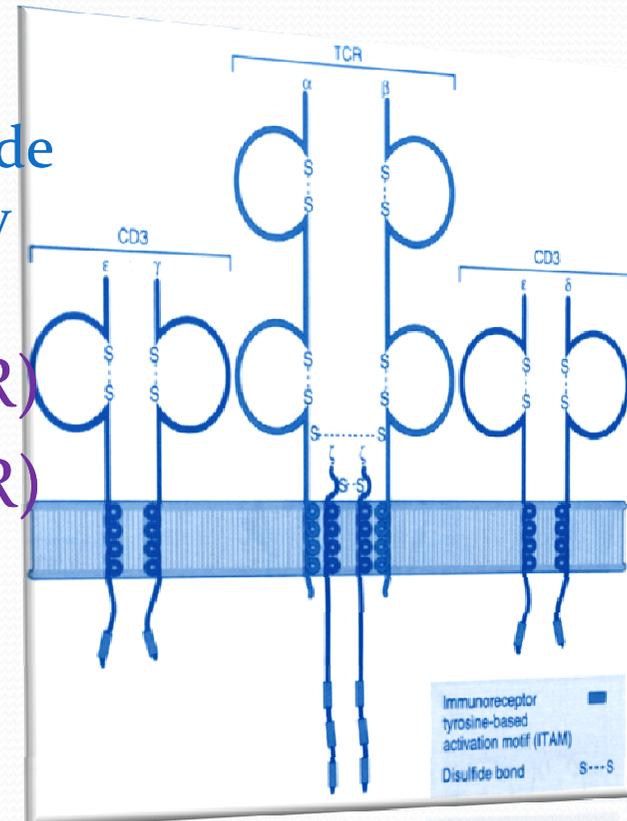
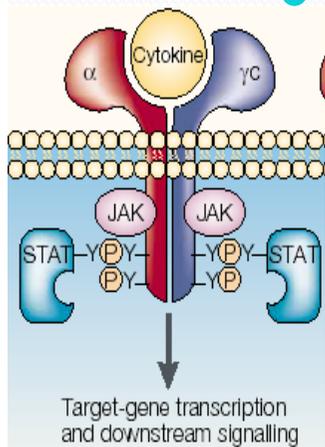
# Ontogenias de linfocitos

- Elementos que participan
  - Célula progenitora pluripotencial
  - Diferentes microambientes
  - Células de estromales
  - Mediadores solubles
  - Interacción entre las células linfoides con elementos del microambiente

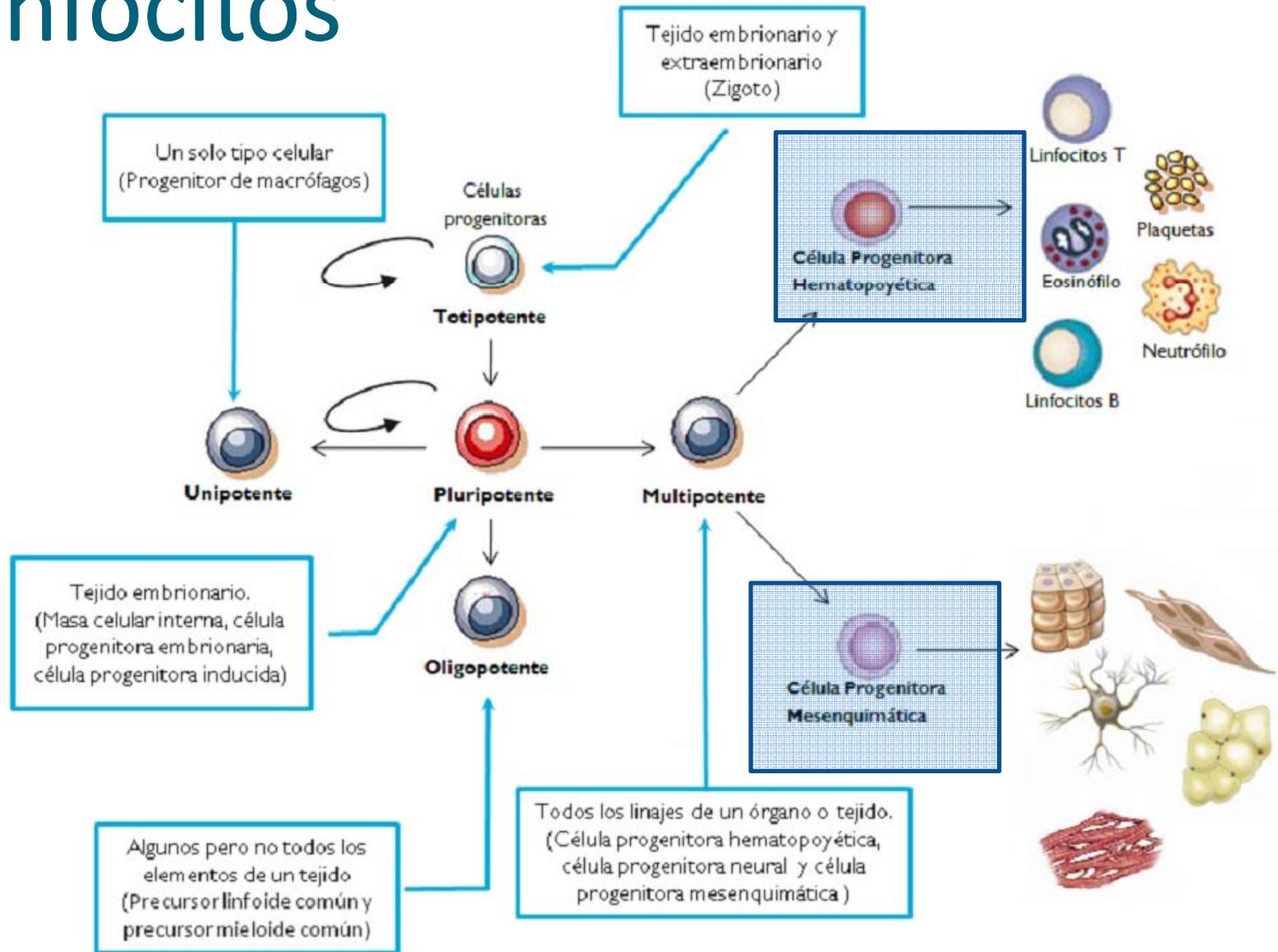


# Elementos del sistema inmune

- MHC-I y MHC-II
  - Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II
- Receptor de linfocitos T (TCR)
- Receptor de linfocitos B (BCR)
- Mediadores solubles y sus receptores (Ej. Interleukinas: IL-7/IL-7r, IL-15/IL15r)



# Ontogenia de linfocitos



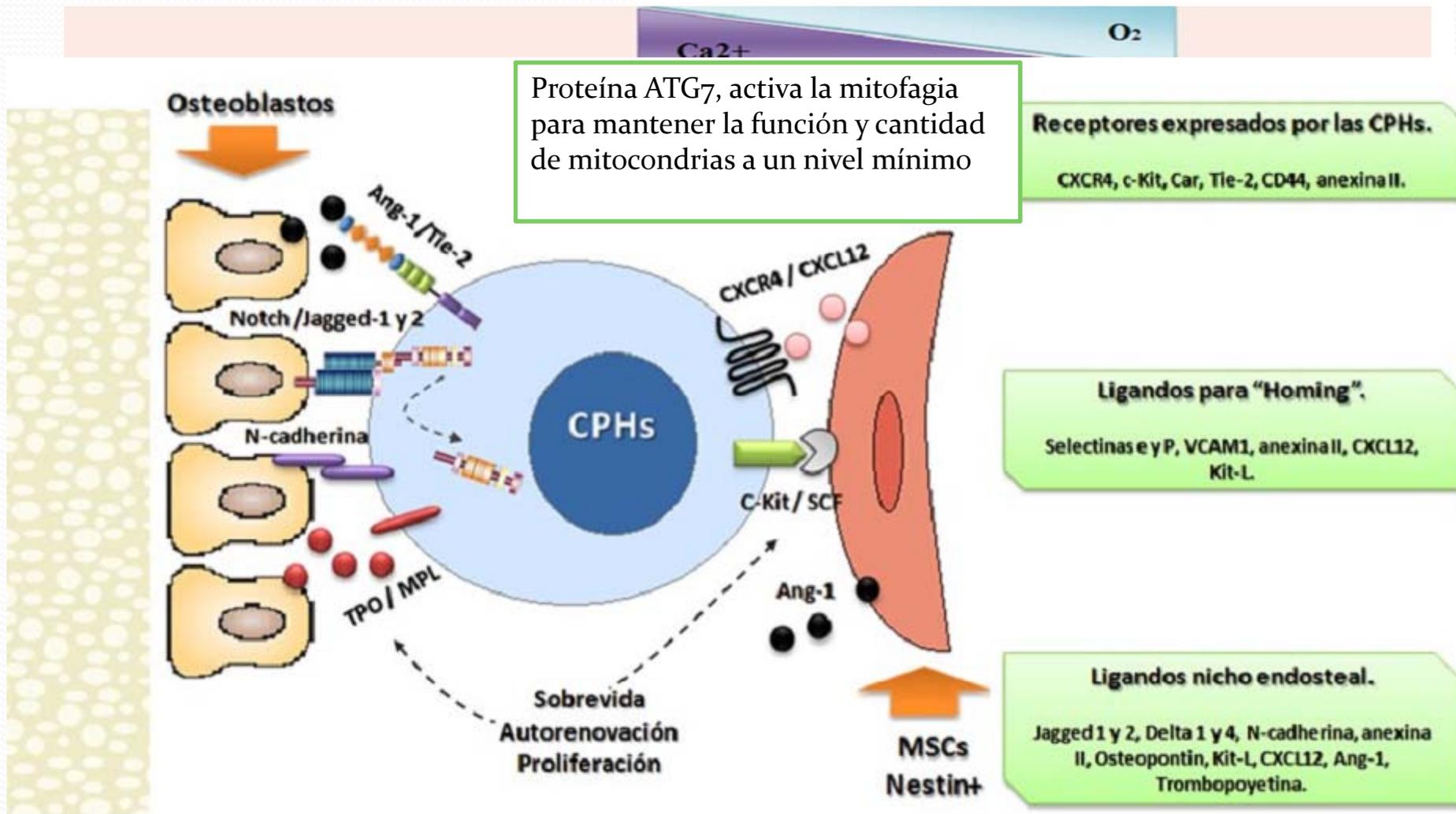
cid

id-aryocyte

*mieloide (EPLM)*

# Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

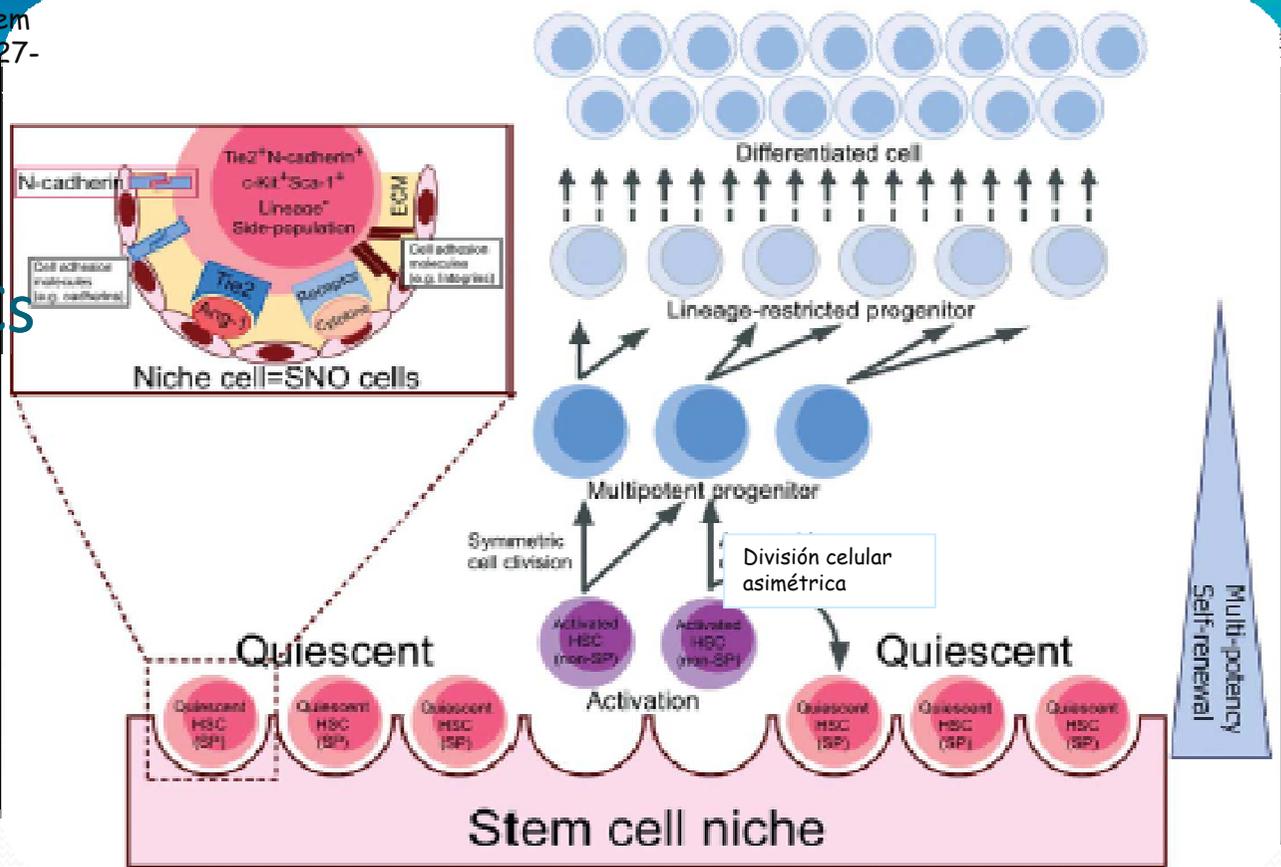
- Médula ósea



# Ontogenia:

## ORIGEN DE LAS HSCs

Arresto en el ciclo celular y adhesión a los osteoblastos



Inicio de la diferenciación requiere de activación de c-Myc, pérdida de la expresión de N-caderina e integrinas

### Características de las HSCs en reposo

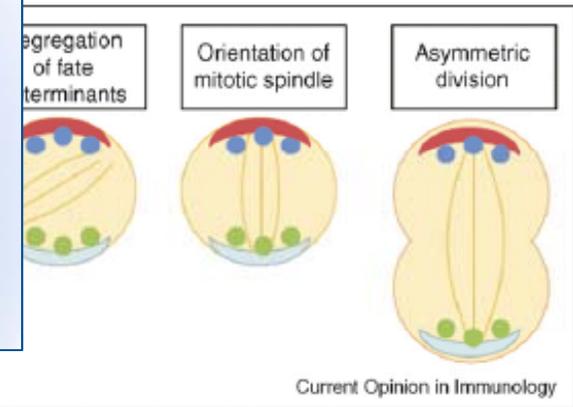
1. Protección contra el estrés
  - a) Regulación de radicales libre, actividad de aldehído deshidrogenasa
2. Adhesión a los nichos
  - a) Bajo requerimiento de factores de crecimiento, inhibición de la apoptosis, enlentecimiento del ciclo celular y unión por N-cadherin a osteoblastos
3. Hipoxia en los nichos: 1-6%

# Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

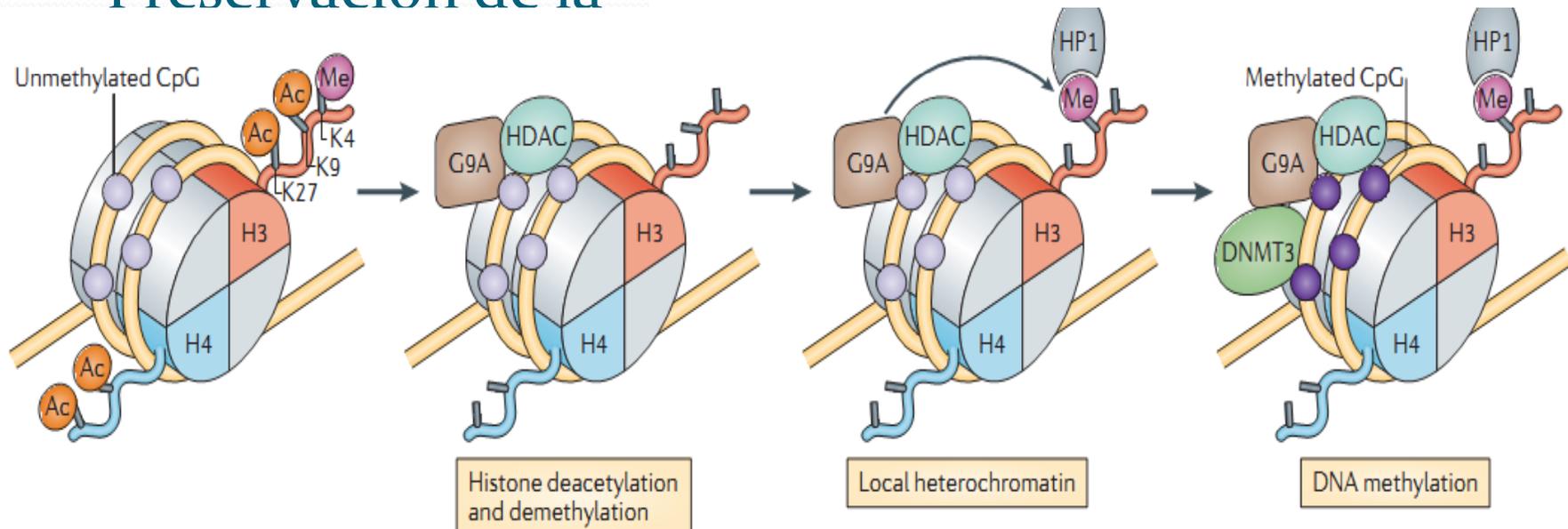
Ubicación del huso mitótico perpendicular al nicho, así asegurar que una de las hijas pierda el contacto con el nicho

- “Stem cell”: División celular asimétrica, simétrica autorenovación y simétrica comisión

El complejo represivo Polycomb (CRP) asociado con fenómenos de metilación metilación/demetilación del ADN y así reprimir genes asociados con la diferenciación



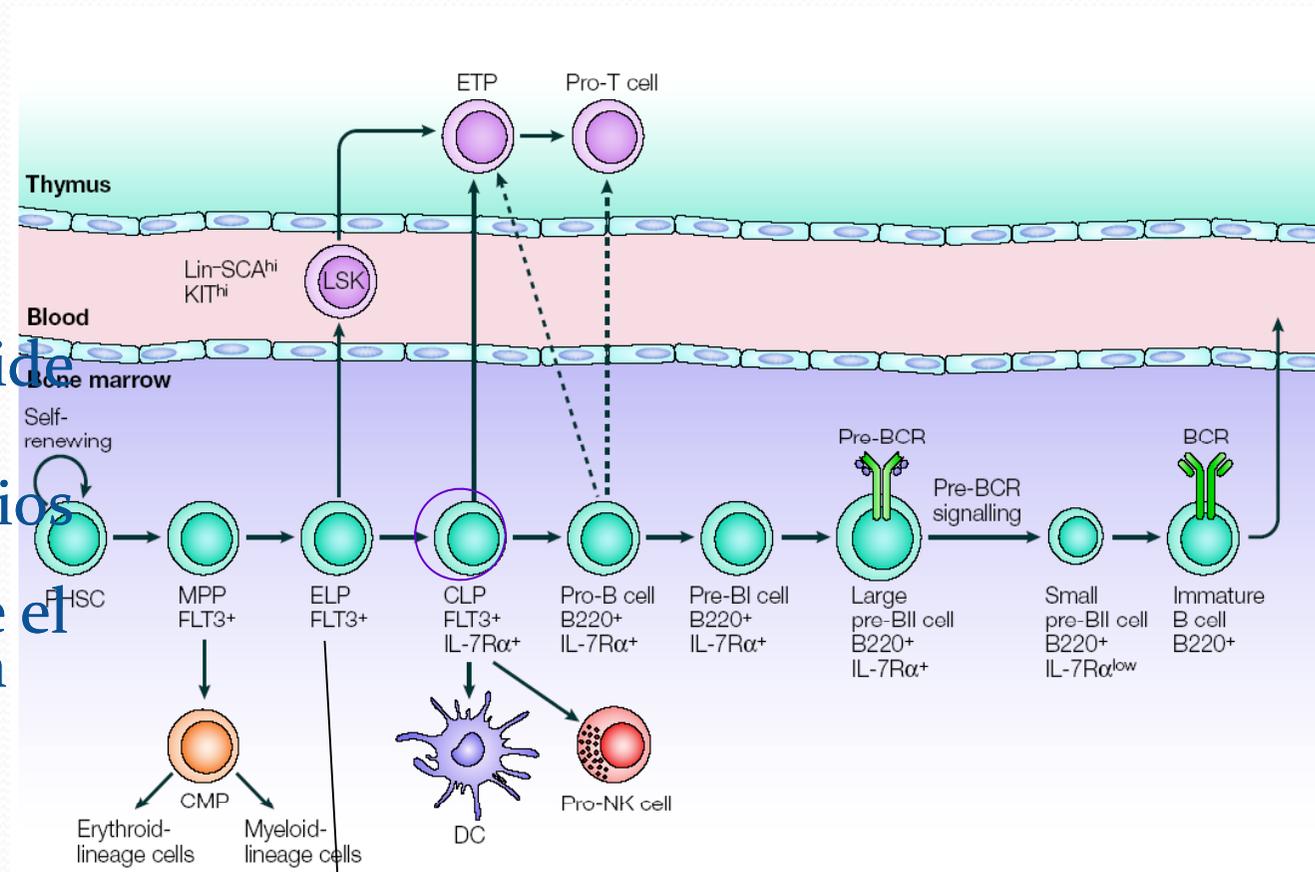
- Preservación de la



# Ontogenia de linfocitos

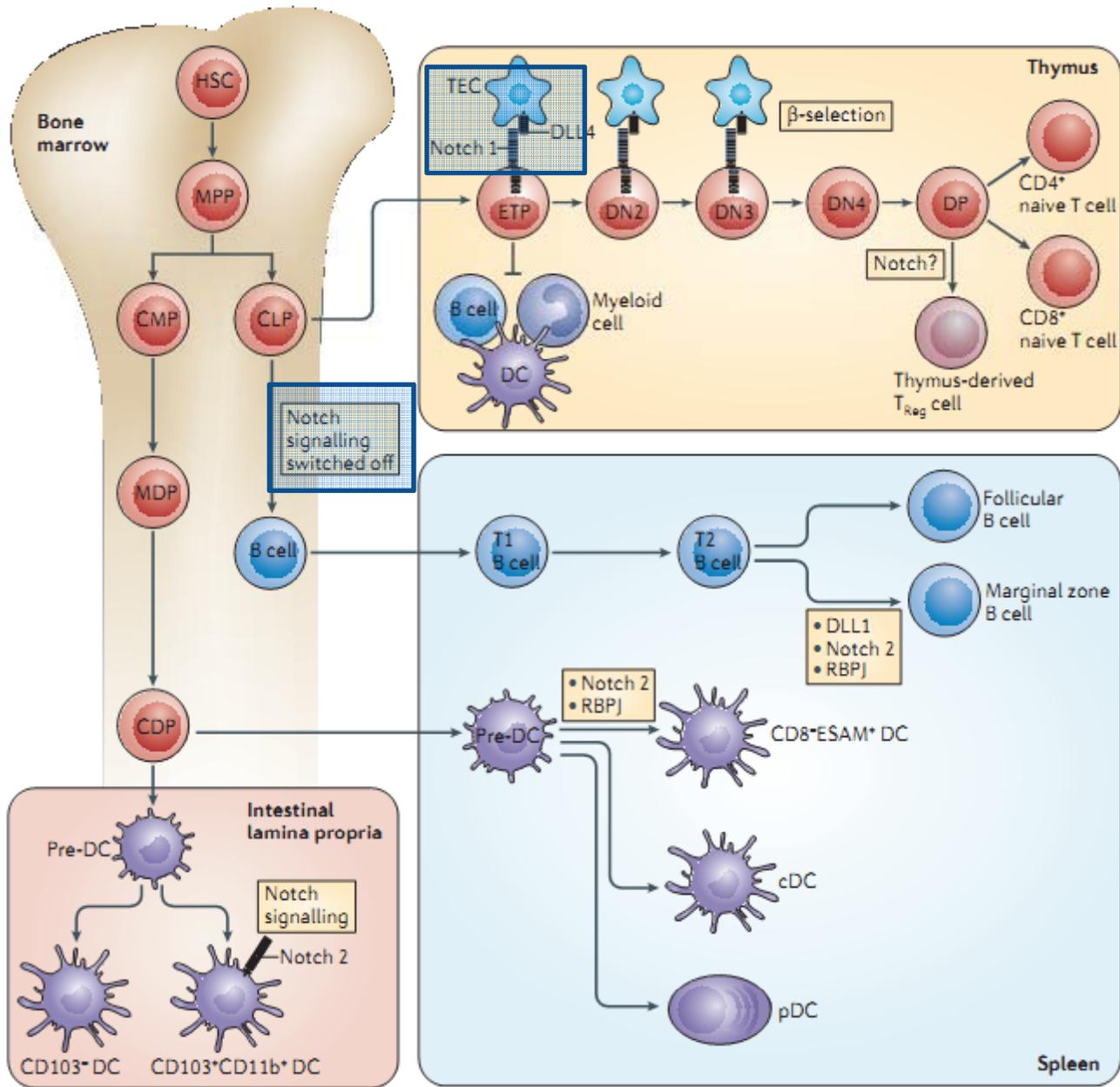
CLP: precursor linfoide común  
CMP: precursor mieloide común

- Primer paso: Progenitor multipotencial origina el linaje linfoide y mieloide
- En ciertos estadios de maduración puede revertirse el desarrollo de un linaje celular

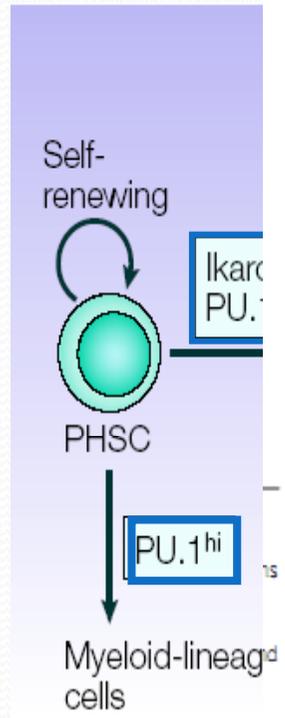
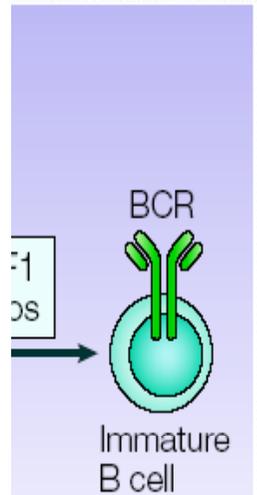


Comienza a expresar Rag (recombinasas)

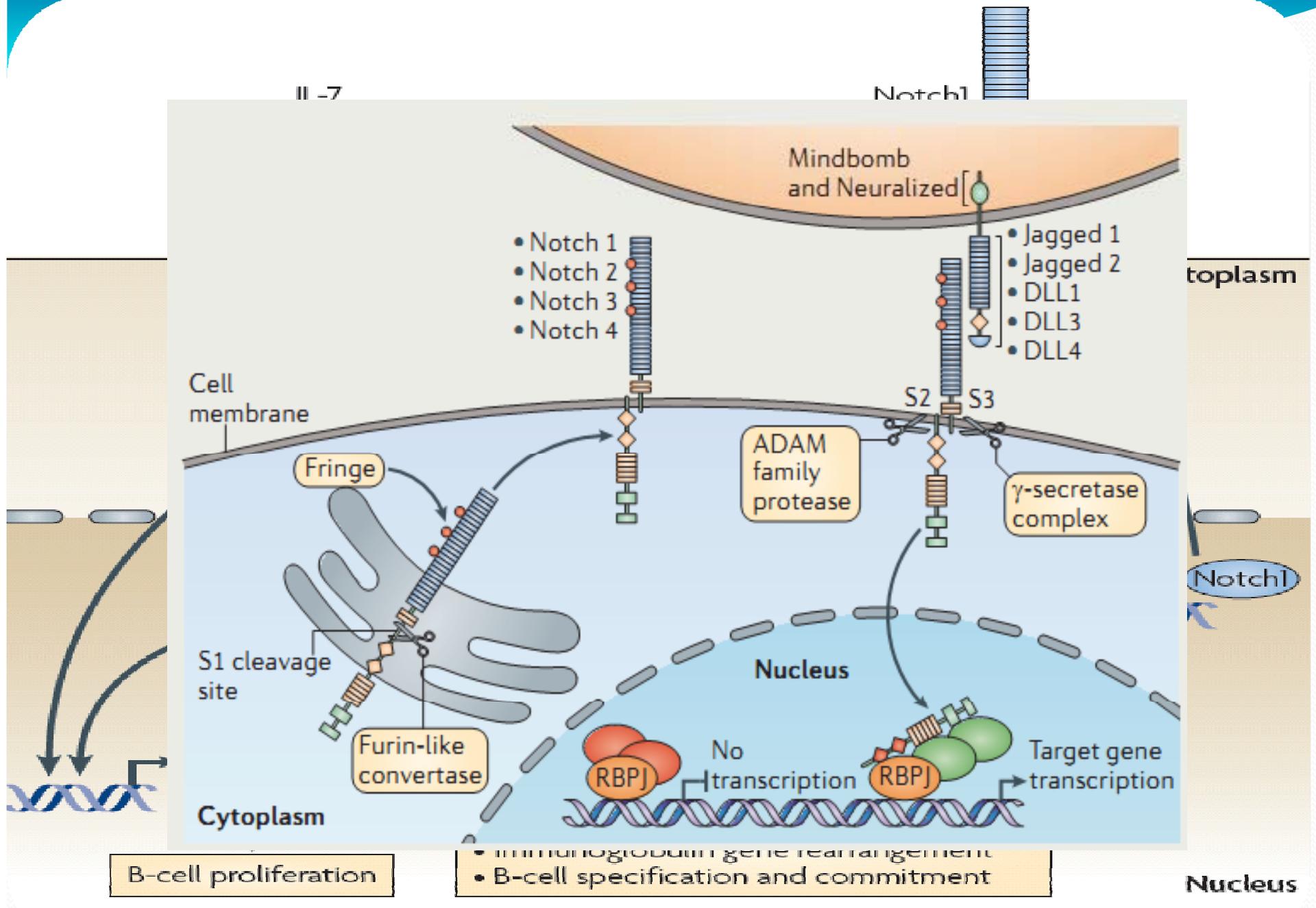
# Que e Linaje



ón:  
s. B



Factores involucra desarrollo

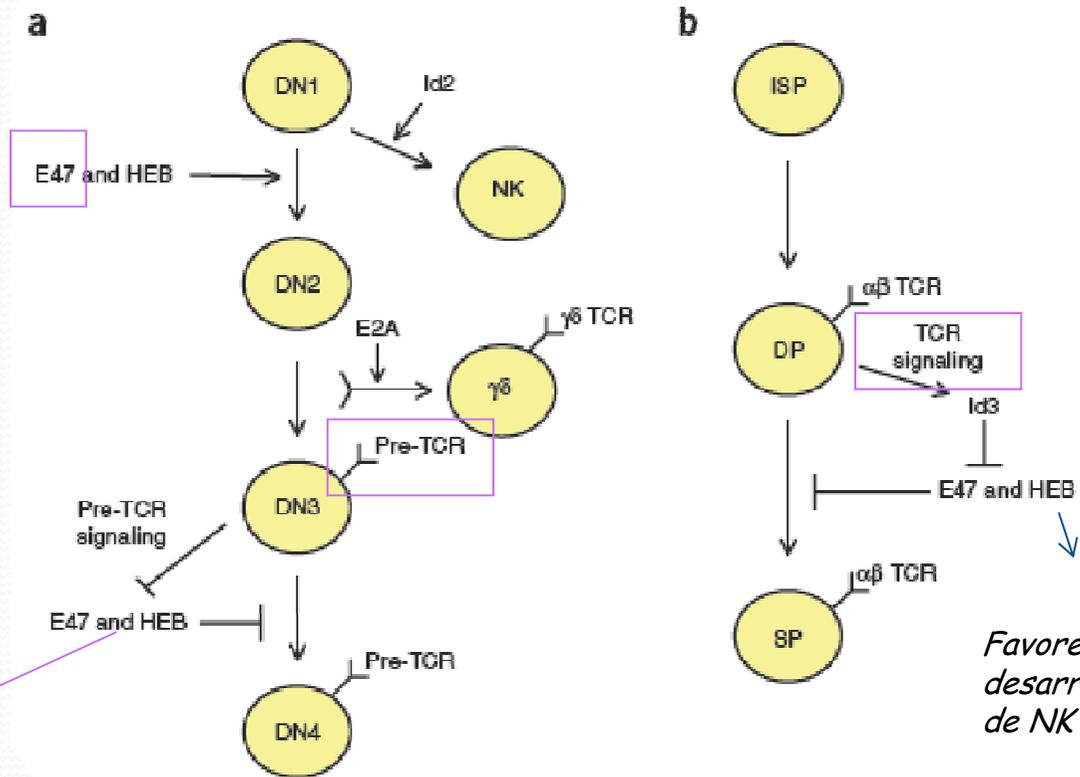
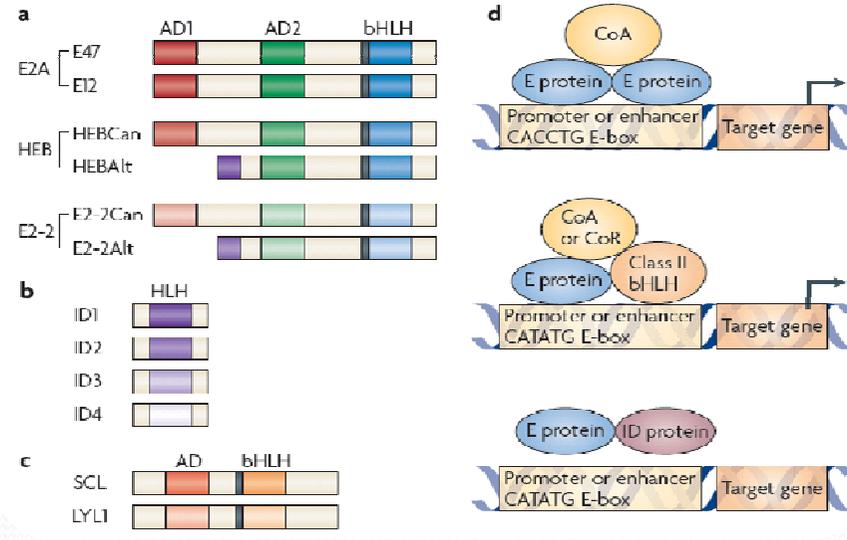


# Ontogenia:

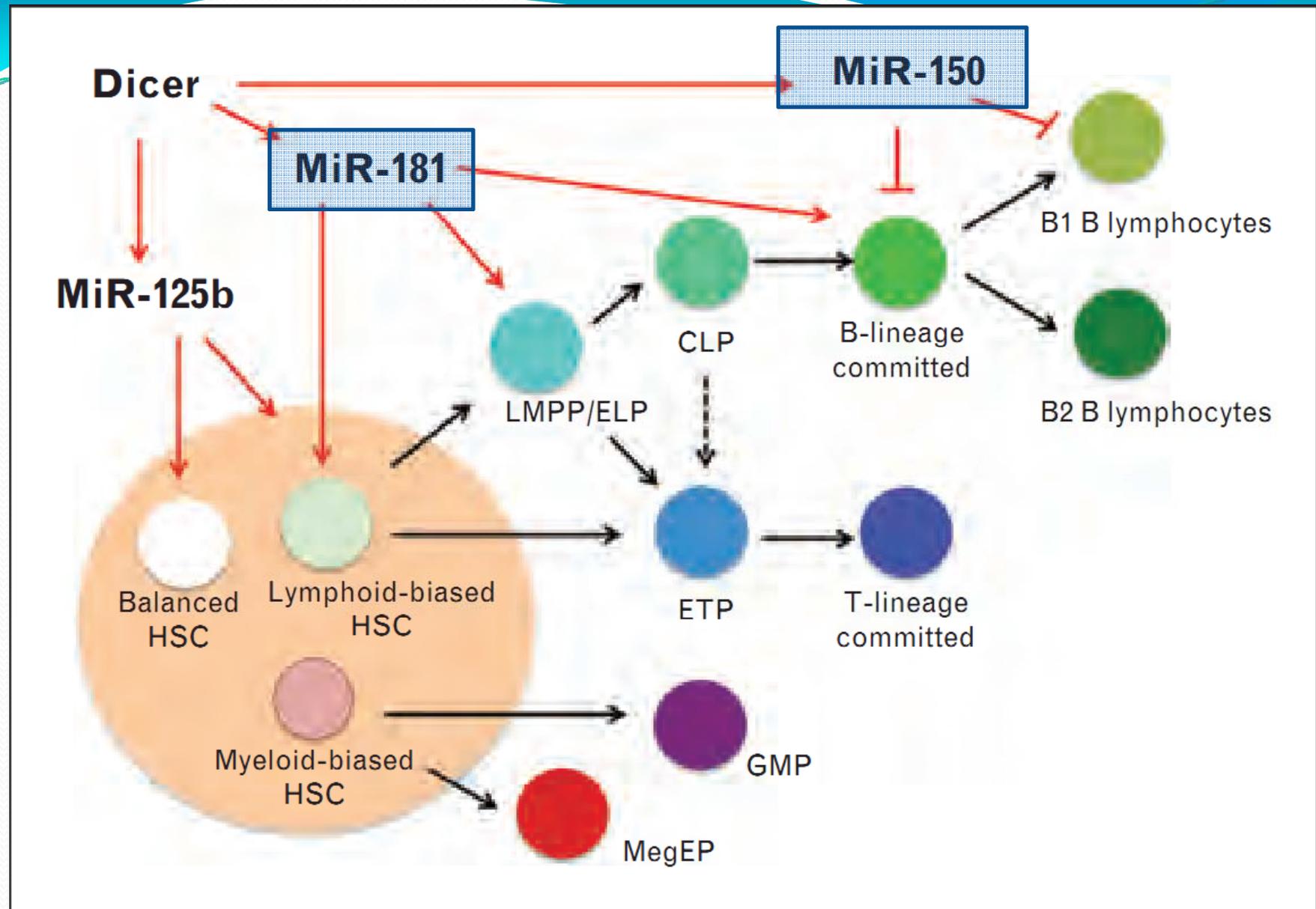
## LINFOCITOS T Y PAPEL DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HLH (hélice-asa-hélice)

- E2A promueve el desarrollo de linfocitos B y TCR $\gamma\delta$
- Id2 promueve el desarrollo de NK

*Suprime desarrollo de las DP, en ausencia de señales del pre-TCR*

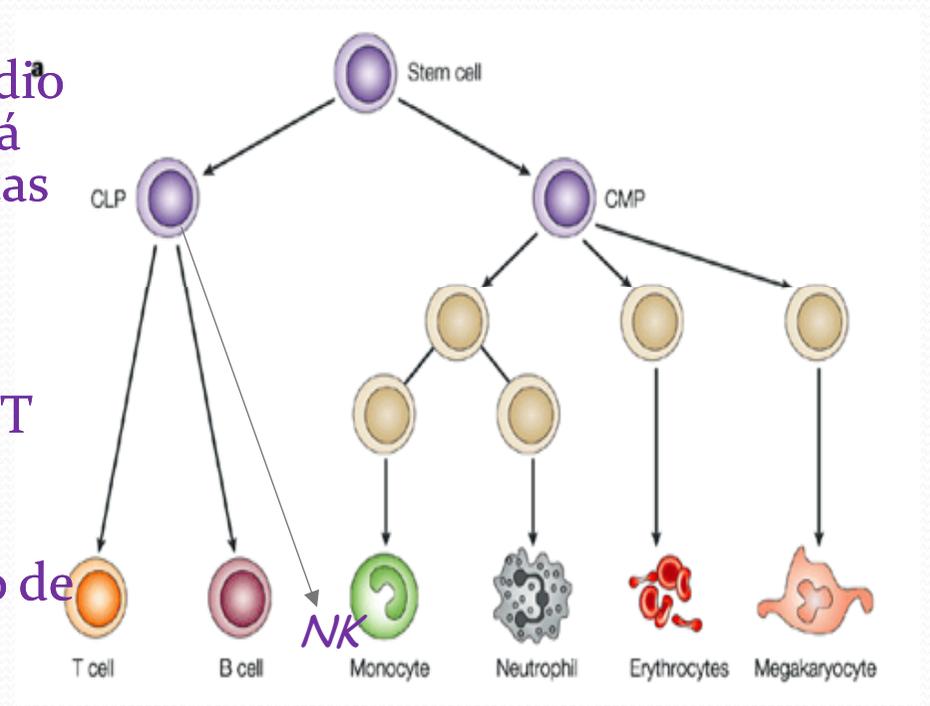


*Favorece el desarrollo de NKT*



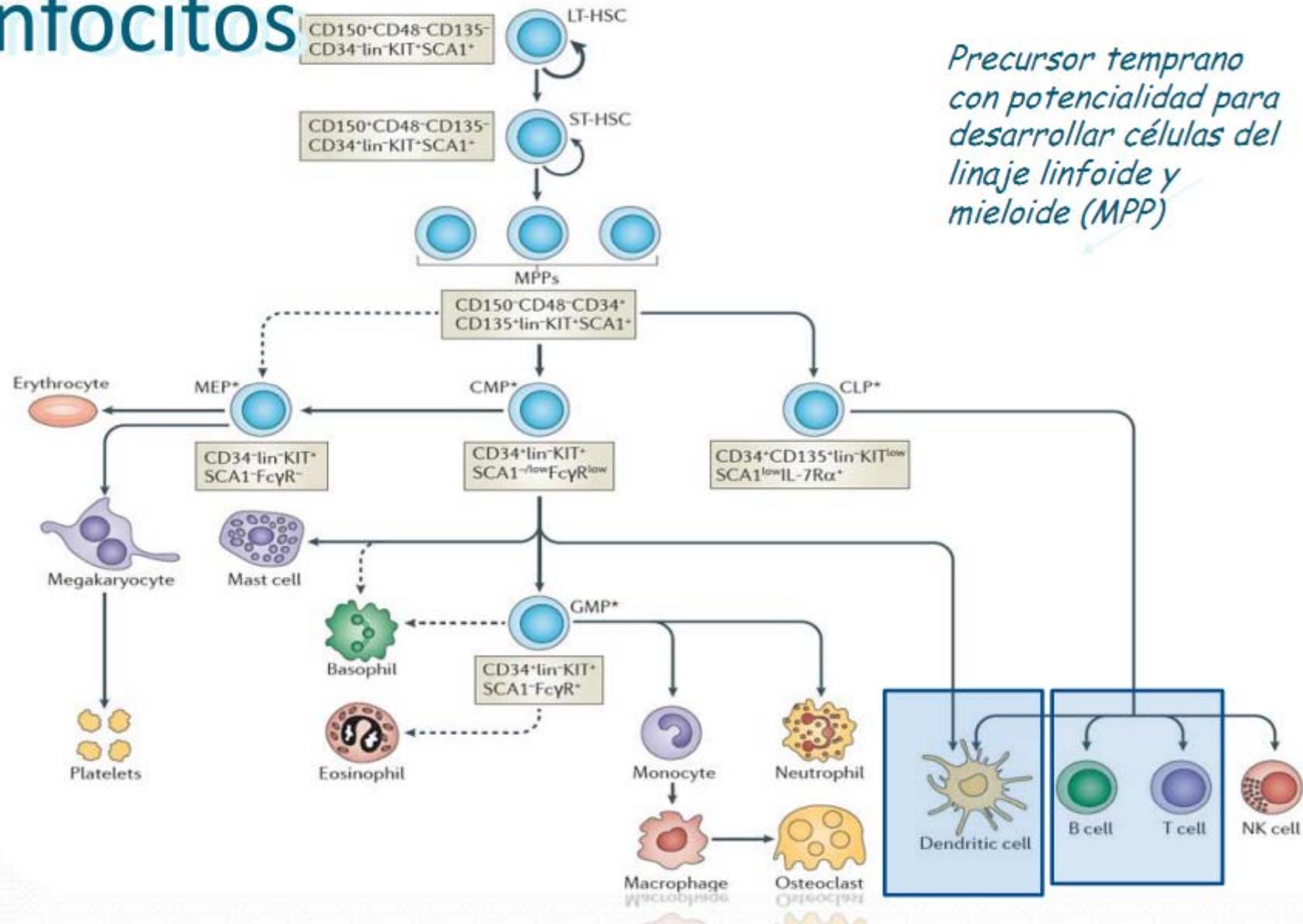
# Ontogenia: SERIE LINFOIDE

- Los linfocitos T, B y NK se originan de un precursor
  - El primer evento es ubicarse en estadio precursor linfoide común (CLP), dará origen a: T, B, NK y células dendríticas de origen linfoide (plasmocitoides)
  - Destinados a originar células B permanecen en la MO
  - Destinados a madurar como células T egresan de la MO y se ubican en el timo
  - IL-7 indispensable para el desarrollo de linfocitos T y B
  - Mientras IL-15 es requerida para el desarrollo de NK



# Ontogenia de linfocitos

Nat Rev CB 12, 2011: 643



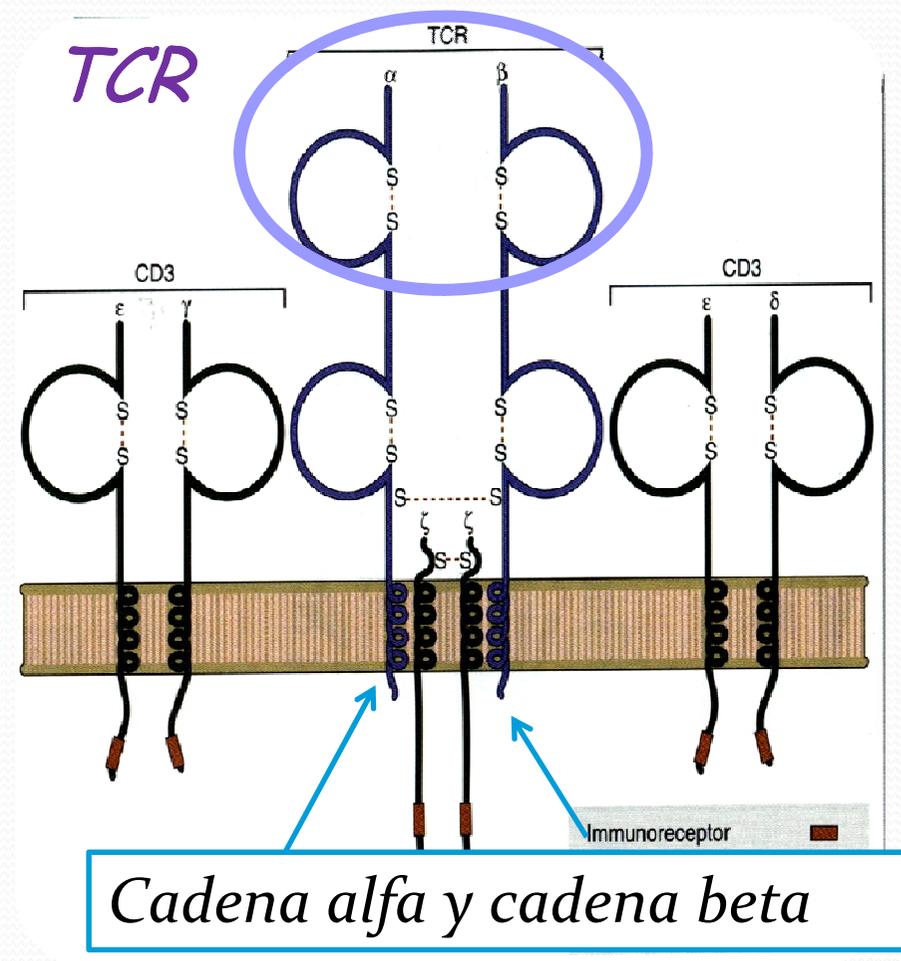
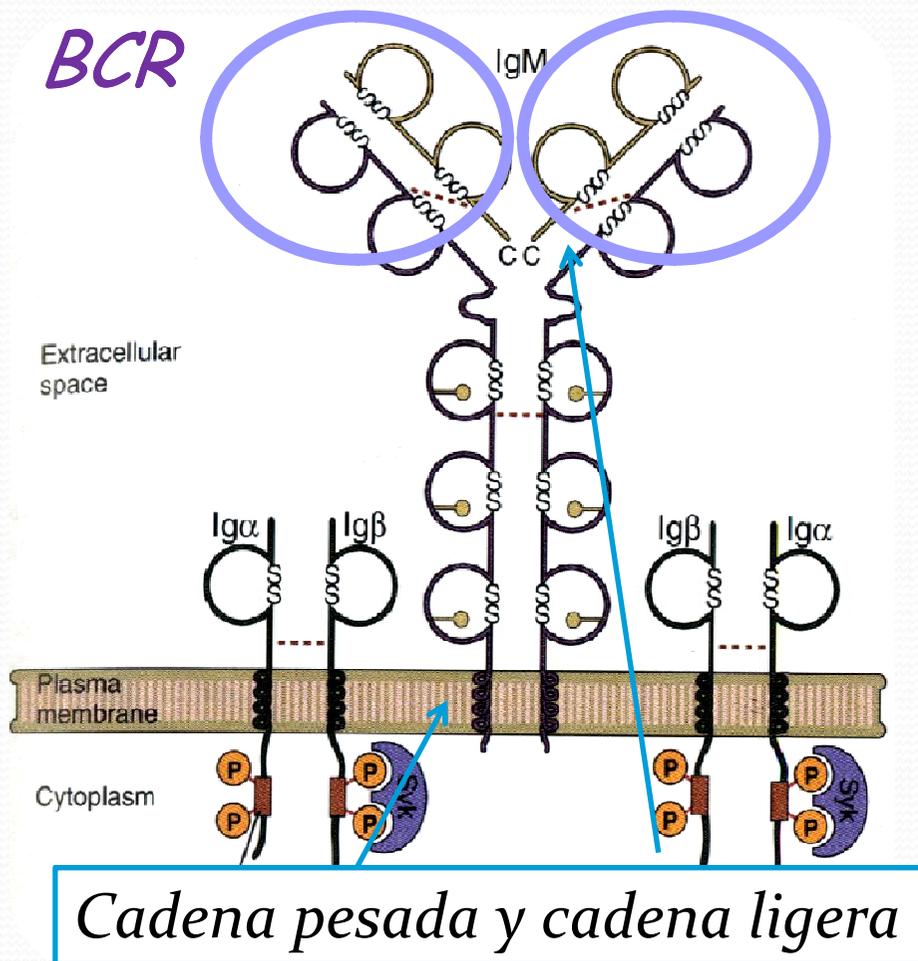
*Precursor temprano con potencialidad para desarrollar células del linaje linfoide y mieloide (MPP)*

# Ontogenia de los linfocitos

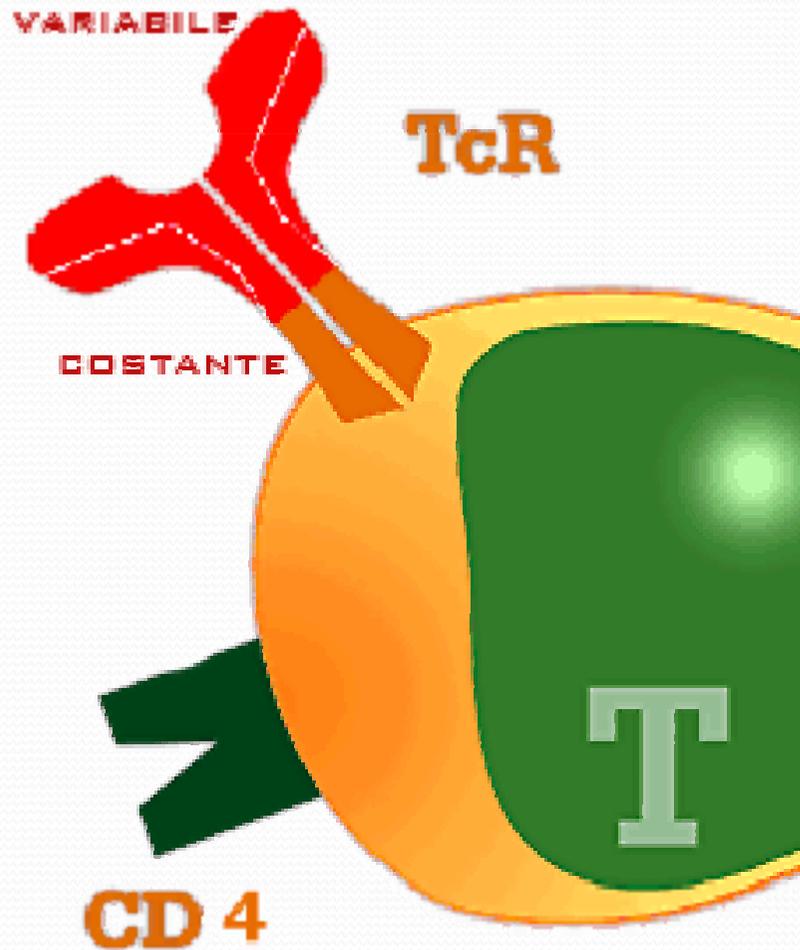
- **El desarrollo de los linfocitos depende de tres procesos básicos:**
  - **Migración y proliferación**
  - **Diferenciación: adquisición de fenotipos maduros**
  - **Selección del repertorio: células específicas a los antígenos (Ag) extraños y restringidas por las moléculas de histocompatibilidad (MHC) propias**

# Uno de los objetivos fundamentales de la ontogenia:

Generación del receptor antigénico funcional en linfocitos B (BCR) Y T (TCR)



# Ontogenia de los linfocitos T



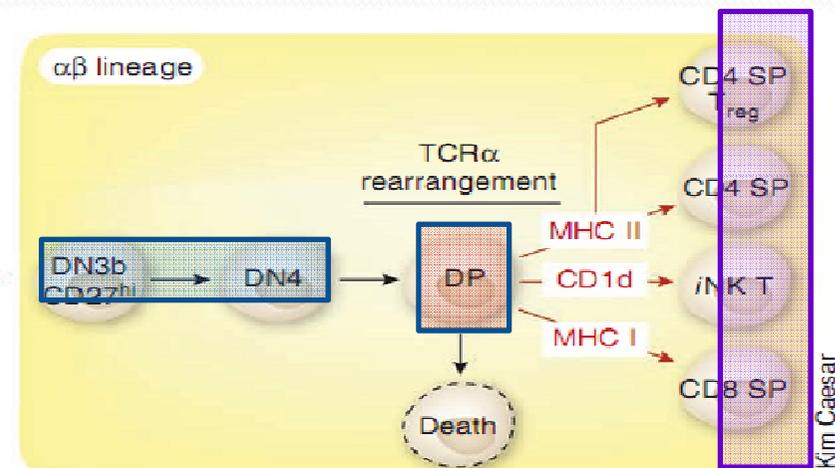
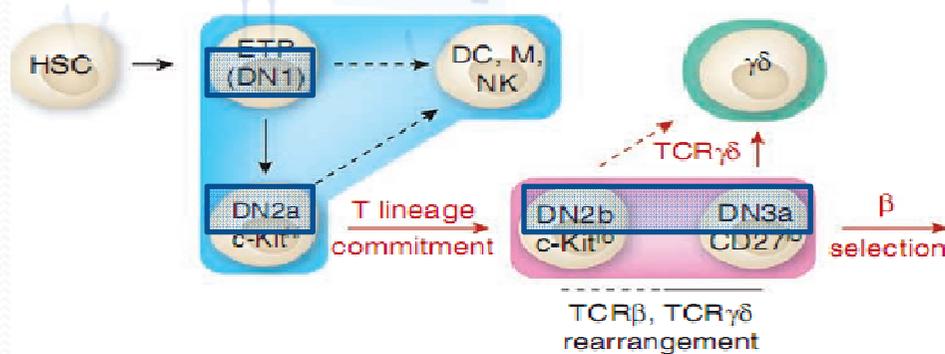
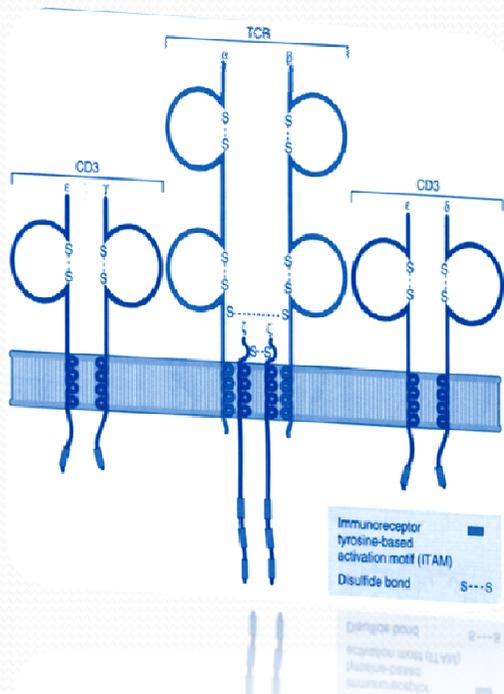
*CD4 o CD8*

TCR: cadenas  $\alpha$  y  $\beta$   
( $\gamma$  y  $\delta$ ) asociados  
con CD3 ( $\gamma, \delta, \epsilon, \gamma$   $\zeta\zeta$ )  
Moléculas que  
permiten la  
comunicación  
intracelular

# Ontogenia de linfocitos T

• Durante la ontogenia de linfocitos T se toman las siguientes decisiones:

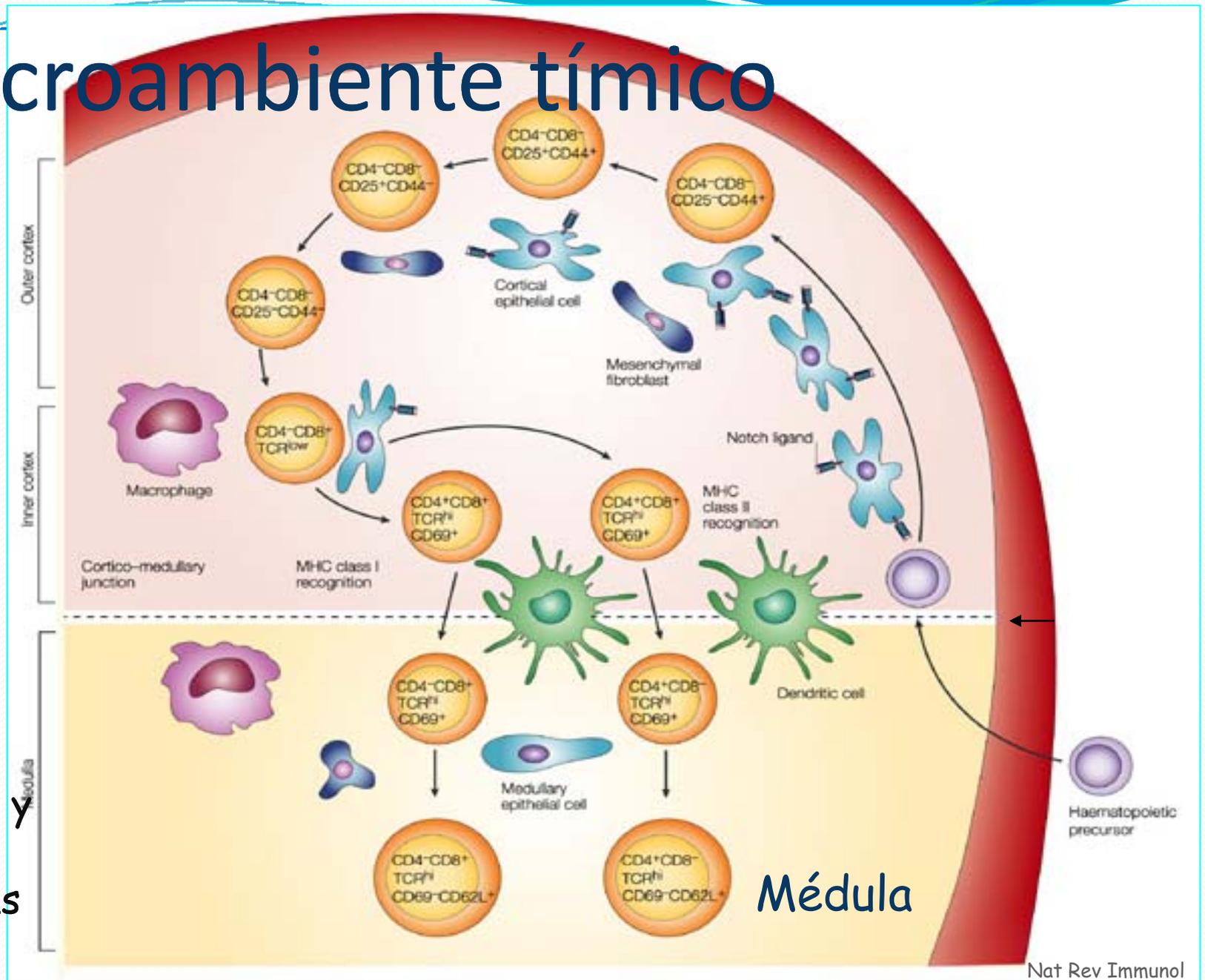
- Comisionar hacia el linaje linfoide y decidir hacia linfocito T o B
- Reordenamiento del TCR
- Escoger entre TCR $\gamma\delta$  o TCR $\alpha\beta$
- Selección de la cadena  $\beta$ ,  $\alpha$
- Selección positiva y negativa
- Escoger entre CD4, CD8, NKT o Treg



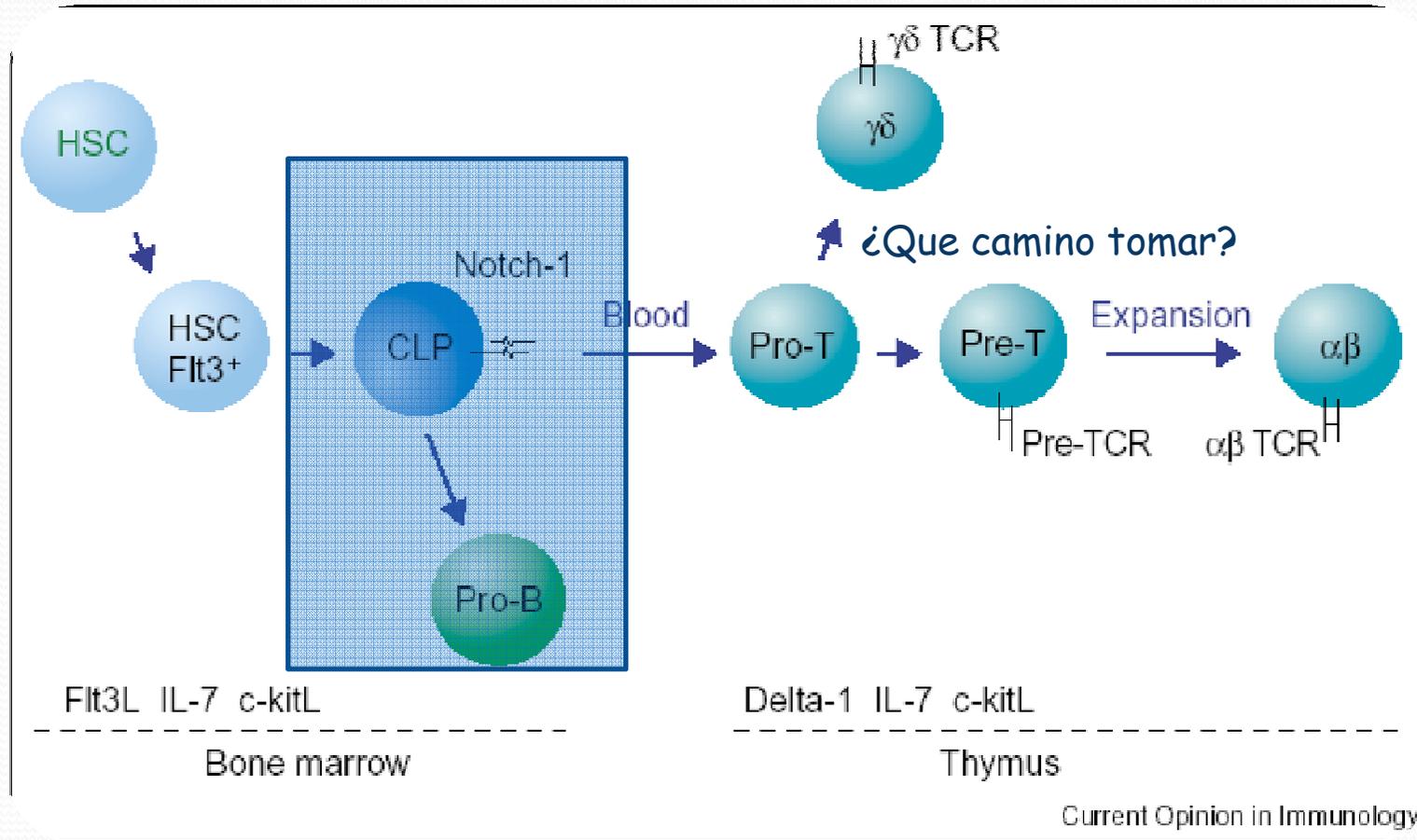
# Microambiente tímico

Células  
epiteliales  
corticales

Células  
epiteliales  
medulares y  
células  
dendríticas



# Ontogenia: SERIE LINFOIDE



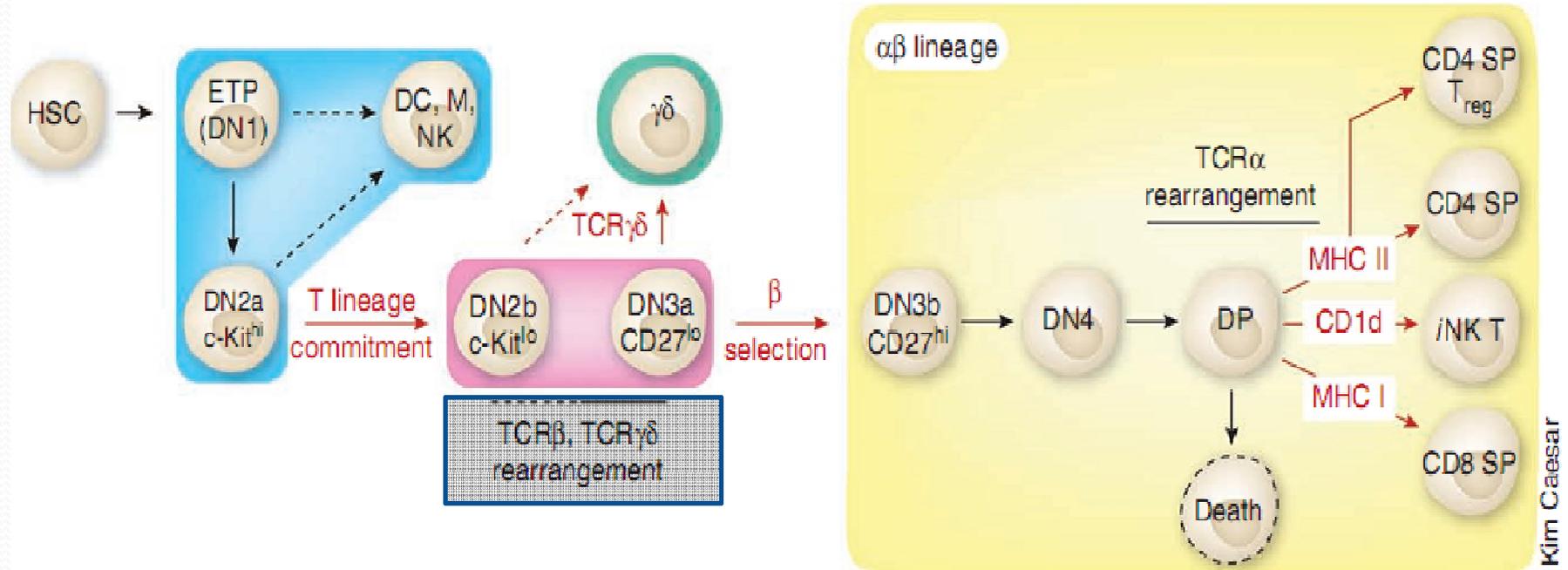
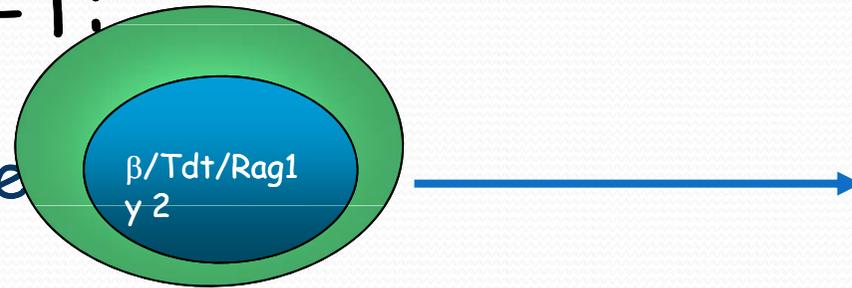
Ligando de Notch está presente en las células epiteliales corticales tímicas

# Ontogenia de Linfocitos T

Timocito temprano: Pro-T;

Reordenamiento de la Cadena  $\beta$  del TCR (receptor de linfocito T)

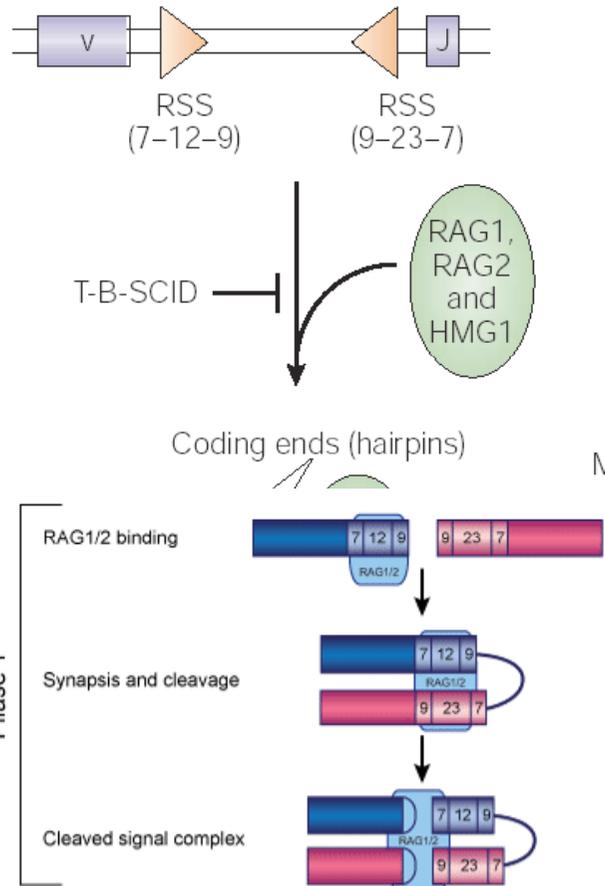
Doble negativo (DN=CD4-/CD8-)



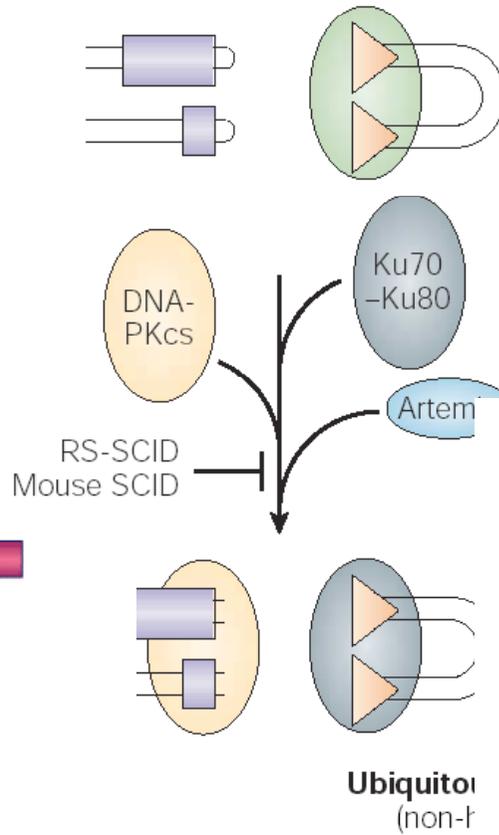
TdT añade nucleótidos a la unión V-D y D-J favoreciendo aun mas la diversidad (incrementa la diversidad de CDR3) o pérdida de nucleótidos

# Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

## a Initiation



## b DNA-damage recognition and hairpin opening



## c DNA repair

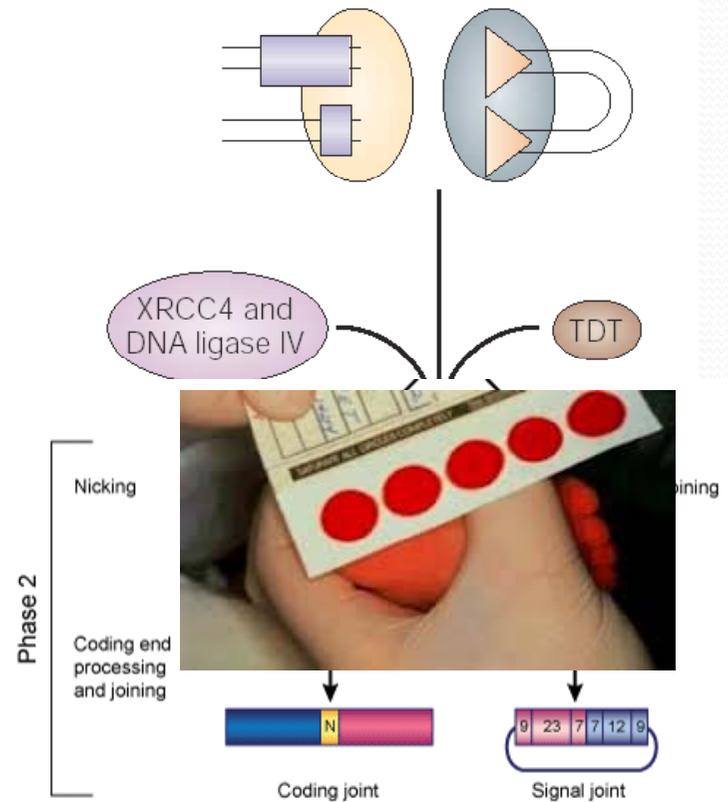
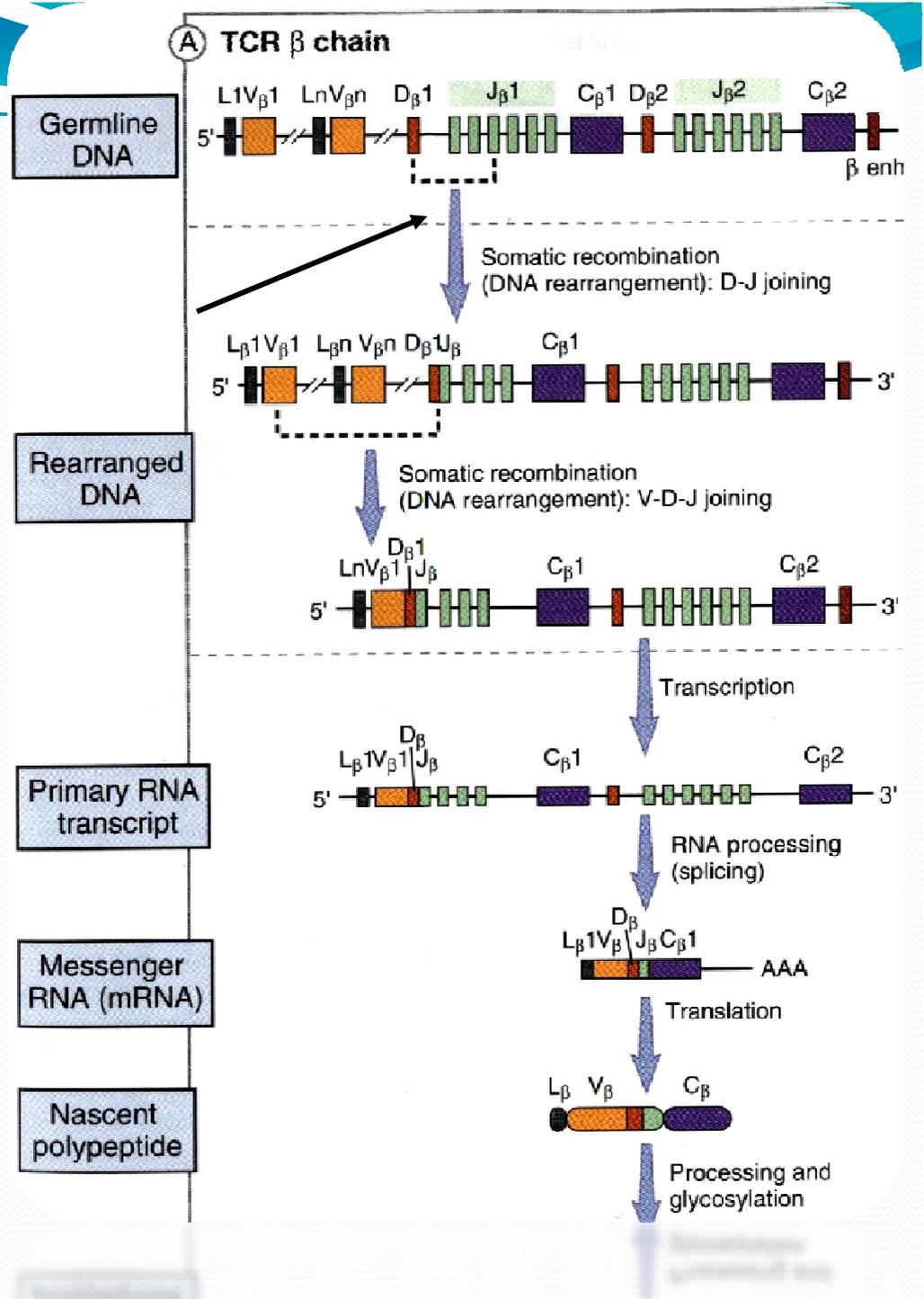


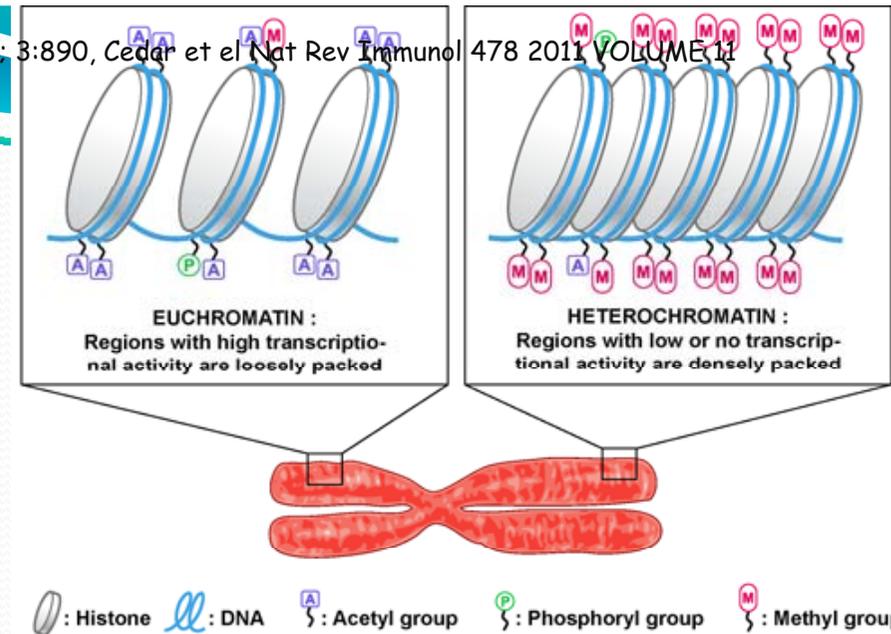
Figure 5. V(D)J Recombination. The two DNA coding segments to be joined are shown as dark blue and pink rectangles.

# Reordenamiento de los genes que codifican para la cadena $\beta$

Dos alelos:  
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: **EXCLUSIÓN ALÉLICA**



# Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

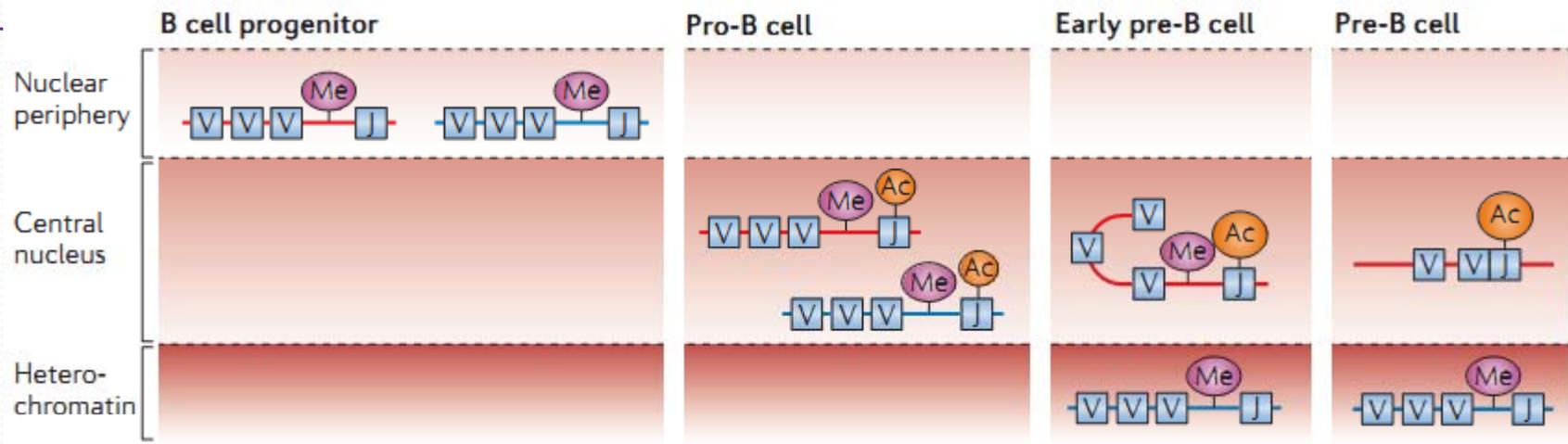


## Modificaciones de las histonas

- Acetilación: accesibilidad a la cromatina

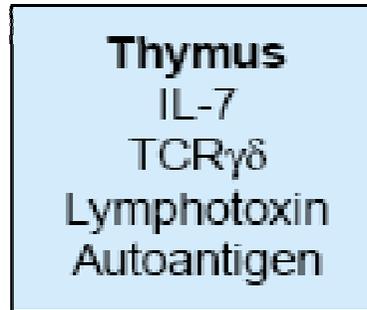


- I



# Ontogenia de Linfocitos T

Generation



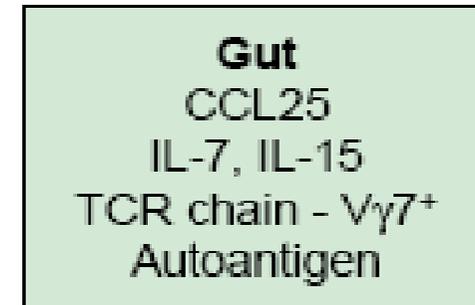
$\beta$   
selection

Migration

CCR10

CCR9

Homing  
and expansion



Current Opinion in Immunology

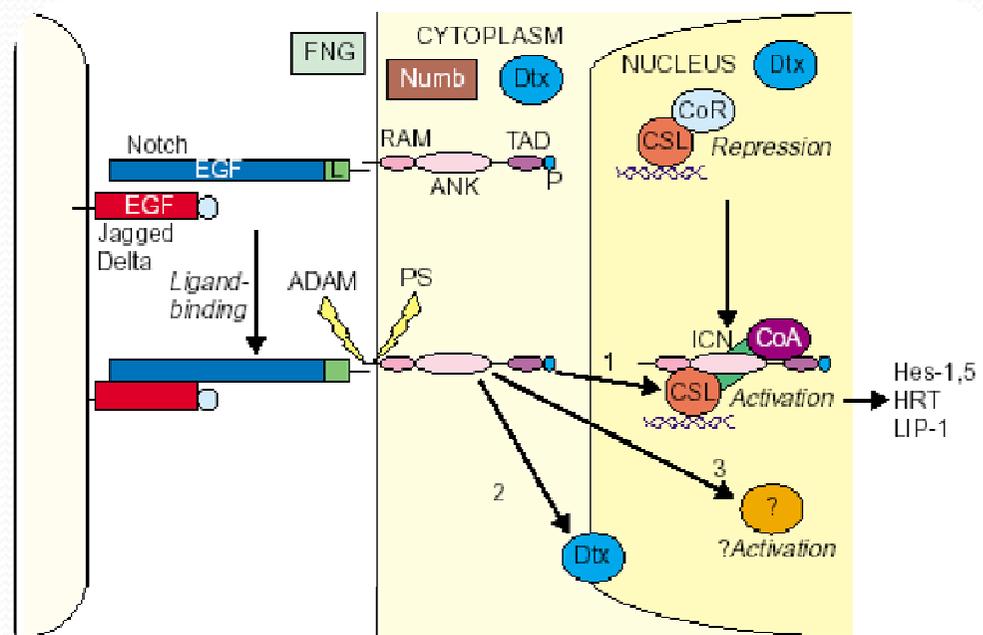
# Ontogenia: LINFOCITOS T

## Papel de Notch

- Ligando de Notch, DELTA-1/4 es expresado en la unión córtico-medular
  - Favorece desarrollo de  $T\alpha\beta$  sobre  $\gamma\delta$
  - Nocth en conjunto con el preTCR favorecen el paso de DN<sub>3</sub> a DP
  - Participa además en la selección del linaje CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>

- Notch media ensamblaje del pre-TCR y sinergiza con él, en la selección de linfocitos TCR  $\beta$

- Notch bloquea EA2/Pax5 (importante en la inducción del desarrollo de linf B)

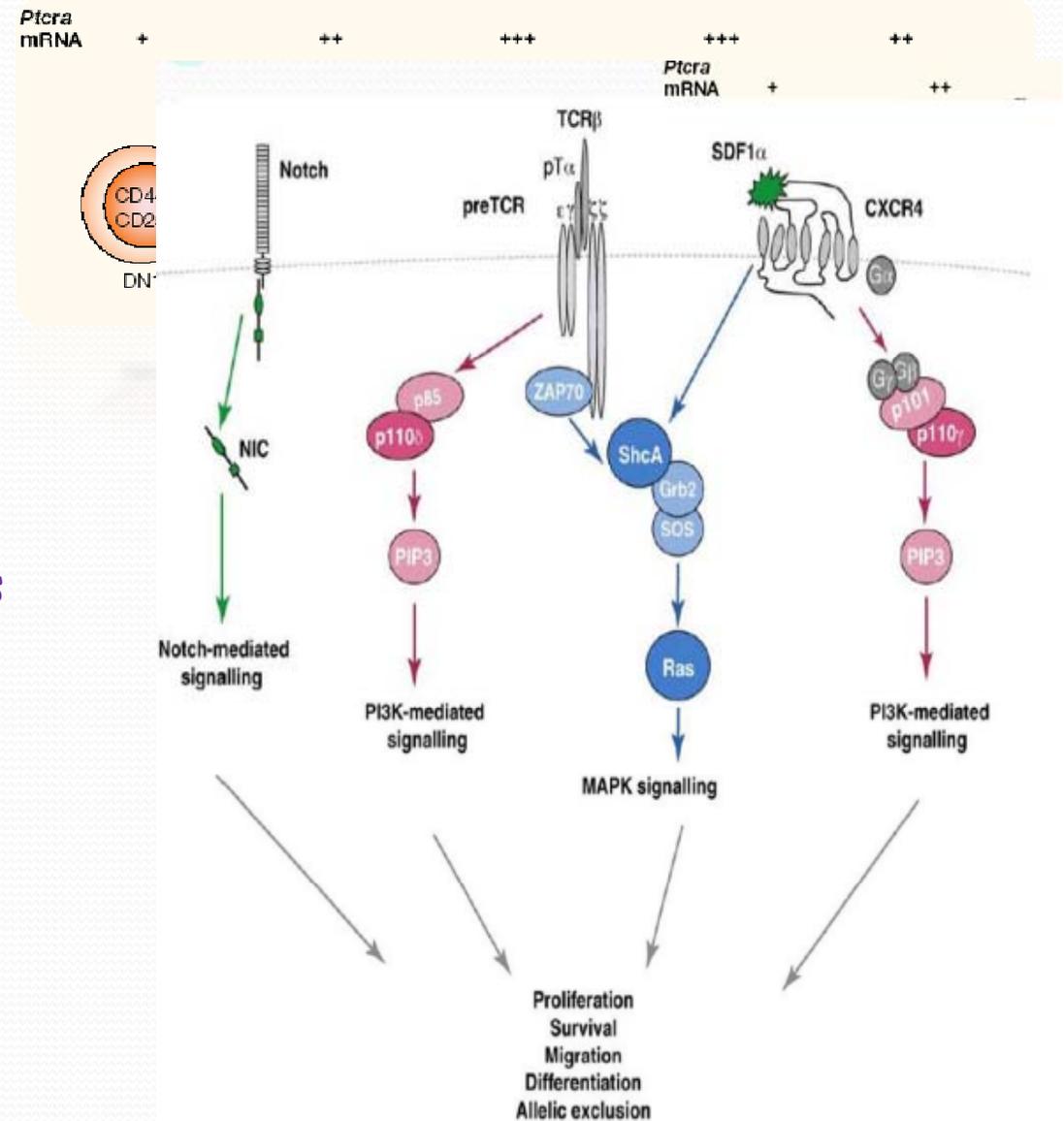


# Ontogenia: LINFOCITOS T

preTCR (cadena  $\beta$  recién reordenada + pTa (cadena alfa temporal o sustituta)) = Punto de control:

- Es expresado seguido al reordenamiento exitoso de TCR $\beta$ .
- Media señales debido a su localización constitutiva en microdominios de membrana ("rafts lipídicos"):

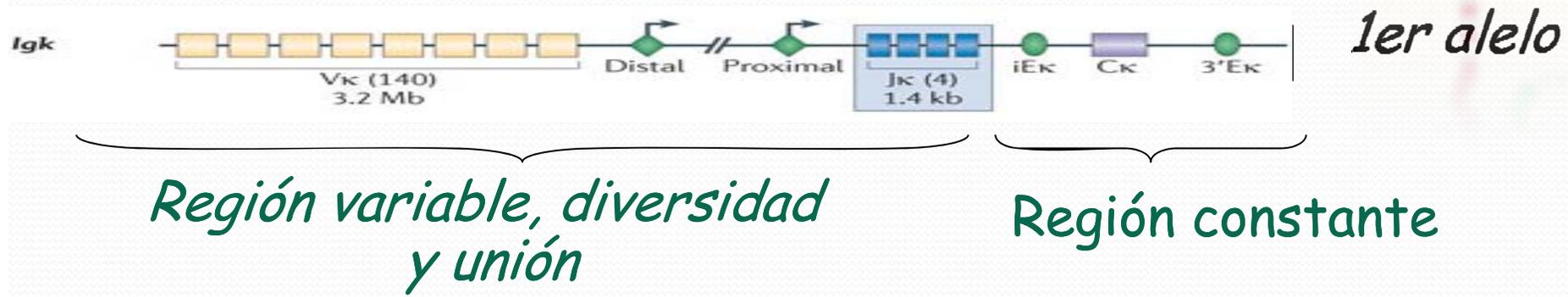
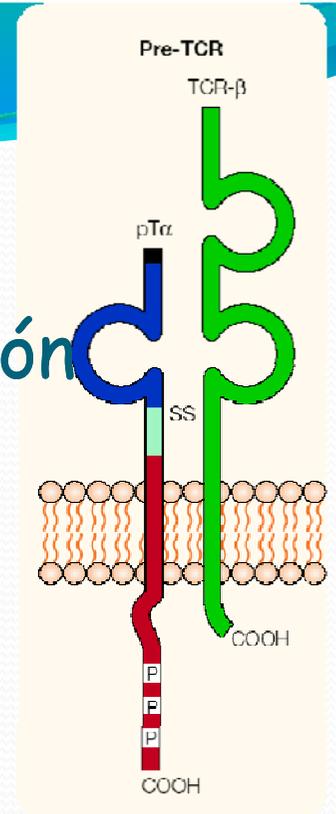
- Fosforilación y degradación de recombinasas (*RAG1 y 2*), asegura que no ocurra más reordenamiento de  $\beta$  (*exclusión alélica*)
- Favorece reordenamiento de la cadena  $\alpha$
- Proliferación y da paso a timocitos Doble Positivos (co-expresión de CD4 y CD8)



# Ontogenia de Linfocitos T

Pre-T: expresión de la cadena  $\beta$  y formación de pre-TCR

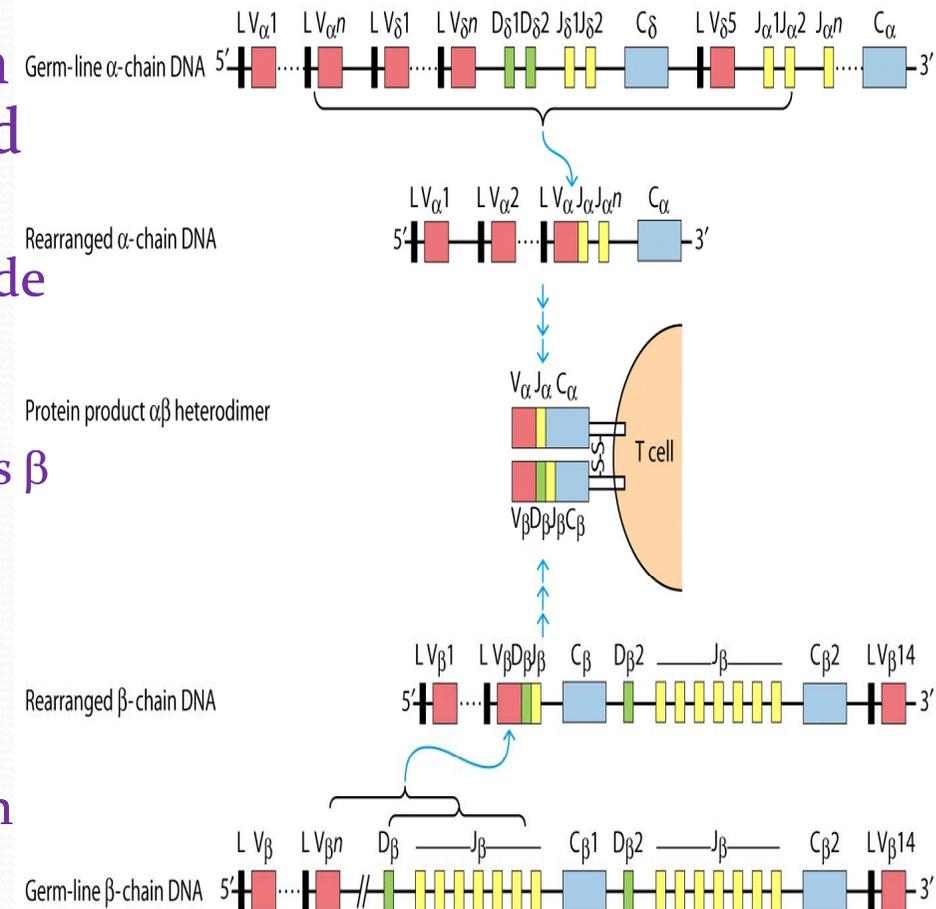
La expresión del pre-TCR determina (cadena  $\beta$  + pT $\alpha$ ): reordenamiento de la cadena  $\alpha$  del TCR (receptor del linfocito T) Doble negativos (DN= CD4-/CD8-)



# Ontogenia de linfocitos

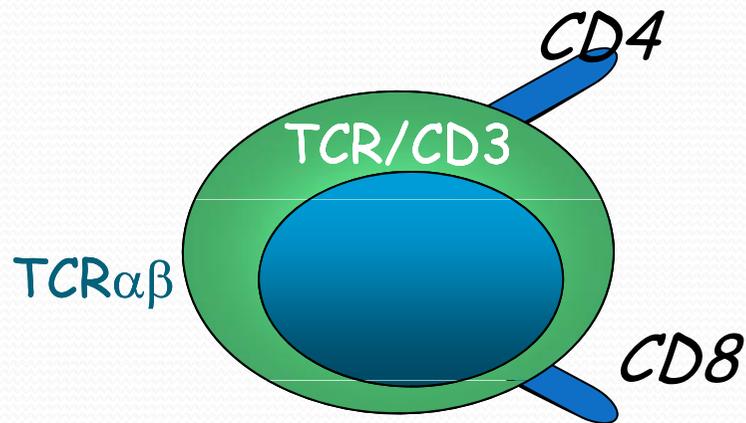
## • Resumen

- Mecanismos involucrados en la generación de la diversidad (aproximadamente  $10^{11}$ )
  - Diversidad en las posibilidades de combinación
    - Familias de genes V, D y J
    - Combinaciones entre las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$  (en el caso de linfocitos T) o pesadas y livianas (en el caso de linfocitos B)
    - Mediado por las Recombinasas (Rag1 y Rag2)
  - Diversidad en los sitios de unión de los genes mediado por la enzima deoxirribonucleotil transferasa terminal o TdT

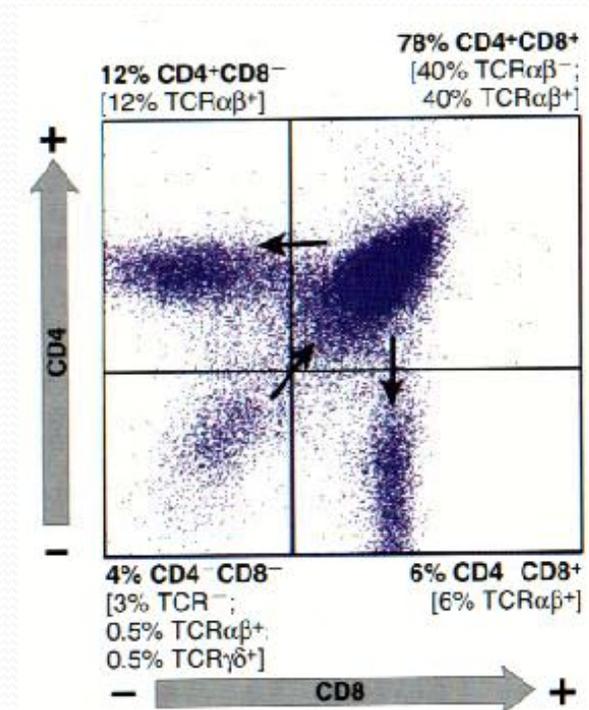


# Ontogenia de Linfocitos T

## Timocito doble positivo (DP):

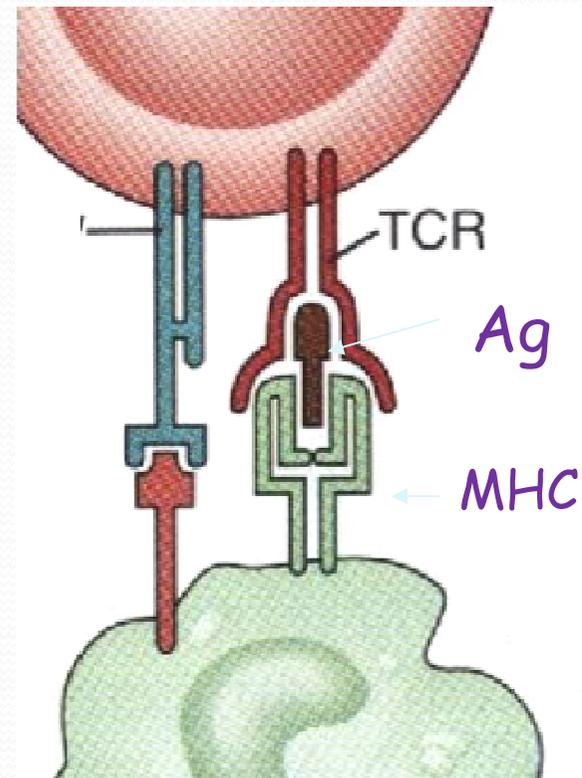


Expresan TCR y además CD4 y CD8 (Doble Positivas) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo



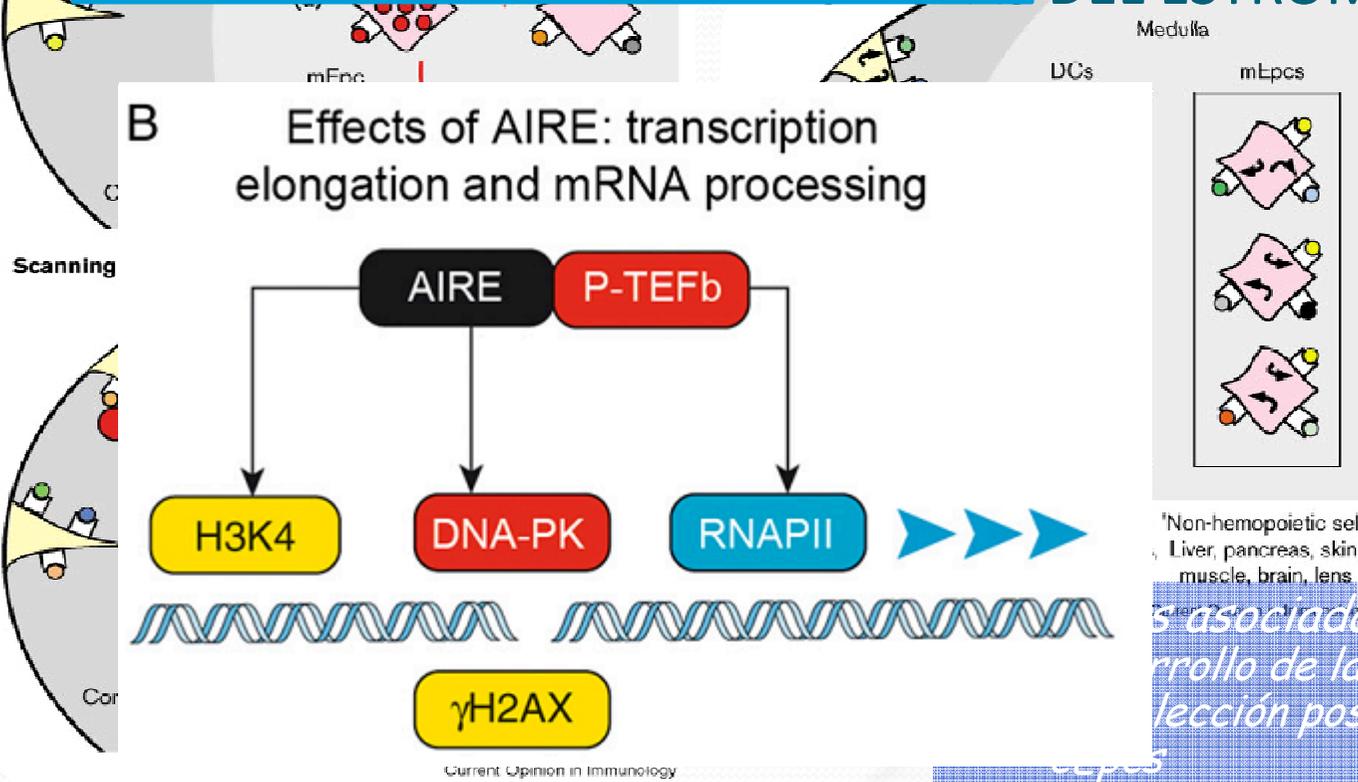
# Ontogenia de Linfocitos T

Control de calidad:  
Capaz de interactuar  
con MHC propia (base  
de toda respuesta  
inmune) y de esta  
manera reconoce los  
antígenos presentados



*AIRE es expresado en las mTECs, promueve unión de DNAPk y ARNpolII, al ADN y es un factor de elongación*

# Origen de linfocitos T: DEL ESTROMA TÍMICO

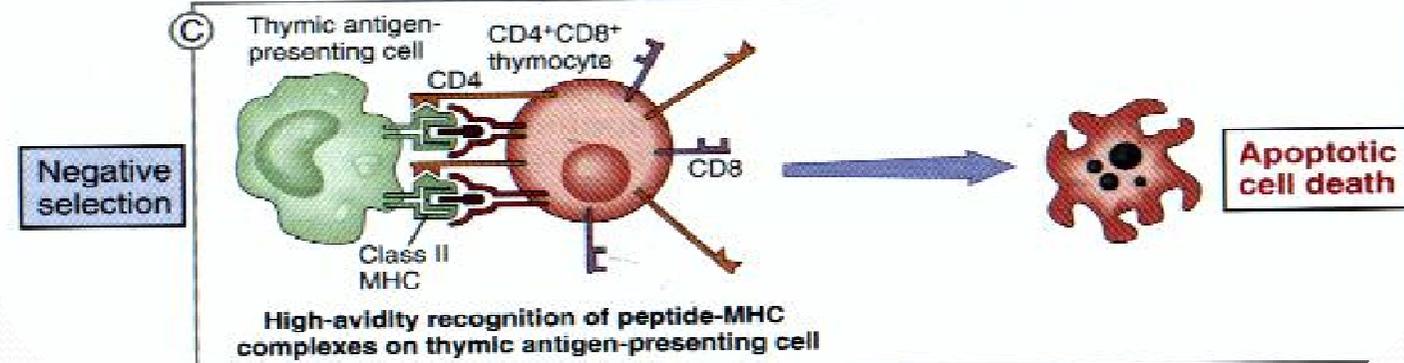
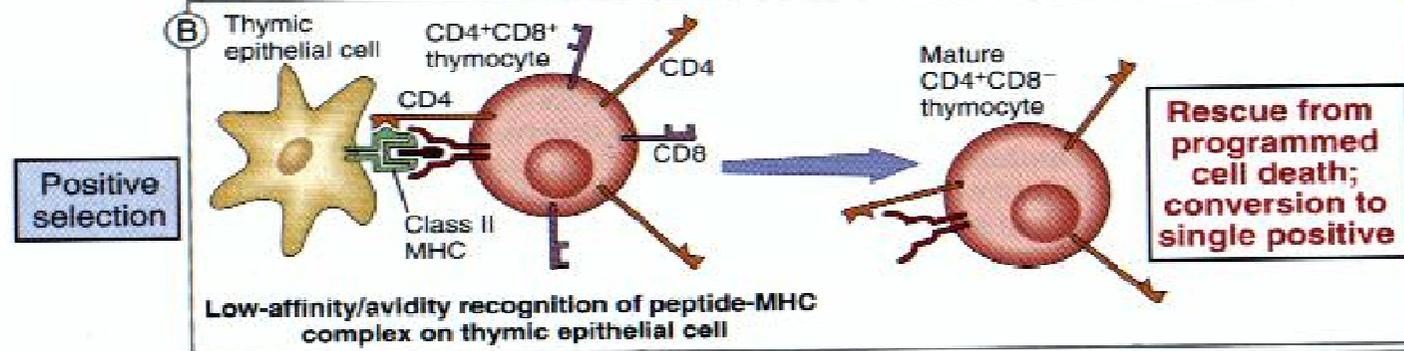
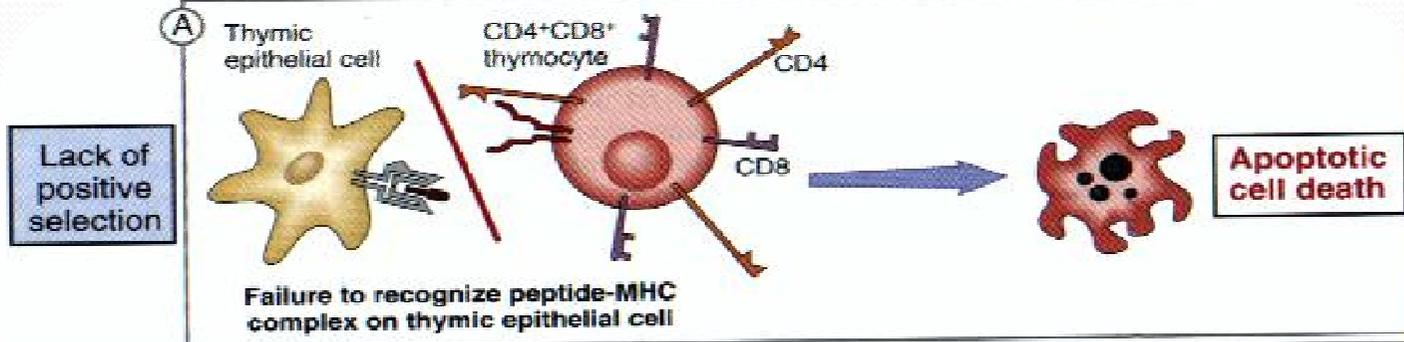


*Las DC expresan bajos niveles de AIRE y además tienen la capacidad transportar Ag propios directamente desde la periferia*

*Tienen la capacidad de expresar diversas proteínas de los tejidos periféricos vía endógena= Mediado por **AIRE** (autoimmune regulator) que es un activador transcripcional expresado en TEC de la medula*

*asociadas a las ETC  
control de las células DN a DP  
selección positiva regulada por las  
células  
**Macroautofagia**  
Luego migran hacia la región córtico-medular y la médula, maduran a SP  
La tolerancia central, es mediada principalmente por las mETC y células dendríticas tímicas residentes del timo*

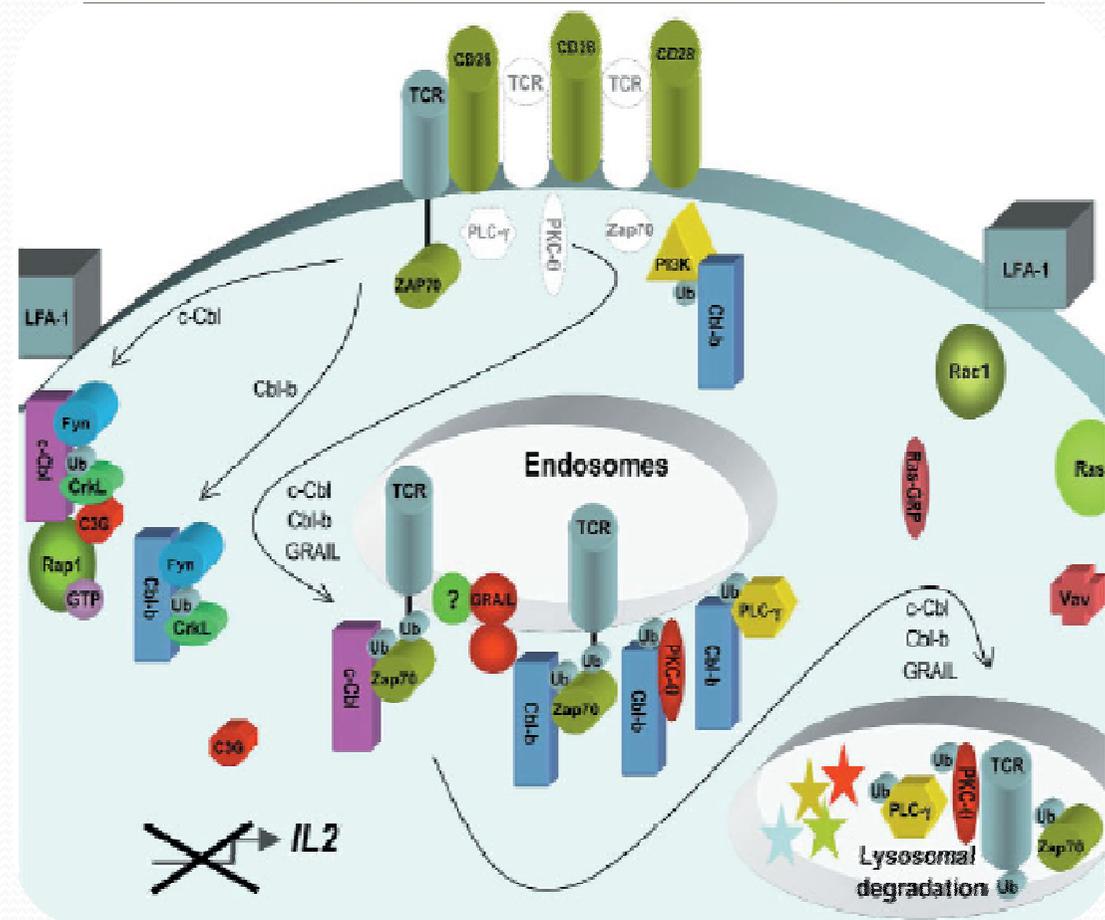
# Ontogenia de Linfocitos T: Selección positiva y negativa

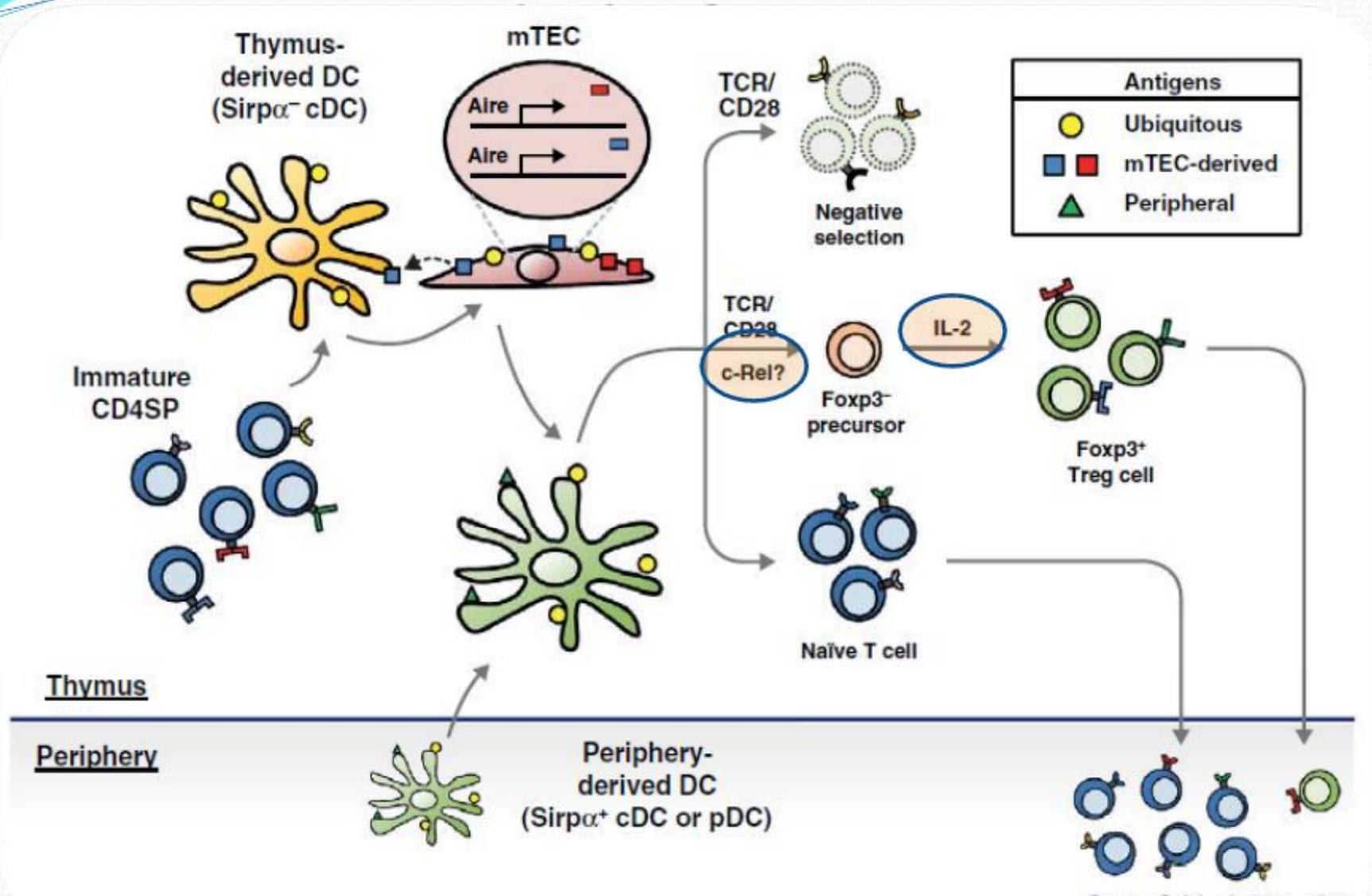


Muerte o anergia

# Ontogenia: MECANISMOS DE SELECCIÓN

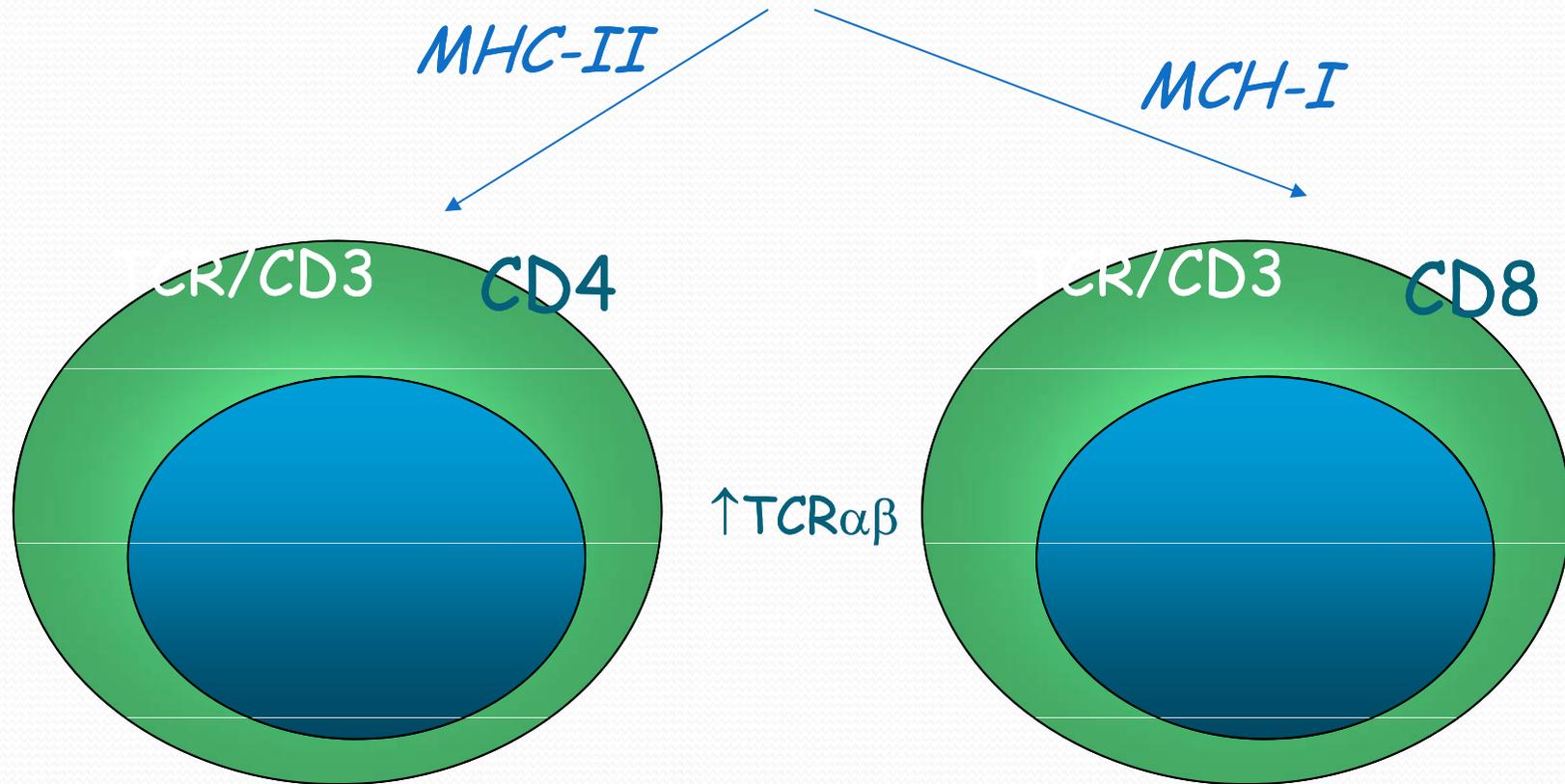
- Mecanismos involucrados en la anergia
  - Reciclaje acelerado del TCR, por ubiquitinación mediado por la fosforilación constitutiva de Cbl (ligasa de ubiquitina)
  - Proceso reversible





# Ontogenia de Linfocitos T

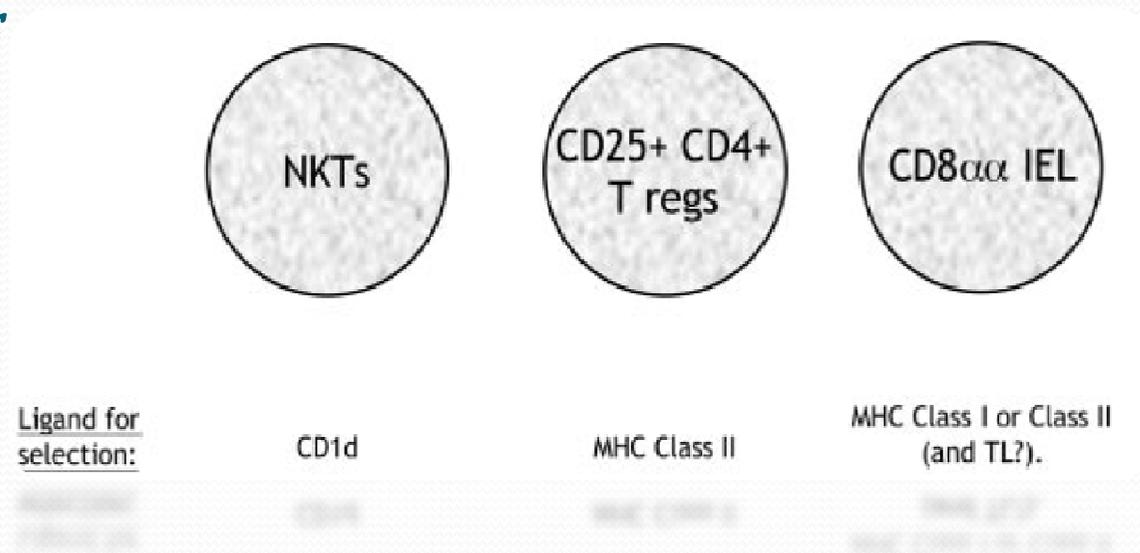
## Linfocito T maduro:

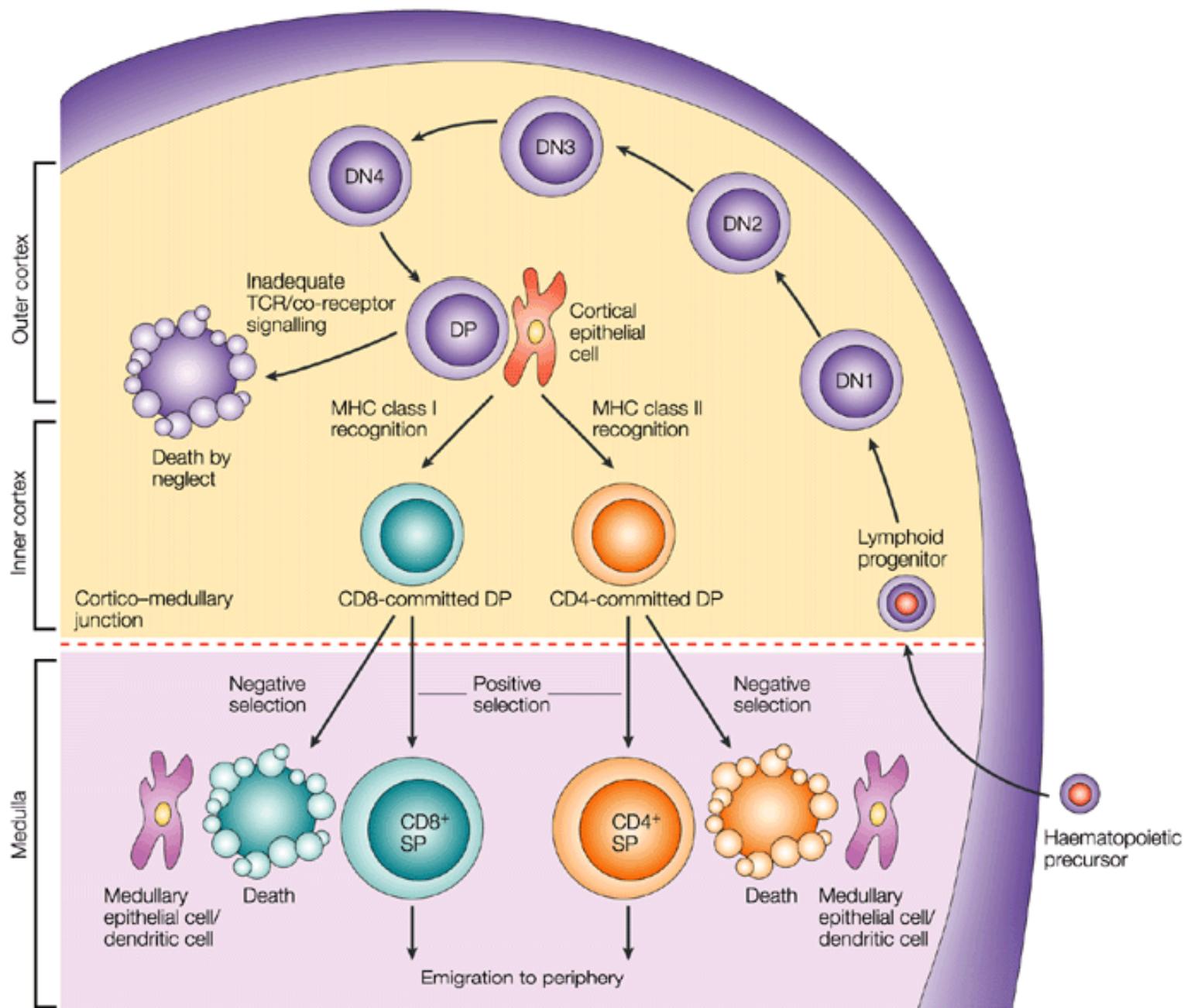


# Ontogenia de linfocitos: DESARROLLO DE CÉLULAS T REGULADORAS

- Selección positiva por agonista

*Tregs: específicas contra antígenos propios  
Su desarrollo depende: fuerza de la señal, tipo de célula del estroma tímico (cTEC??), moléculas accesoria (B-7, CD28), IL-2, expresión de FoxP3*

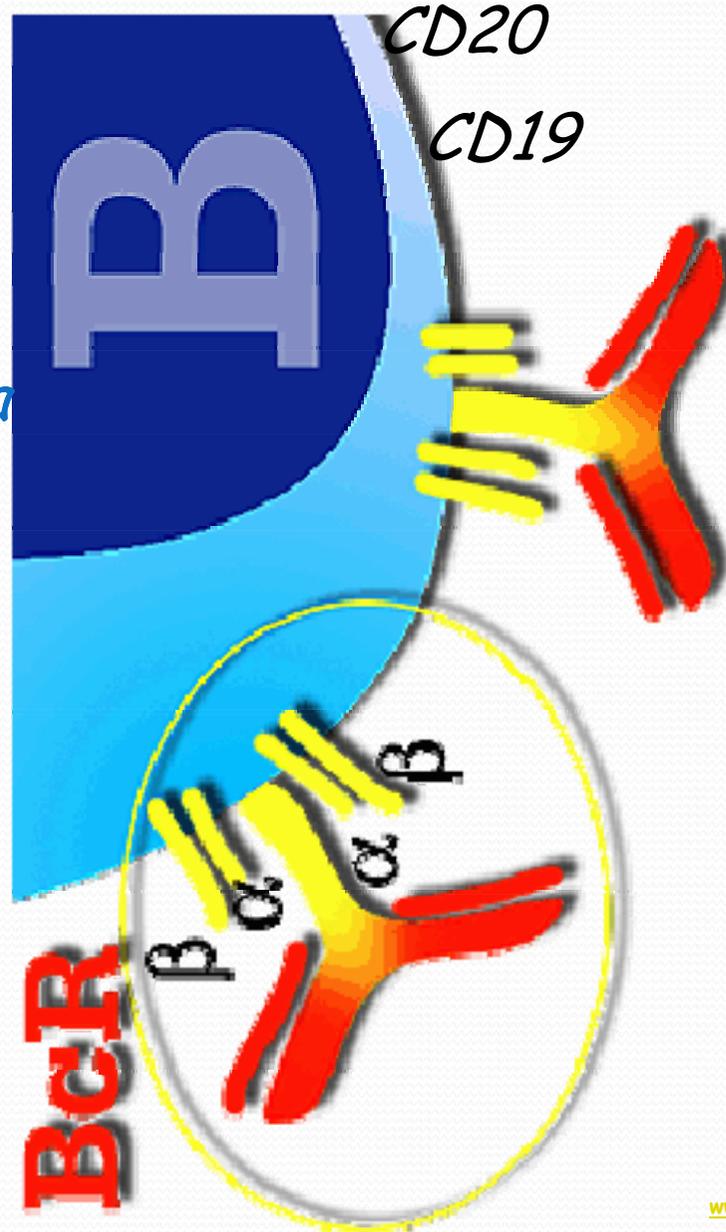




# Ontogenia de los linfocitos B

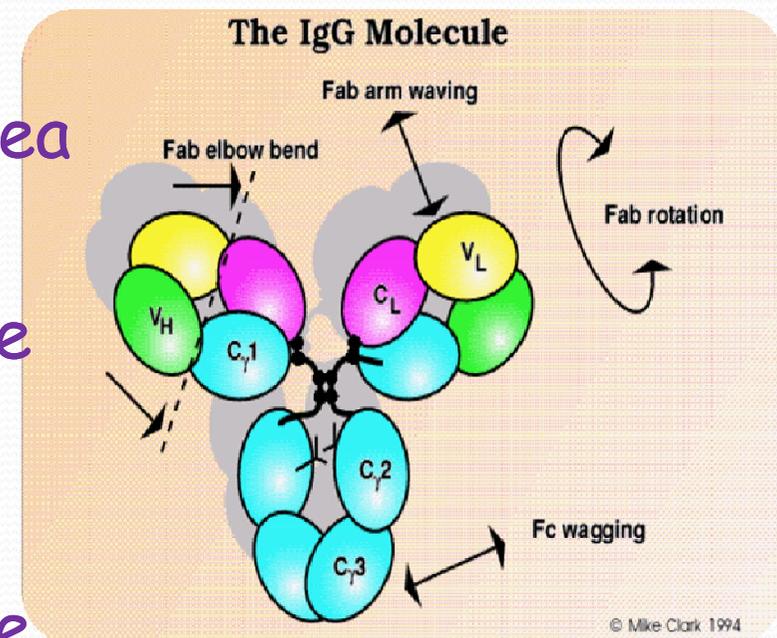
**BCR:**

*Inmunoglobulina  
(IgM e IgD) +  
cadenas  $\alpha$  y  $\beta$   
(comunicación  
intracelular)*

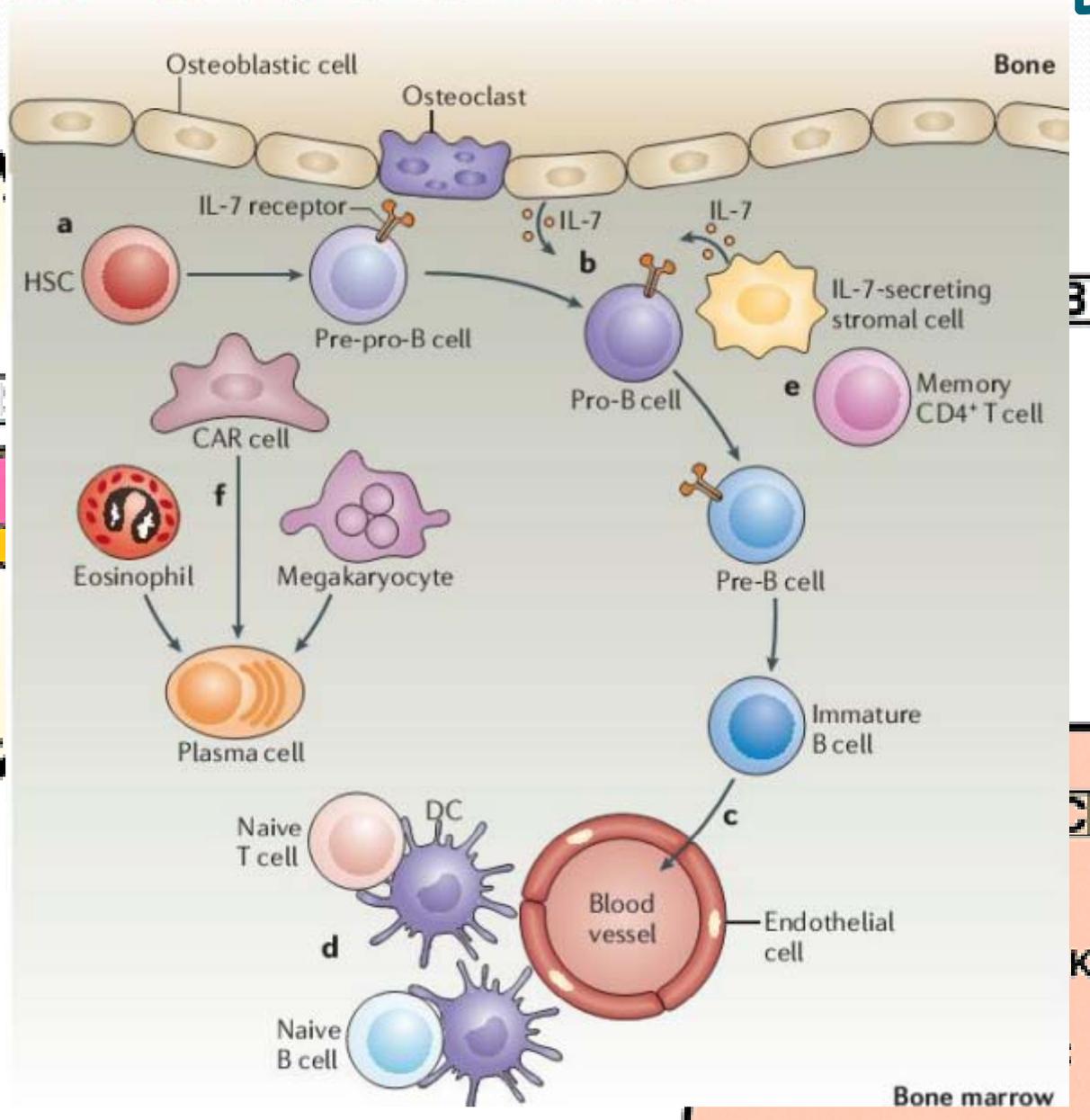
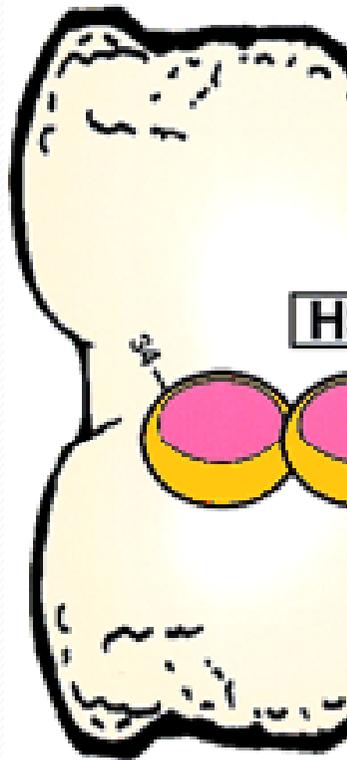


# Ontogenia de linfocitos B

- Su desarrollo se inicia en el hígado fetal 8<sup>va</sup>-9<sup>na</sup> semana y luego continúa en la médula ósea
- El repertorio de células se genera por recombinaciones de segmentos de los genes del receptor de linfocito B (BCR)
- Están sujetos a mecanismos de selección positiva y negativa



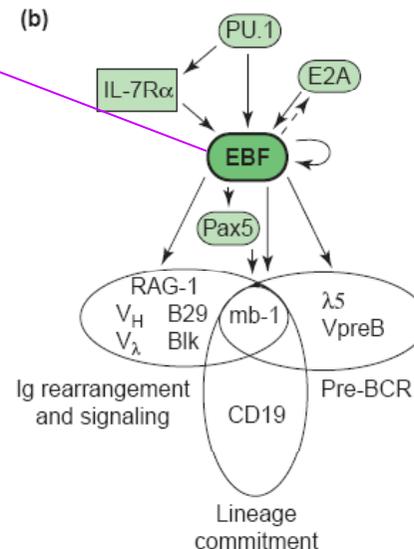
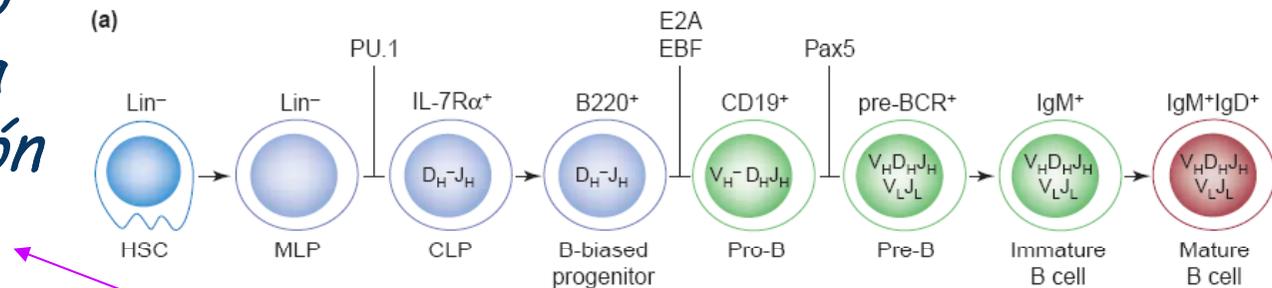
# Ontogenia: LINFOCITOS B



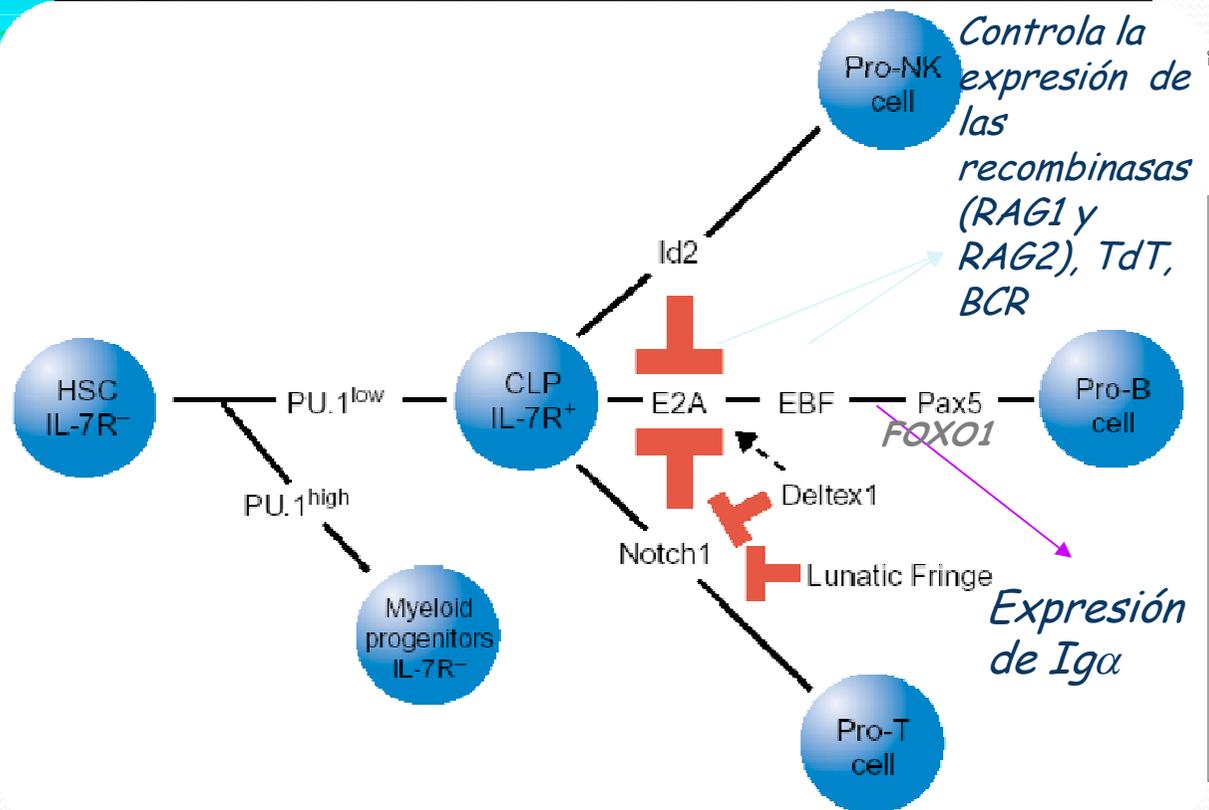
# Ontogenia de linfocitos B

*Regula el acceso de la maquinaria de recombinación del DNA*

*Ikaros y EBF1 (early B cell factor 1) media remodelamiento de los nucleasomas seguido por la monometilacion histone H3 lysine 4 (H3K4) que se requieren para la entrada de factores de transcripción*

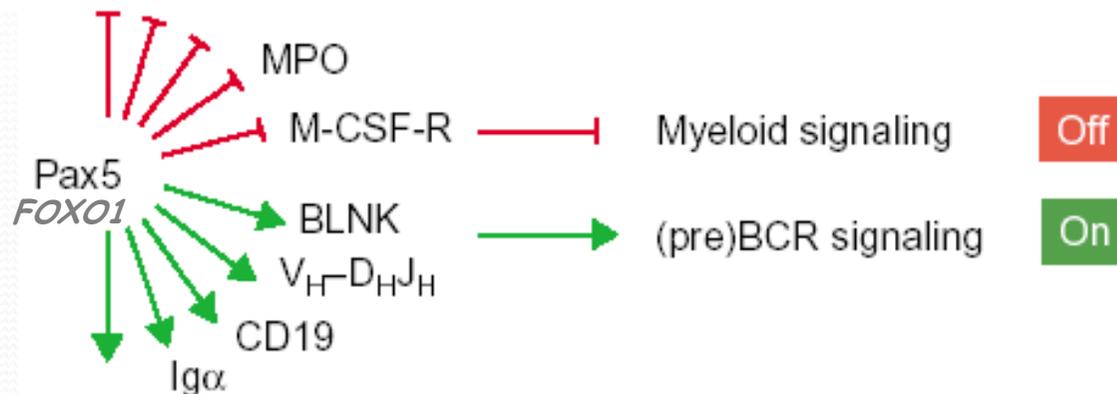


*EBF1, promueve la expresión de CD79*



## Pax5 juega un papel importante en comisionar el desarrollo hacia células B

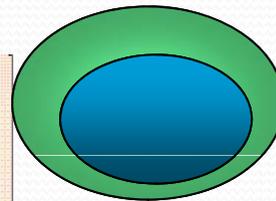
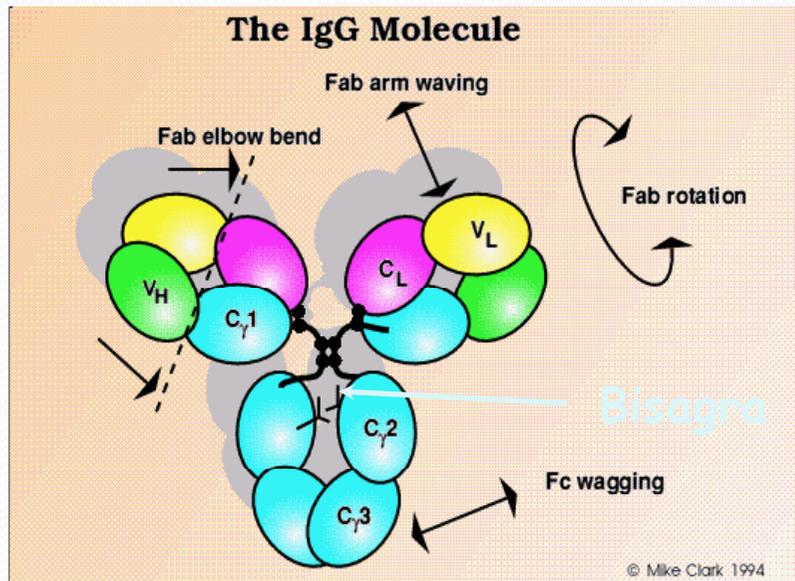
- Ratones *Pax5*<sup>-/-</sup> se arresta el desarrollo de los linfocito B (pro-B)
- Suprime expresión de M-CSFR y Notch-1
- Media expresión de CD19
- Requerido para el reordenamiento IgH
- De los 32 genes inducidos por Pax5, 15 son exclusivos de Linfocito B



# Ontogenia de Linfocitos B

pro-B:

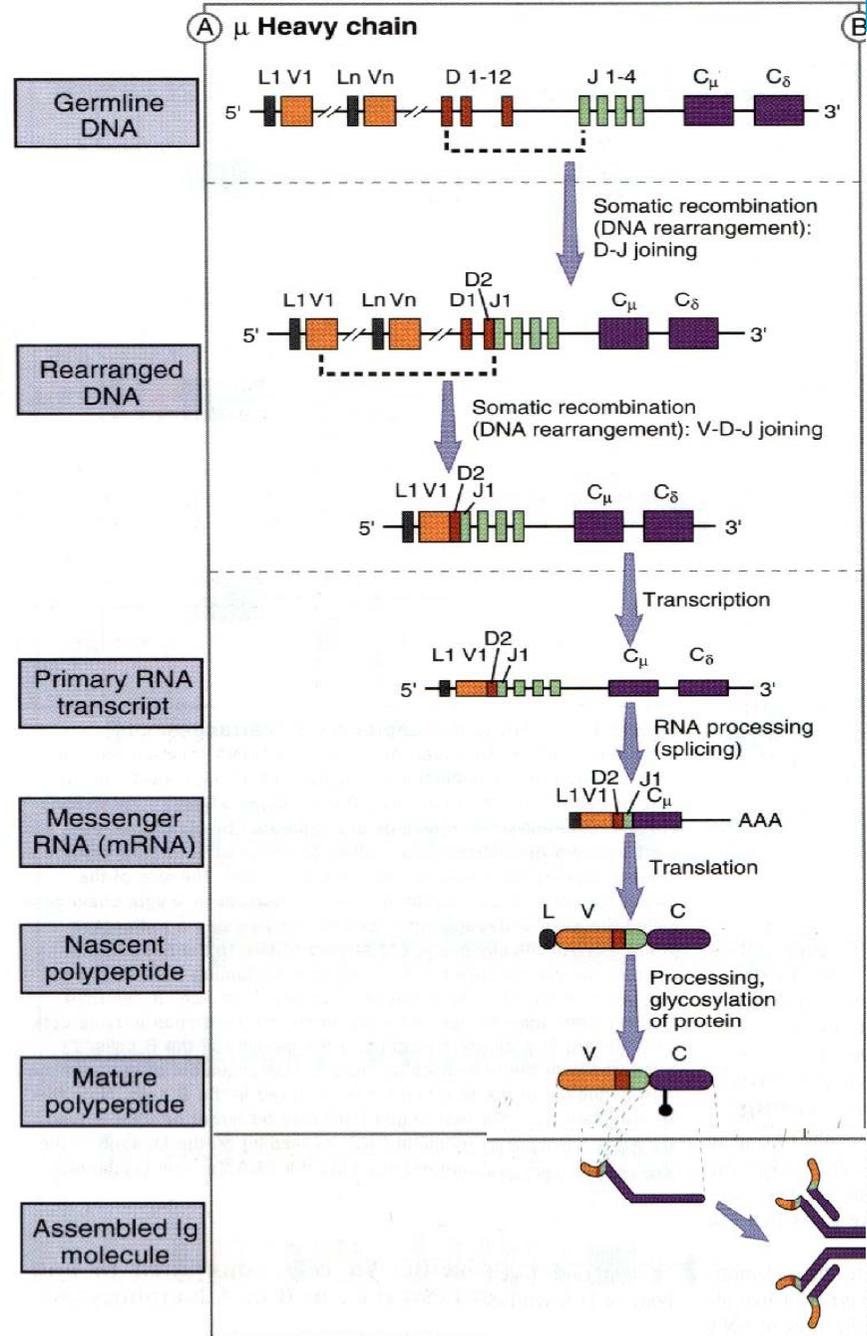
Reordenamiento genético  
de la cadena pesada de las  
inmunoglobulinas : cadena  $\mu$



IL-7R  
IL-3R

# Reordenamiento de los genes que codifican para las inmunoglobulinas

Dos alelos:  
 el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: EXCLUSIÓN ALÉLICA

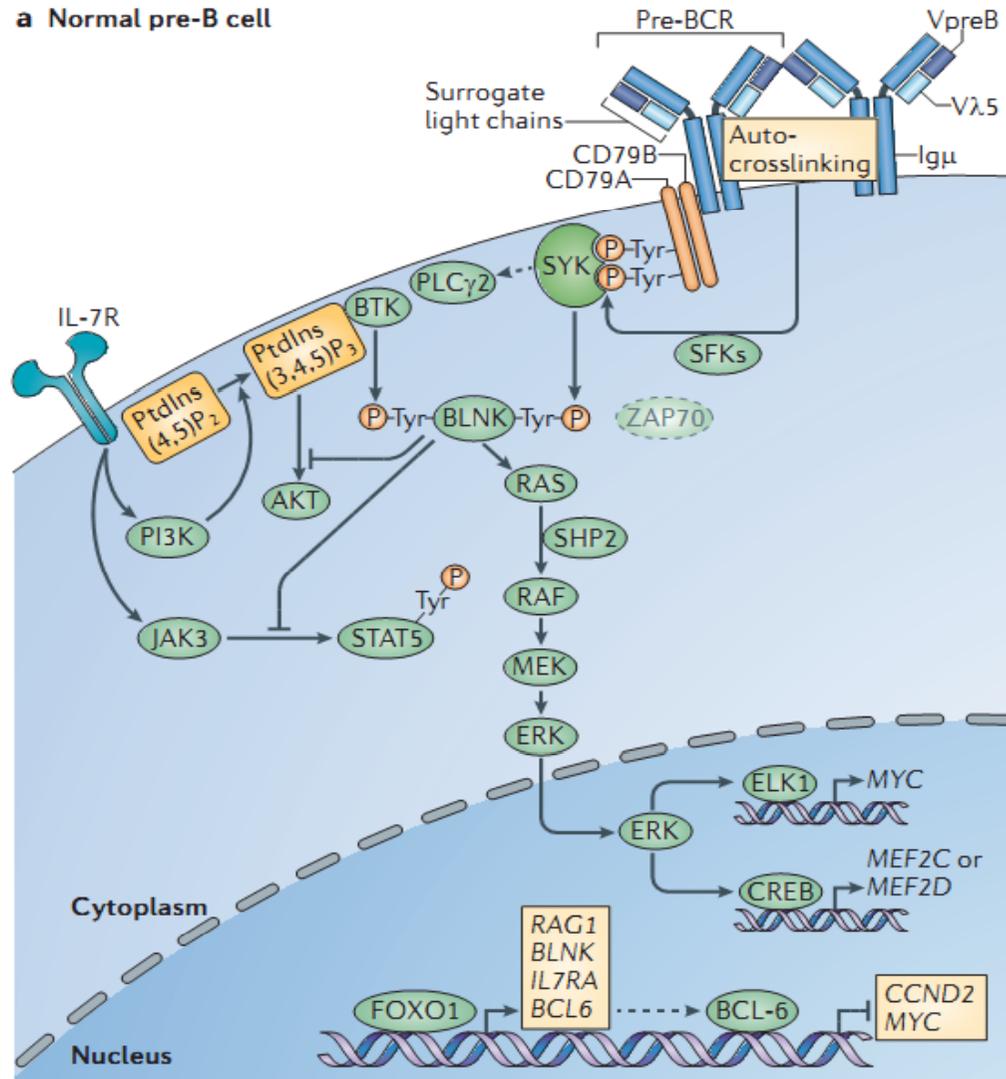
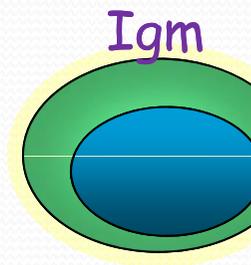


# Ontogenia de Linfocitos B

pre-B:

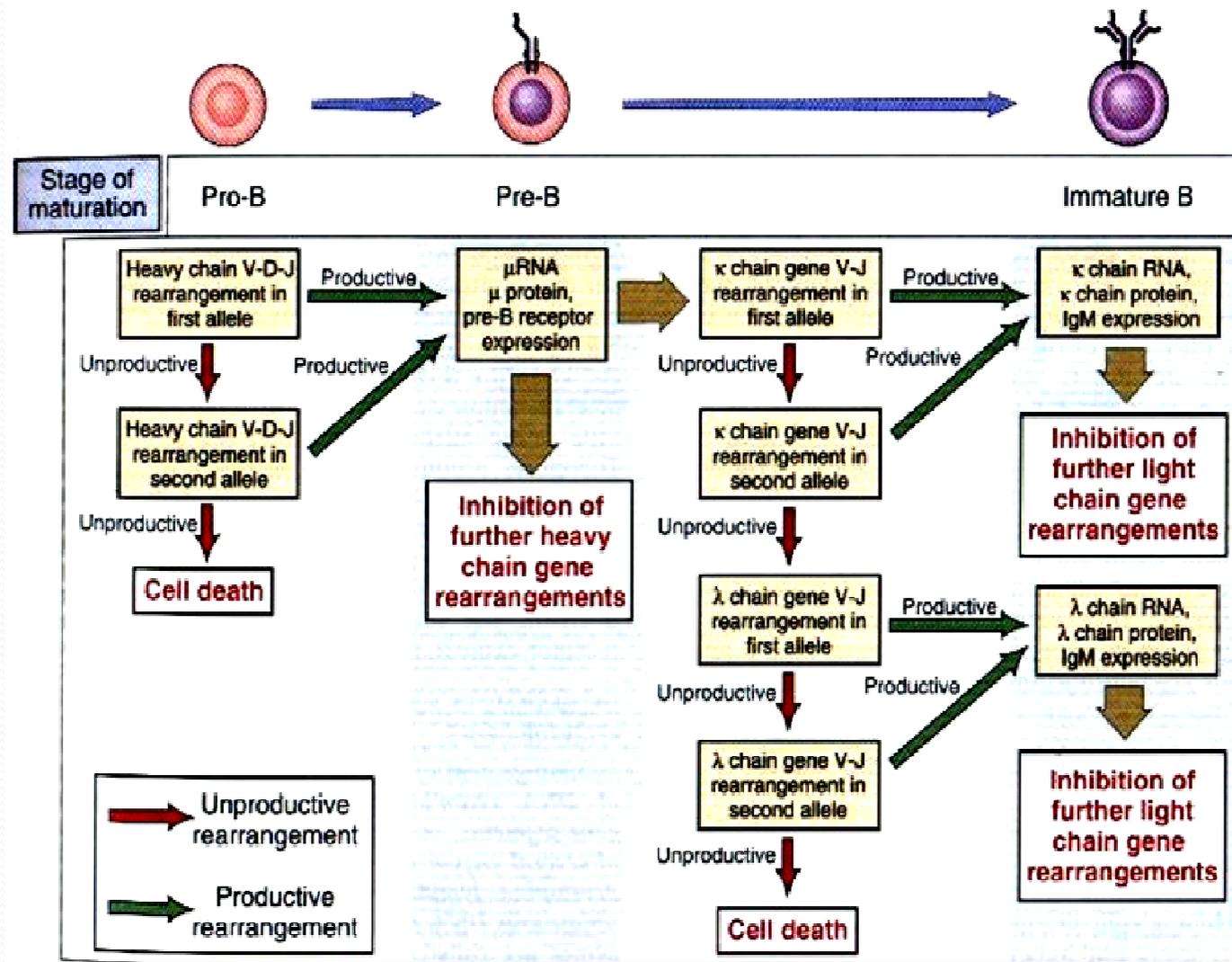
-Expresión de la cadena pesada de la Ig ( $\mu$ ), en el citoplasma y membrana (pre-BCR) asociado con cadenas sustitutivas (SI) (VpreB y  $\lambda 5$ )

Linfocito B inmaduro:



# Ontogenia de Linfocitos B

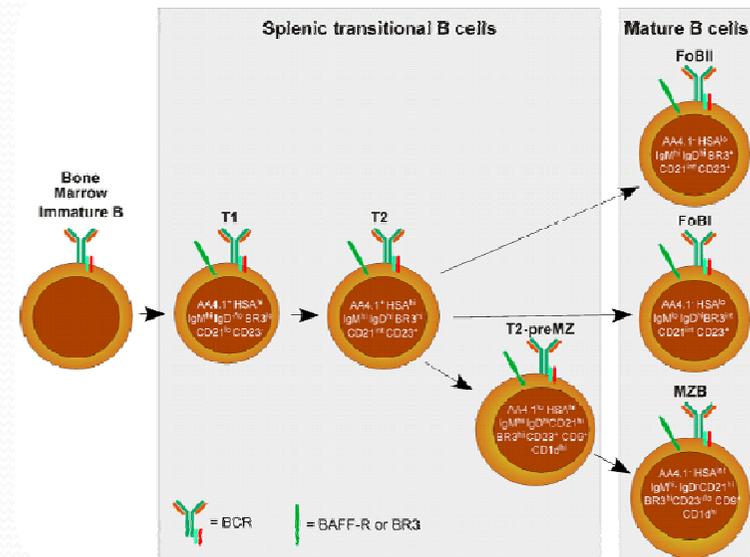
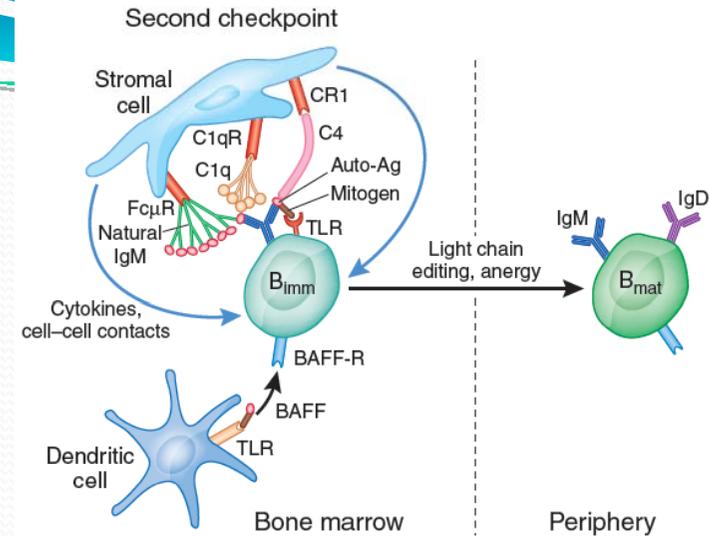
- Cadena pesada  $\mu$
- Cadenas liviana:
  - $\kappa$
  - $\lambda$





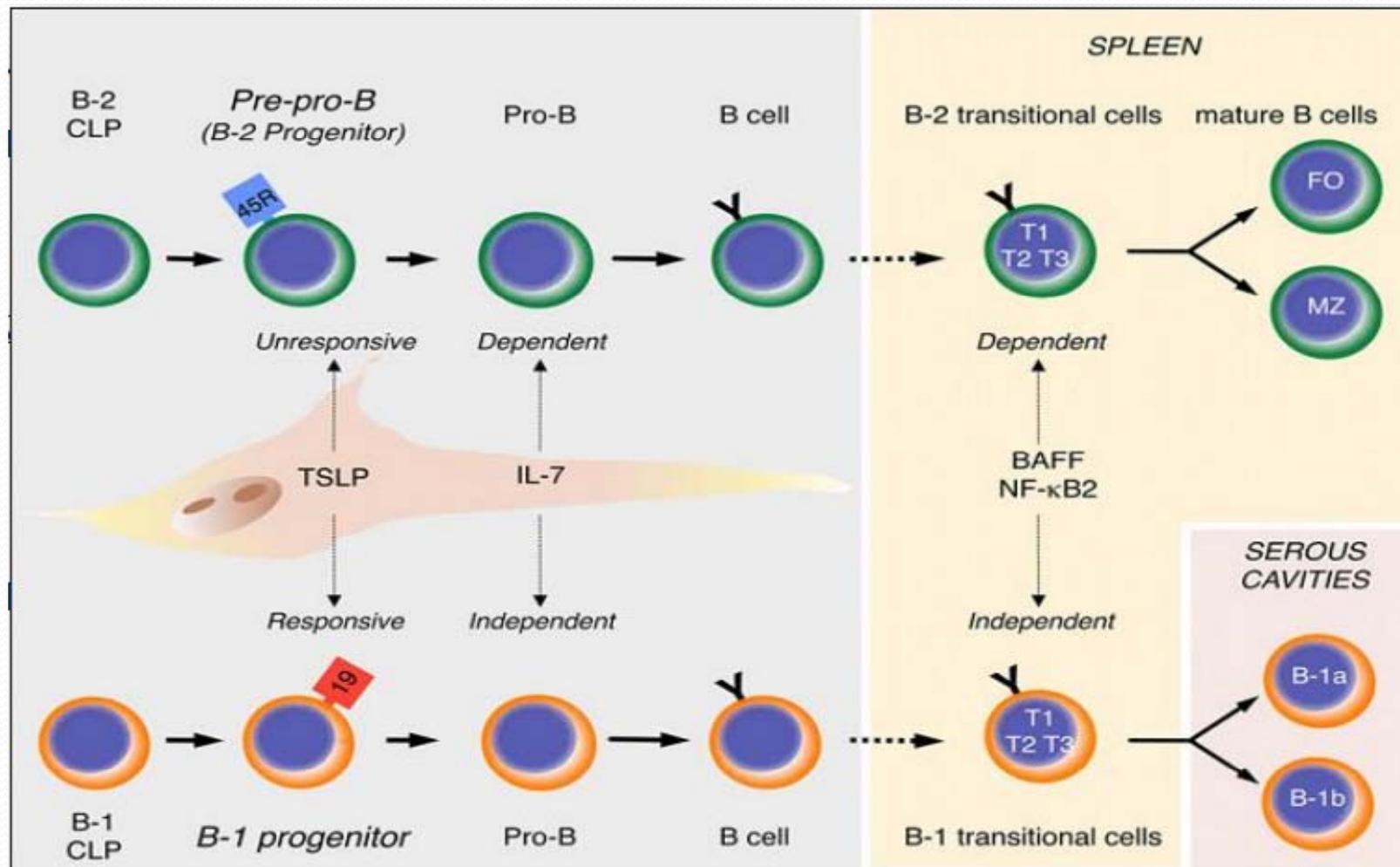
# Ontogenia: LINFOCITO B

- ▶ Emigran de la MO (ya evaluadas?: selección positiva)
  - Estadíos:
    - T1: no expresa o tiene bajos niveles de IgD
      - Fase donde ocurre la selección negativa y la gran mayoría muere (autoreactivas) o re-editan BCR
      - Activación del BCR=apoptosis
    - T2: entran y sobreviven en el bazo y co-expresan IgM/IgD, CD21, CD23



*T2 se hace mas resistente a la apoptosis*

# Ontogenia: LINFOCITO B



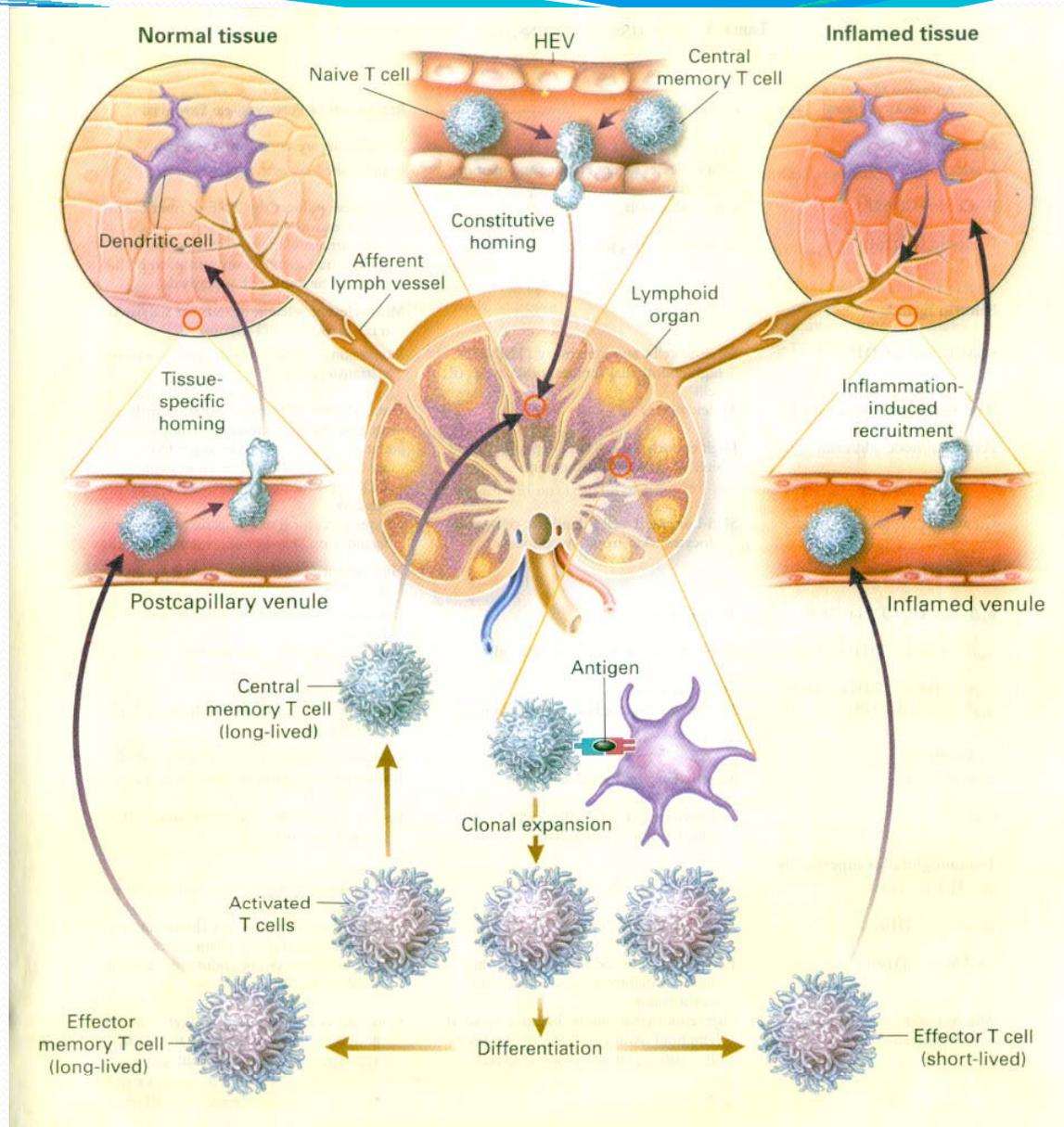
# Ontogenia de linfocitos B: Subpoblaciones en la periferia

- B-1:
  - CD5+
  - Ubicadas preferencialmente en cavidad peritoneal
  - Potencialmente autorreactivas
  - No son eliminadas por antígenos propios
- B-2
  - Predominan en la periferia
  - CD5-

Surface marker	Peripheral B cell subset					
	T1	T2	MR/B-2	B-1a	B-1b	MZ
IgM	+++	++	+	+++	+++	+++
IgD	+/-	+	+++	+/-	+/-	+/-
493/AA4.1	++	+	-	-	-	-
B220(6B2)	+	++	+++	+/++	+/++	++
CD21	+/-	+	++	+/-	+/-	+++
CD23	-	+	++	++/- <sup>a</sup>	++/- <sup>a</sup>	-
HSA(J11d/30F1)	+++	++	+	++	++	++
CD43	+/-	-	-	++/- <sup>a</sup>	++/- <sup>a</sup>	
CD5	-	-	-	+	-	-
CD11b/Mac-1	-	-	-	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	-

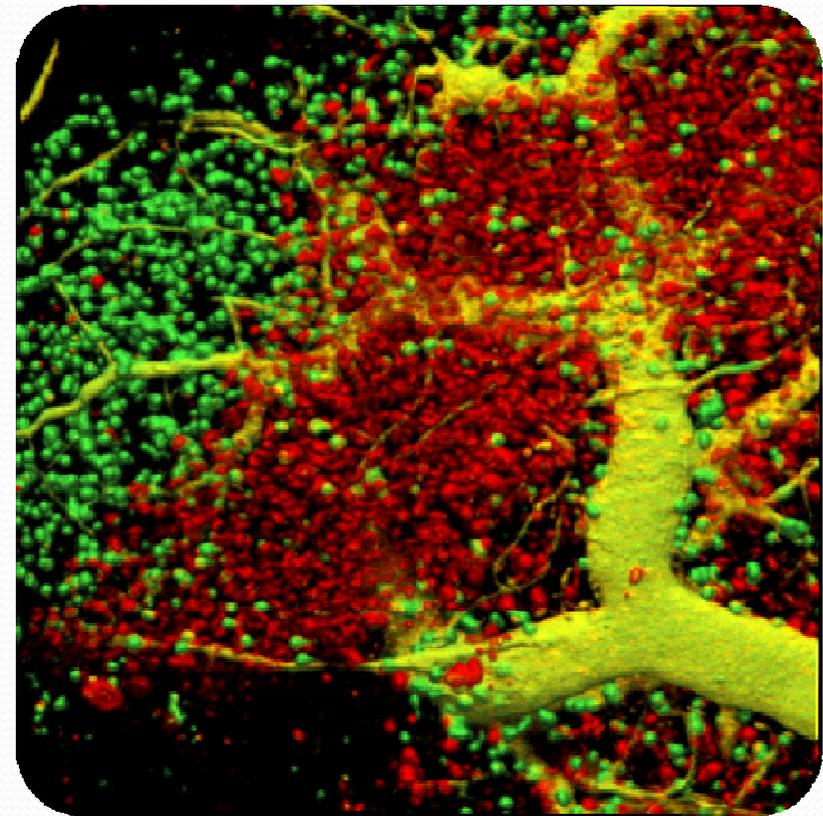
<sup>a</sup> part are ++ and part are --.  
<sup>b</sup> Only in peritoneal cavity; B-1 cells are CD11b/Mac-1<sup>-</sup> in spleen.  
 T1, T2 = transitional (maturing) B cells.  
 MR = mature recirculating B cells.  
 MZ = marginal zone B cells.

*¿Que eventos regulan la migración y alojamiento dentro de un tejido o de un tejido a otro?*



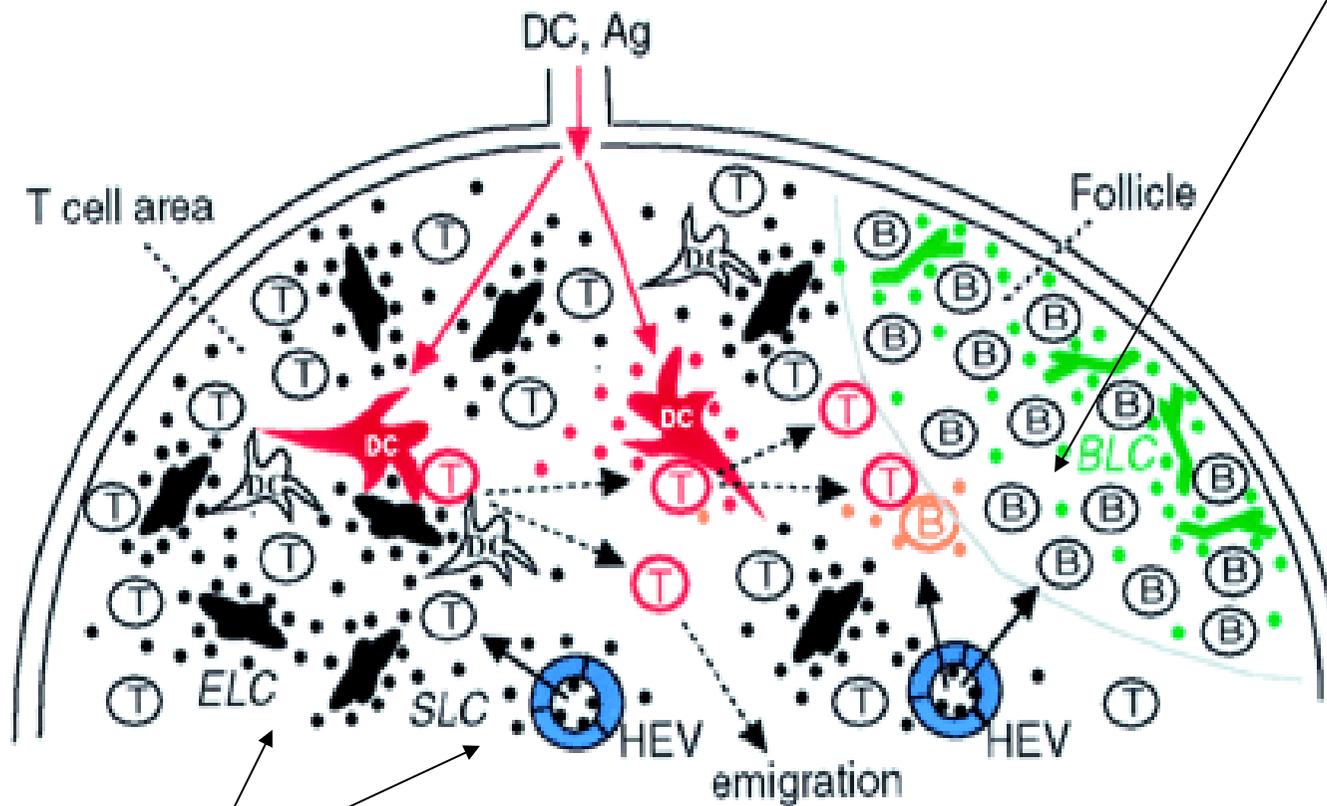
# Recirculación y alojamiento de los leucocitos: ¿De qué depende?

- Qué determina esta distribución y tráfico diferencial?
  - Expresión y activación diferencial de receptores de quimiocinas y de integrinas
- Interacciones entre las células endoteliales, la matriz extracelular, quemokinas y las moléculas de adhesión



# Migración celular: QUEMOKINAS

CXCR5: expresado sobre Th, permitir interacción con células B

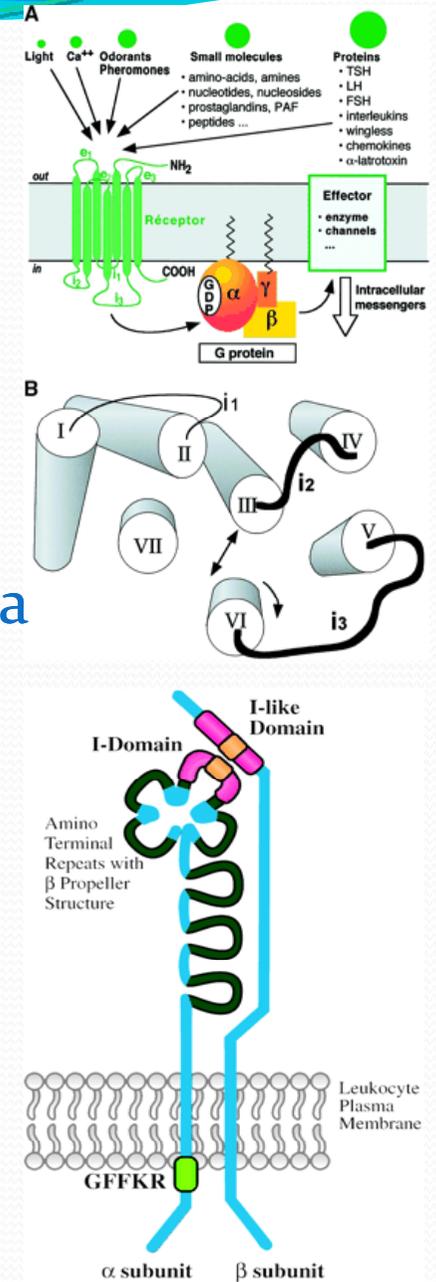


•Durante la activación inicial los linfocitos pierden el receptor CCR7 y adquieren otros, lo que le permite salir hacia los tejidos inflamados

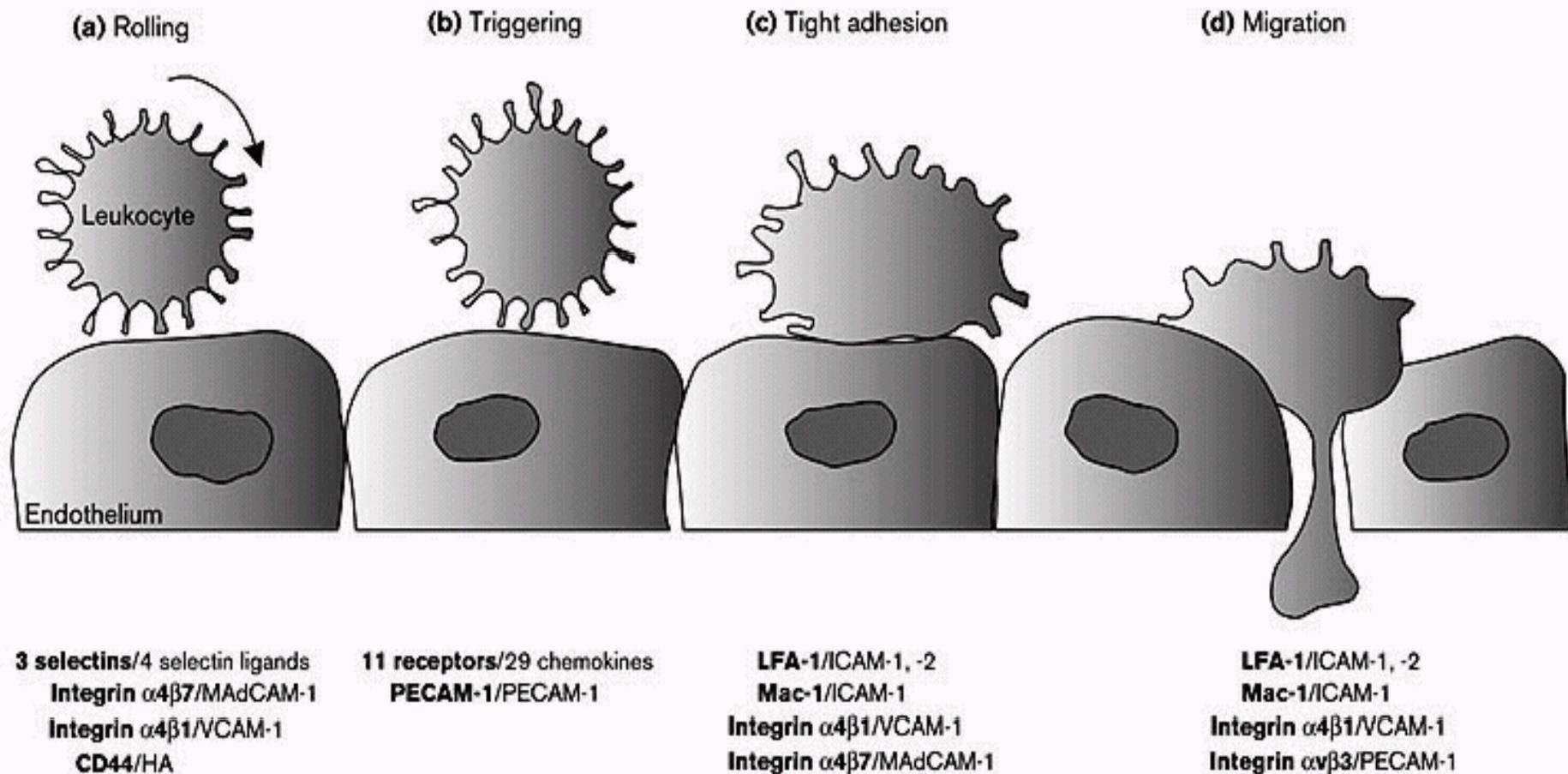
CCR7:  
Expresado sobre los linfocitos T "naive" y DC maduras

# Migración de leucocitos: ELEMENTOS QUE PARTICIPAN

- Quemokinas y sus receptores
  - Interleukinas con capacidad quimiotáctica
- Integrinas
- Cadherinas
- Selectinas
- ICAM

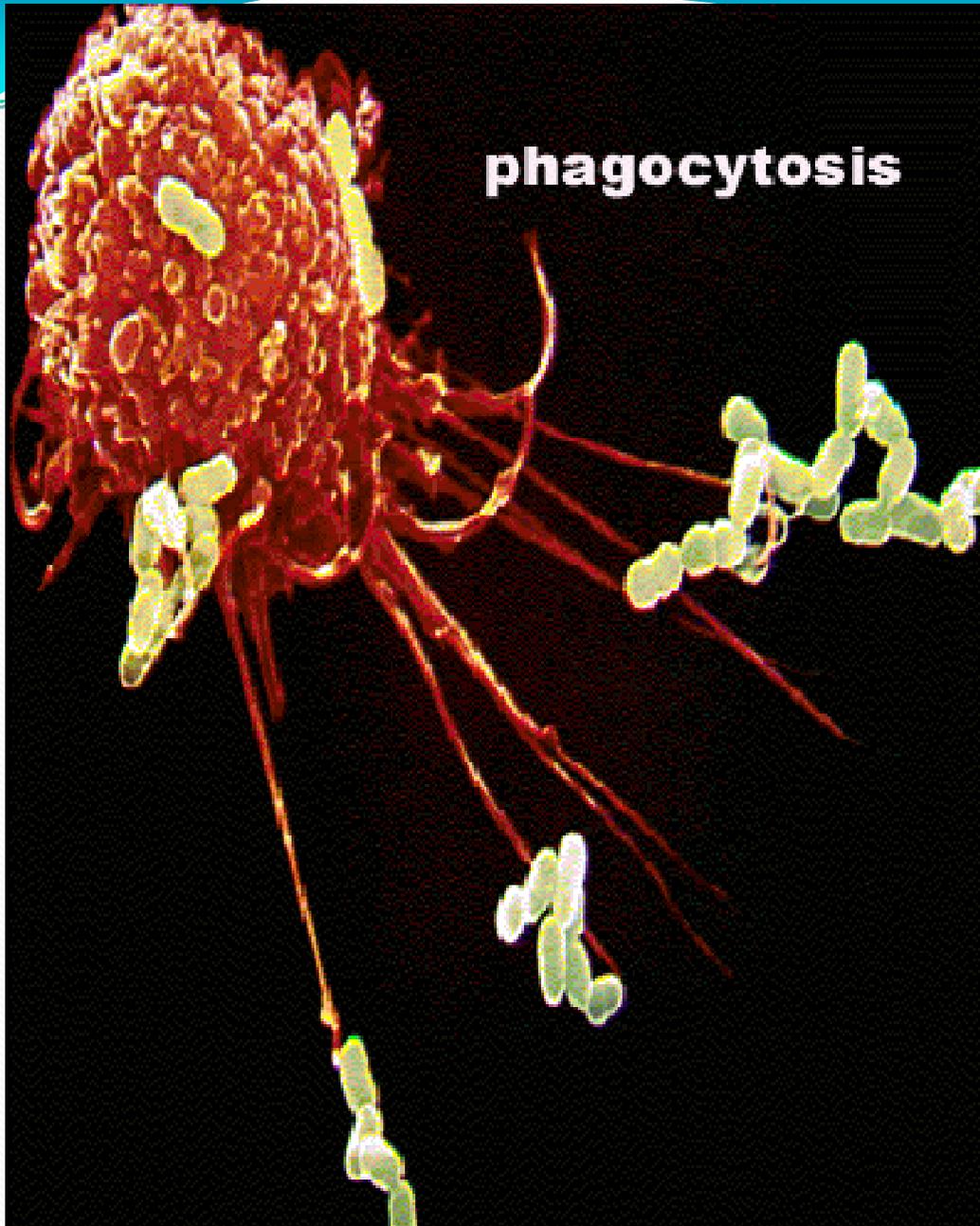


# Una vez maduras las células migran a través de las vénulas endoteliales altas hacia los órganos linfoides secundarios



# Órganos secundarios

- Función:
  - Facilitan el trabajo de los linfocitos
  - Sitios de encuentro entre células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos
  - Proveen el microambiente adecuado para la expansión de linfocitos T
  - Optimizan la activación de linfocitos B “naive”



Todo el proceso de ontogenia permite a los linfocitos estar preparados para reconocer de manera específica a los antígenos extraños