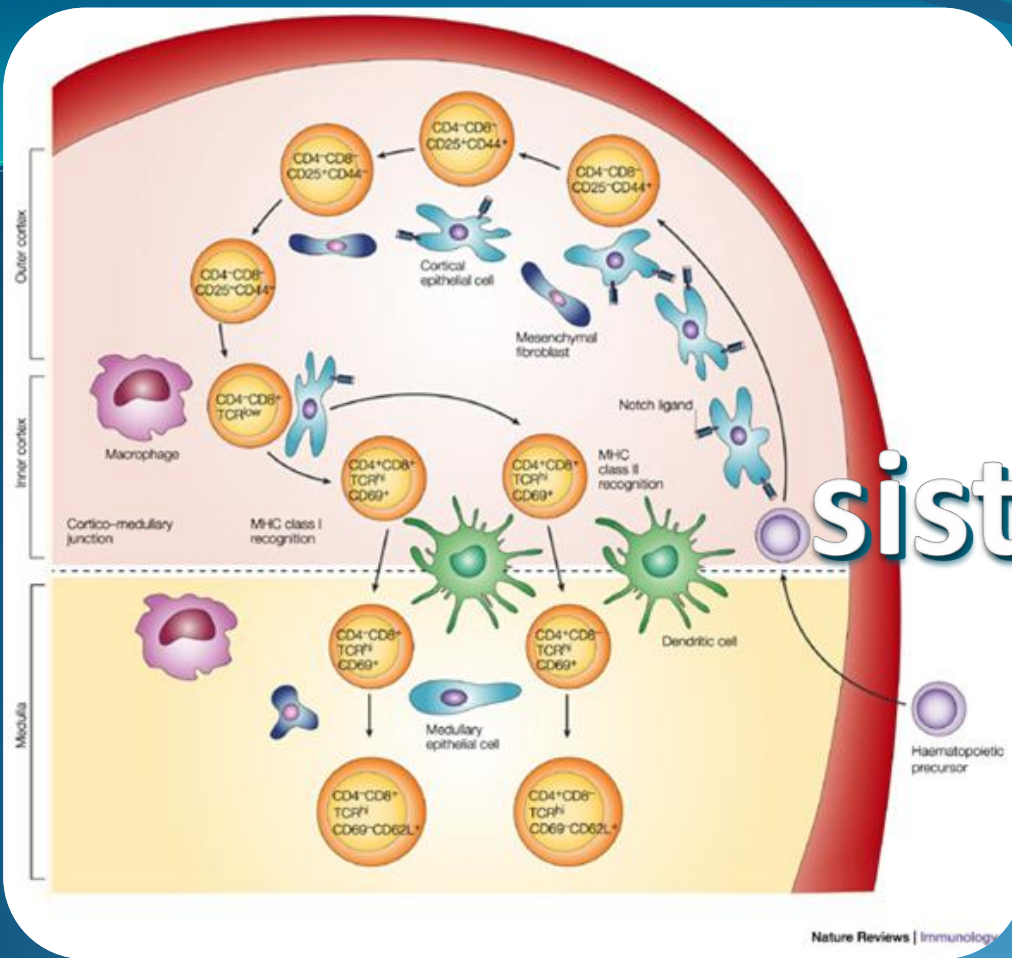


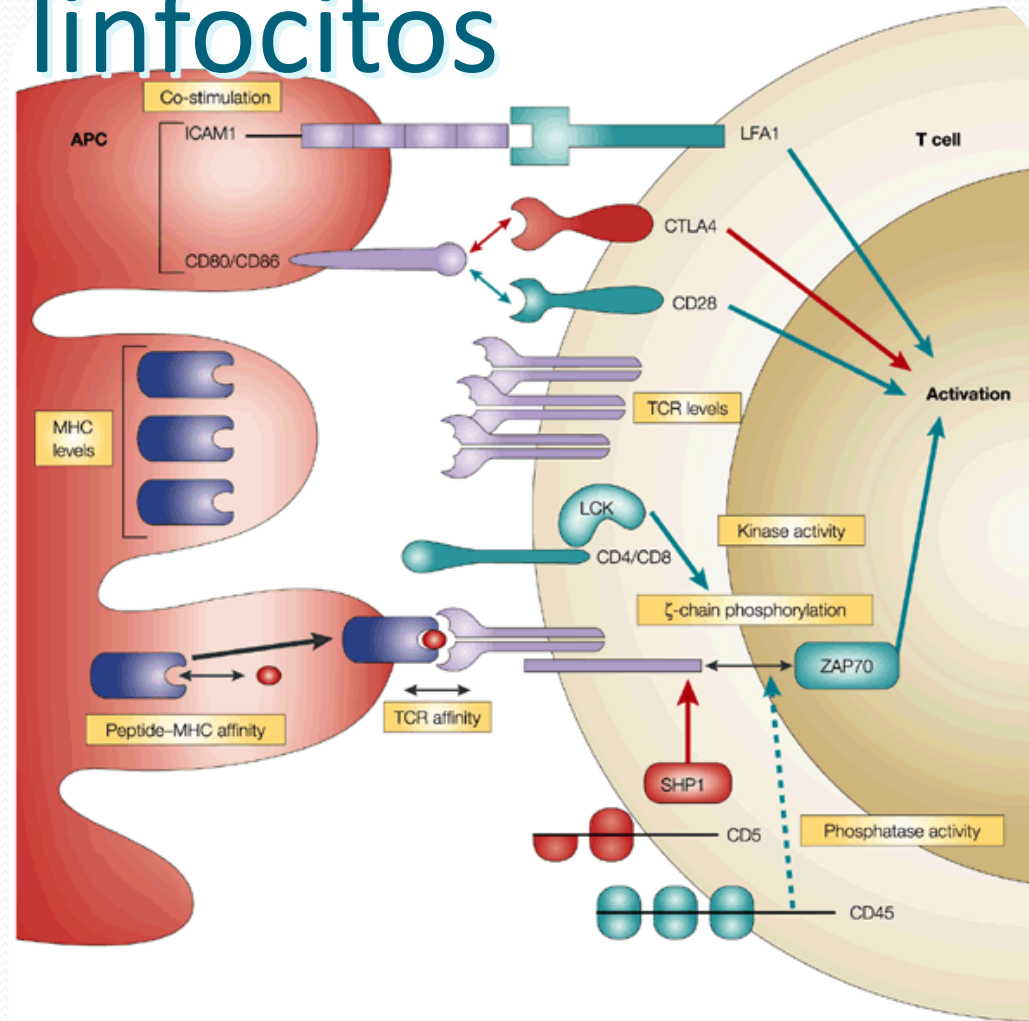
Ontogenia y órganos del sistema inmune



Prof. Siham Salmen Halabi
Idic-ULA
Curso de Pre-grado 2010

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 que 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?**

Ontogenia de linfocitos

- ¿Cuál es la razón de la existencia de finos mecanismos de regulación del desarrollo de los linfocitos?
 - Asegurarse de contar con el repertorio de células capaces de reconocer a todos los Ag extraños presentes en la naturaleza
 - Asegurarse que el sistema inmune reconozca como propio a los Ag del individuo (**TOLERANCIA**)
 - Asegurarse que los linfocitos migren hacia la periferia con las herramientas básicas para enfrentarse a los Ag extraños

Ontogenia de linfocitos

- ¿Cuál es la razón de la existencia de mecanismos finos de regulación del desarrollo de los linfocitos?
 - Asegurarse que el receptor antigénico (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)

Ontogénias de linfocitos

- Elementos que participan
 - Célula progenitora pluripotencial
 - Mediadores solubles
 - Interacción entre las células linfoides con elementos del microambiente

Elementos del sistema inmune

- Microambiente dado por los órganos linfoides primarios y secundarios
- 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 (Ej. Interleukinas)

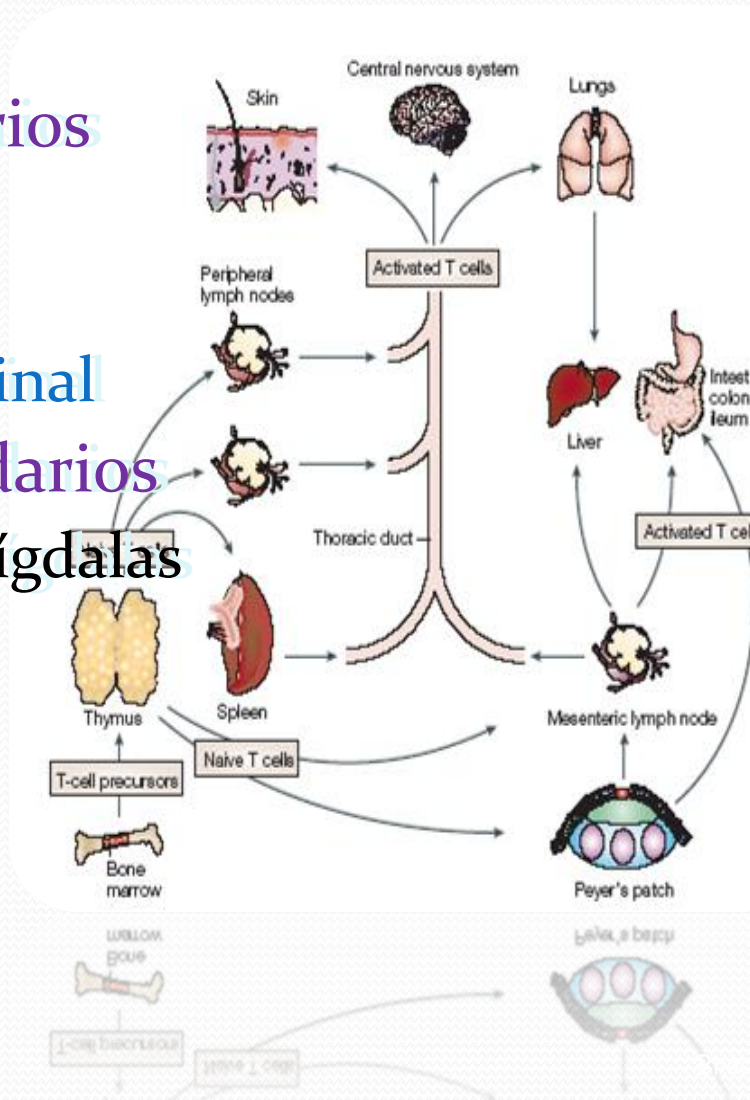
Órganos del sistema inmune

- Órganos primarios

- Timo
- Médula ósea
- Epitelio intestinal

- Órganos secundarios

- Ganglios y amígdalas
- Bazo
- MALT



Elementos de la respuesta inmune:

Inmunidad innata:

Celulas mieloides
(Celulas dendriticas,
Monocitos/macrofagos
, PMN, mastocitos)

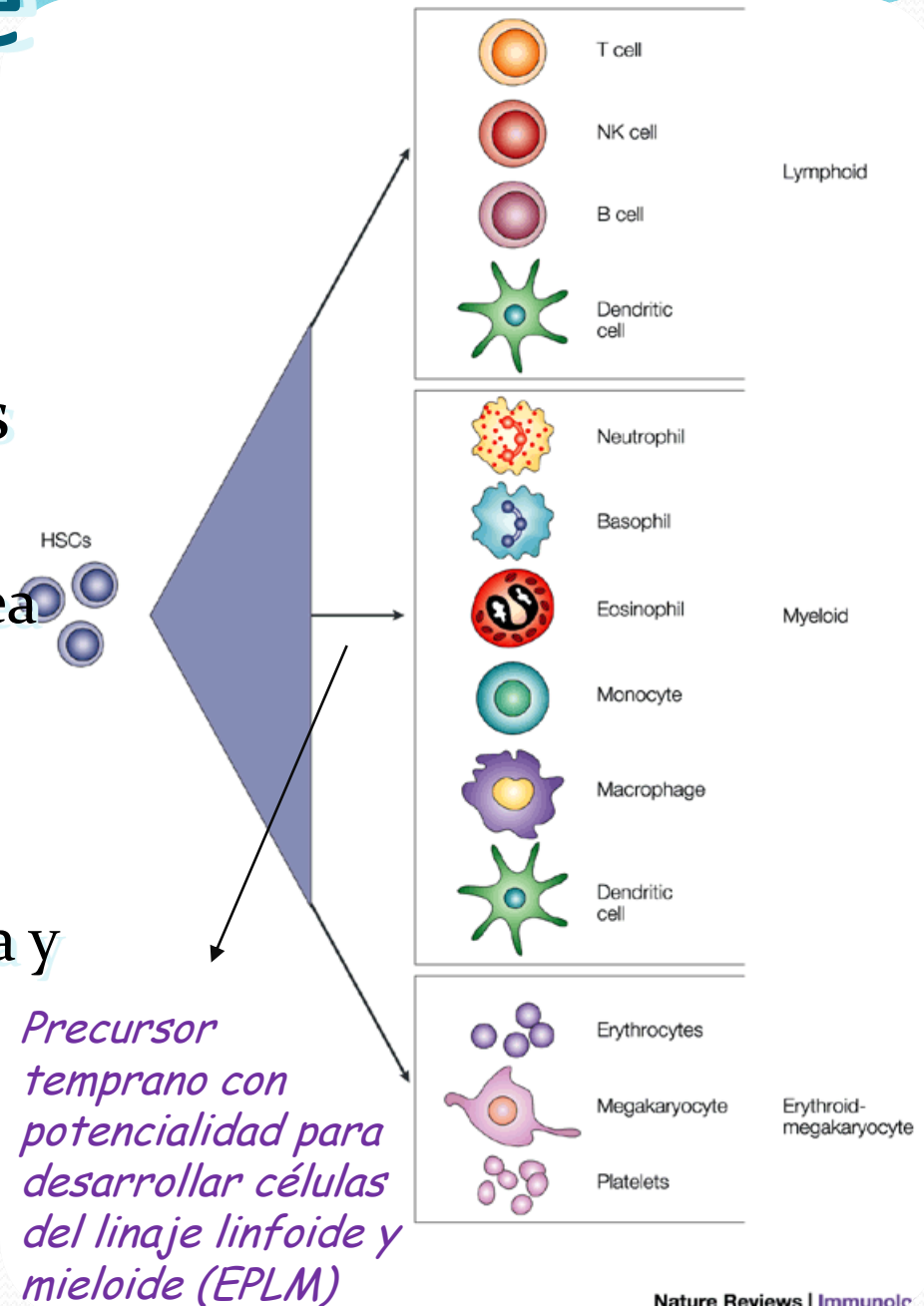
Celulas linfoides
(celulas dendriticas
plasmocitoides, NK,
linfocitos $T\gamma\delta$)

Inmunidad adaptativa
Linfocitos T y B

Órganos primarios y ontogenia

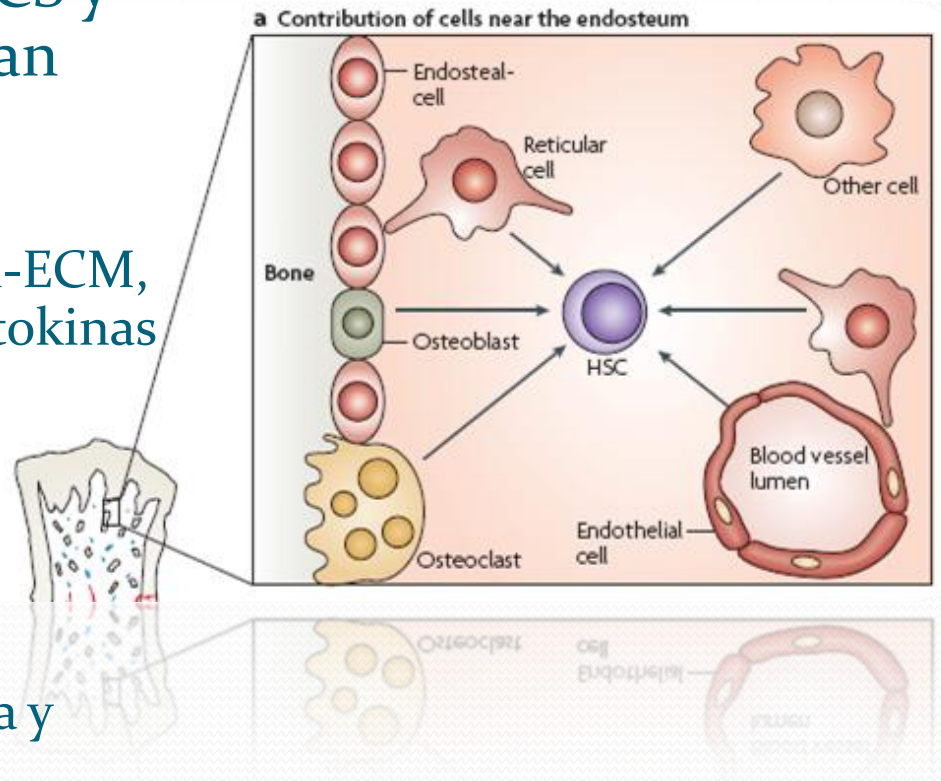
Ontogenia de linfocitos

- Células hematopoyéticas (HSC):
 - Se alojan en la médula ósea
 - Fenotípicamente son reconocidas por expresar CD34
 - Actividad de la telomerasa y autorenovación



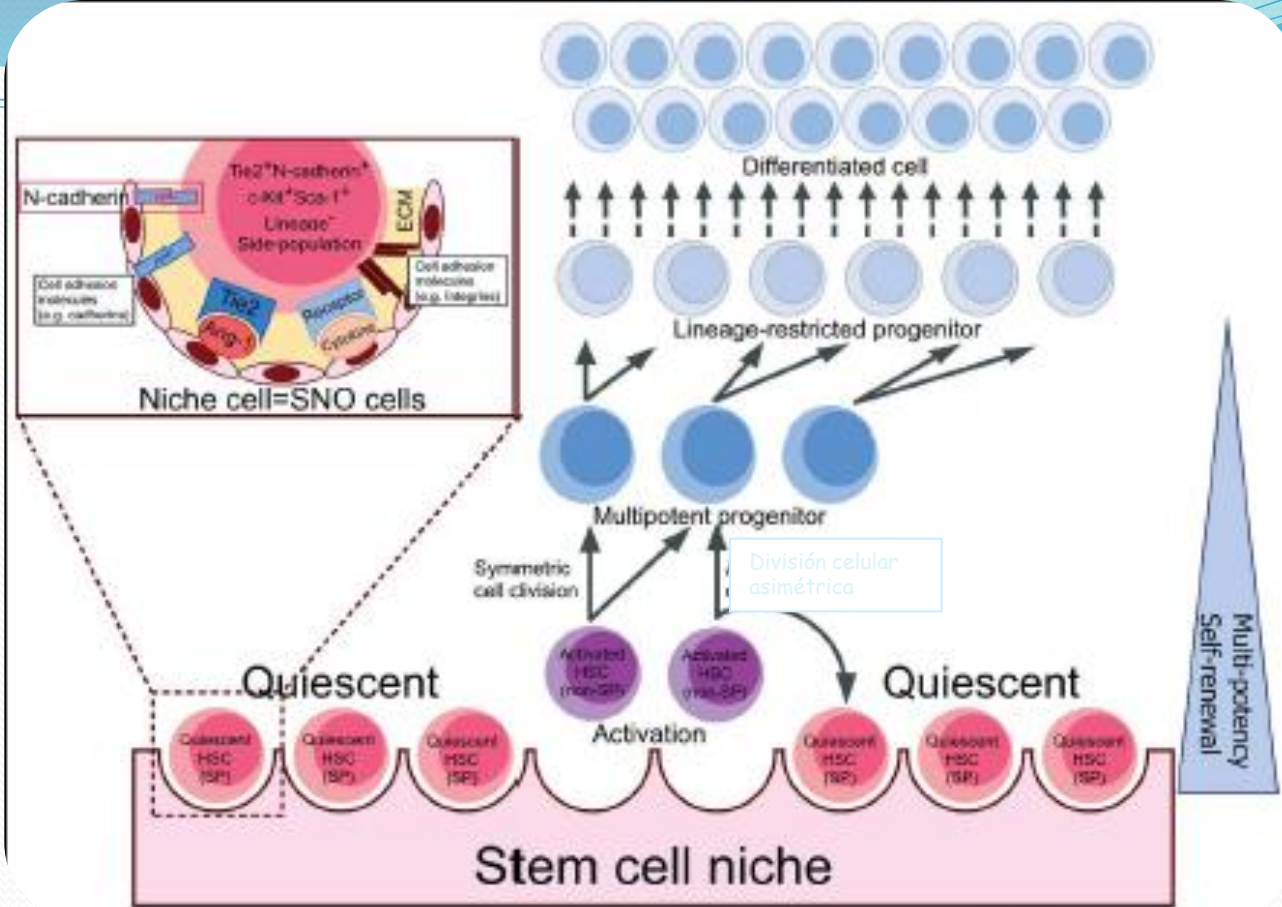
Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

- Médula ósea
 - Nicho: combinación de HCS y células del estroma, median señales extrínsecas que mantienen a las HCS.
 - Sitios de contacto cel-cel, cel-ECM, concentración variable de citocinas y factores de crecimiento
 - Endostio
 - Formado por osteoblastos y osteoclasto
 - ECM: colágeno, elastina (estructurales); fibronectina y laminina, proteoglicanos (especializadas)



Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

Arresto en el ciclo celular y adhesión a los osteoblastos



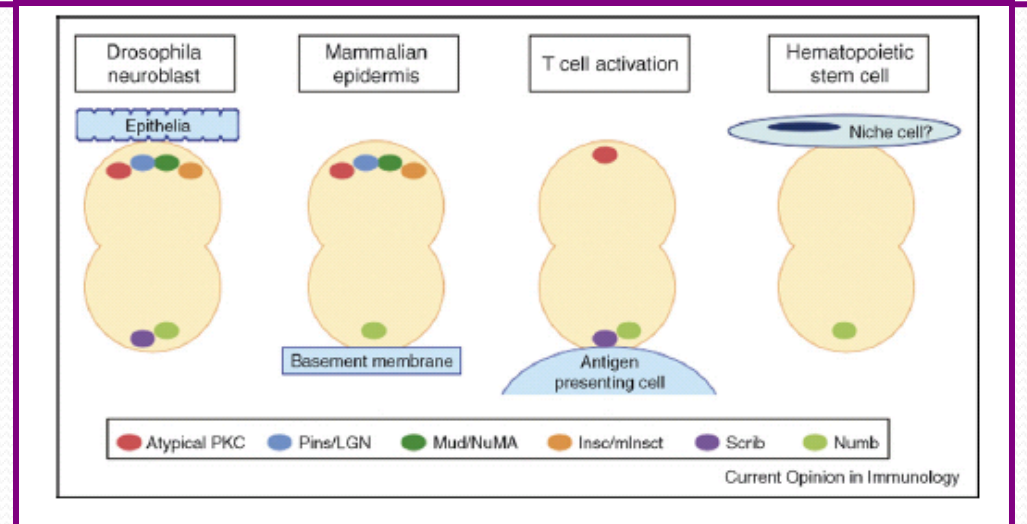
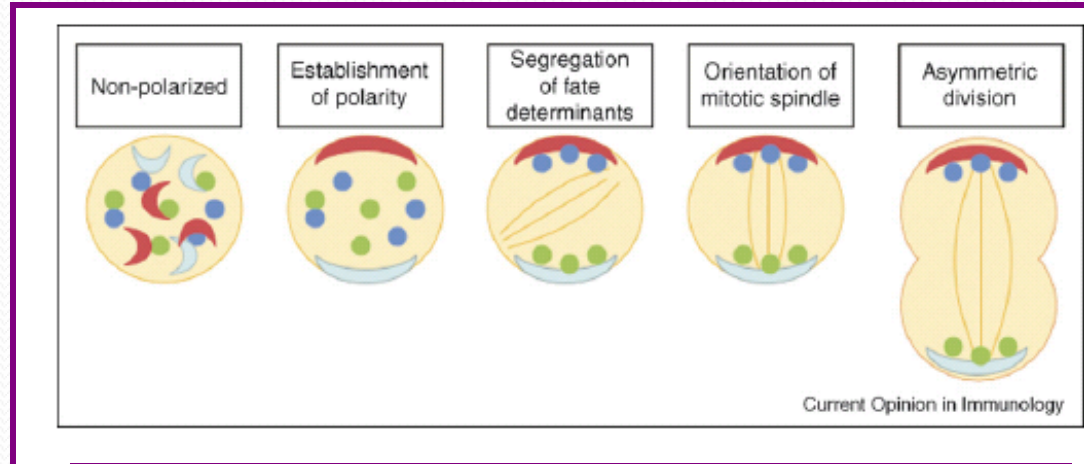
Inicio de la diferenciación requiere de activación de c-Myc, pérdida de la expresión de N-caderina e integrinas

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

Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

- “Stem cell”: División celular asimétrica, simétrica autorenovación y simétrica comisionada
 - Preservación de la autorenovación
 - Mecanismo propuesto en linfocitos maduros para generar células hijas efectoras y de memoria

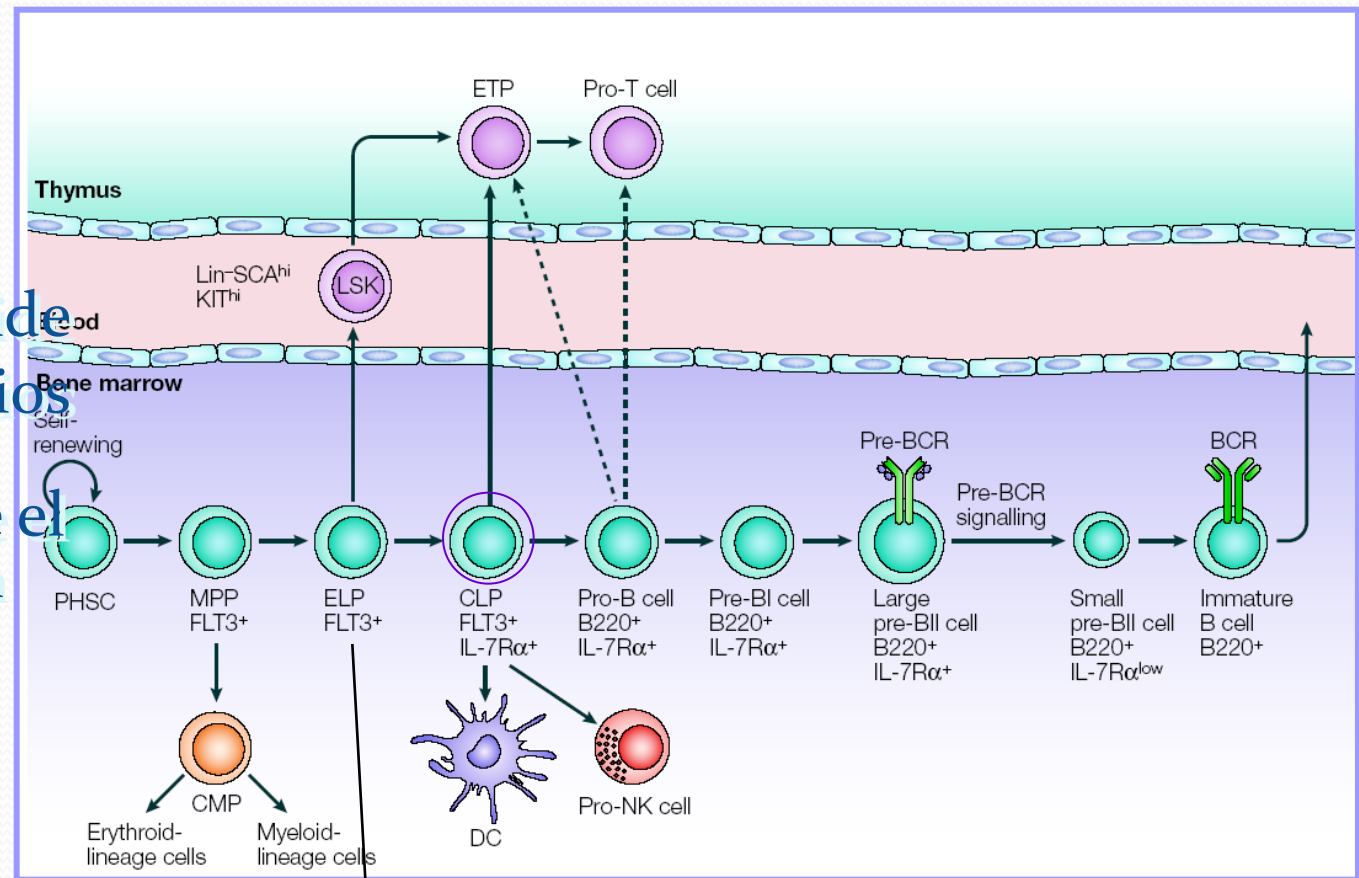


Ontogenia de linfocitos

CLP: precursor linfoide común

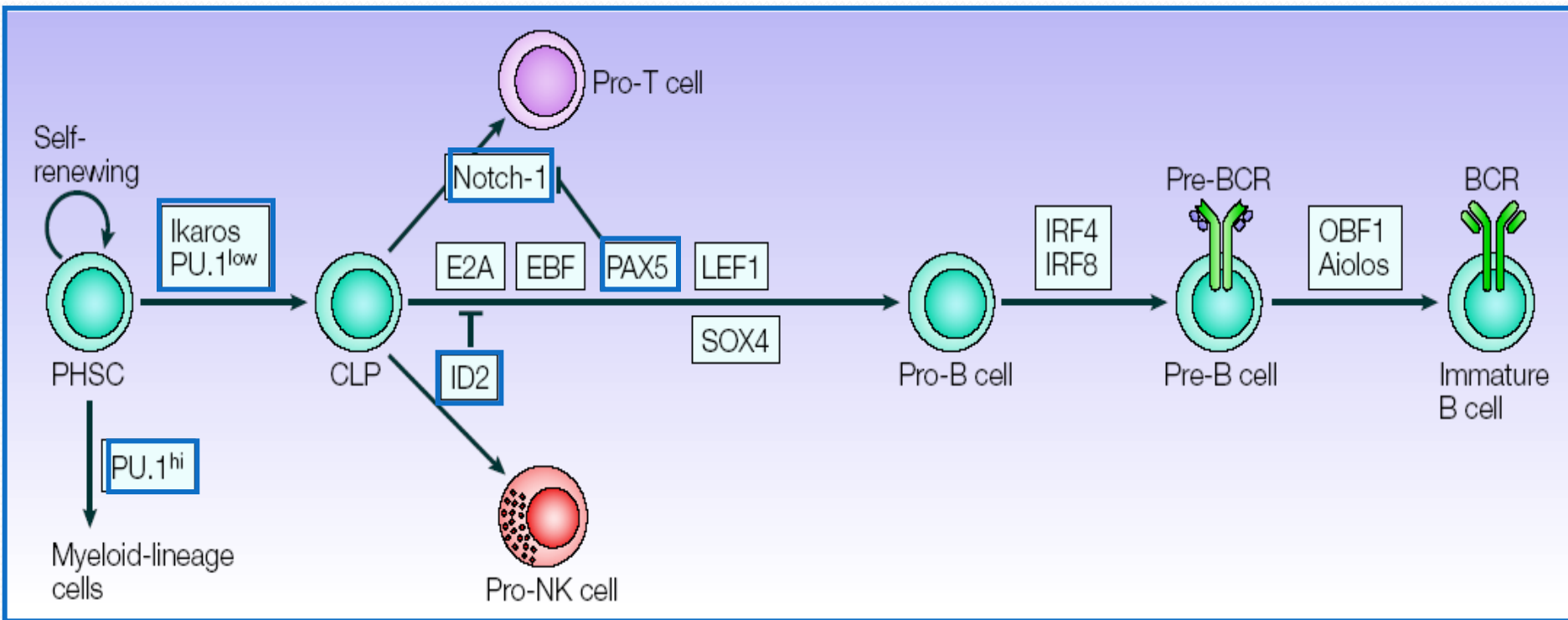
CMP: precursor mieloide común

- 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)

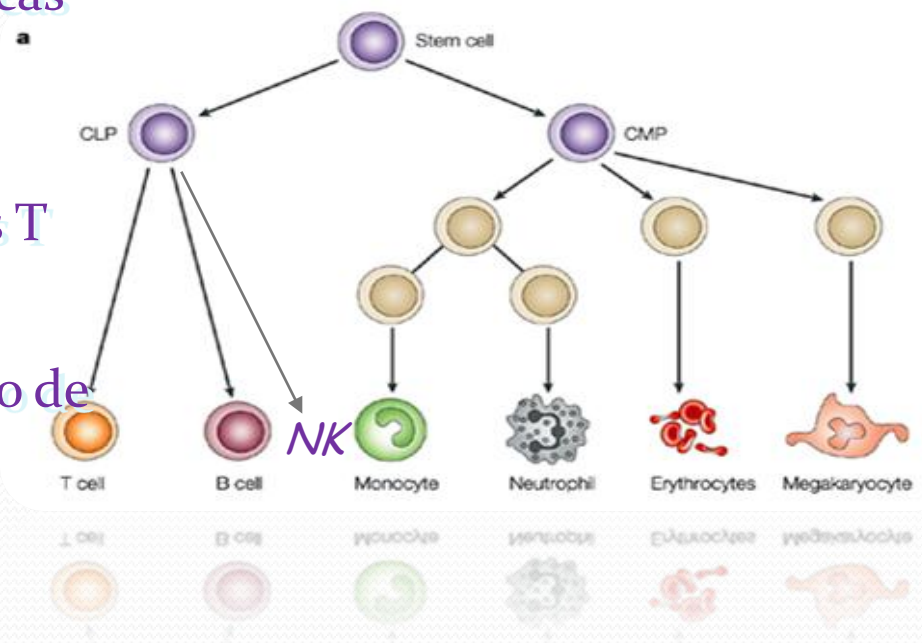
Que elementos contribuyen con la decisión: Linaje mieloide vrs linfoide o Lin T vrs B



Factores de transcripción involucrados en el desarrollo

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

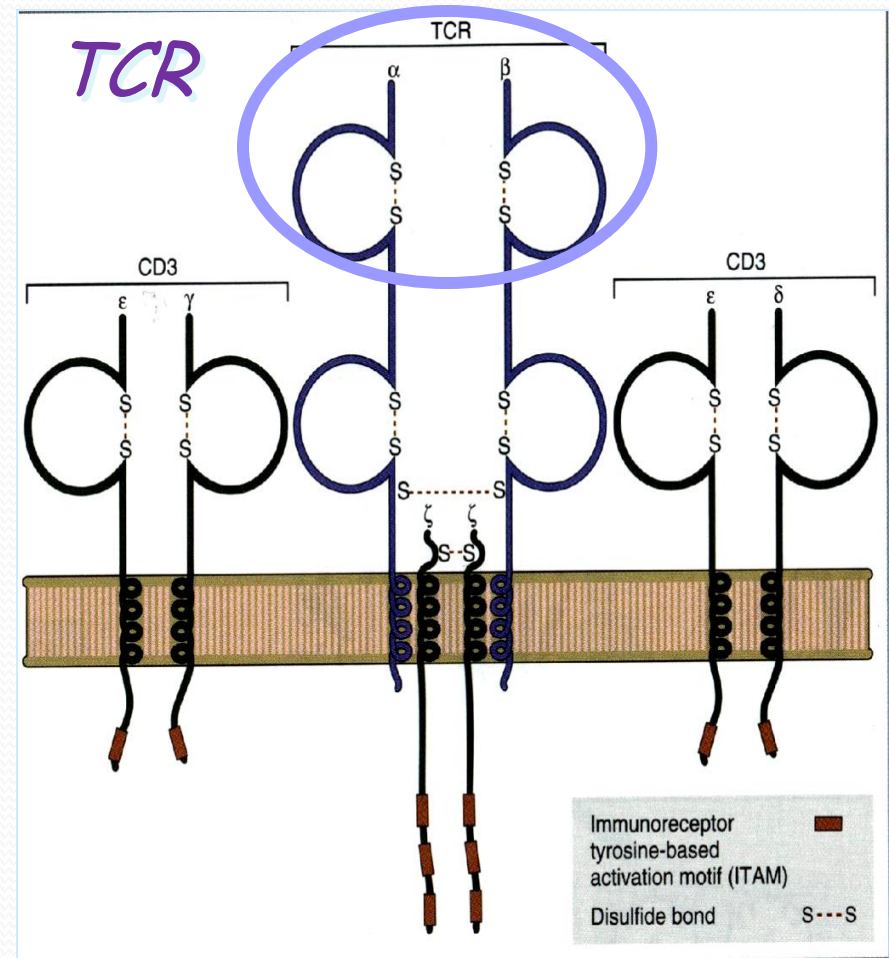
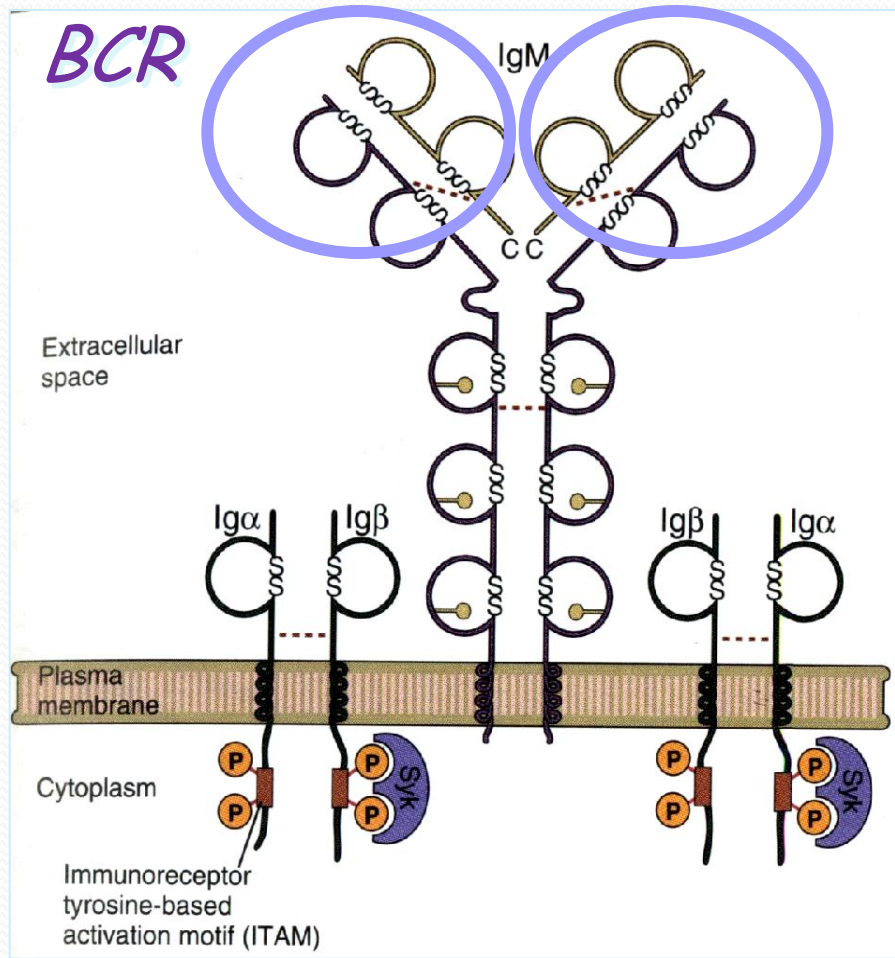


Ontogenia de los linfocitos

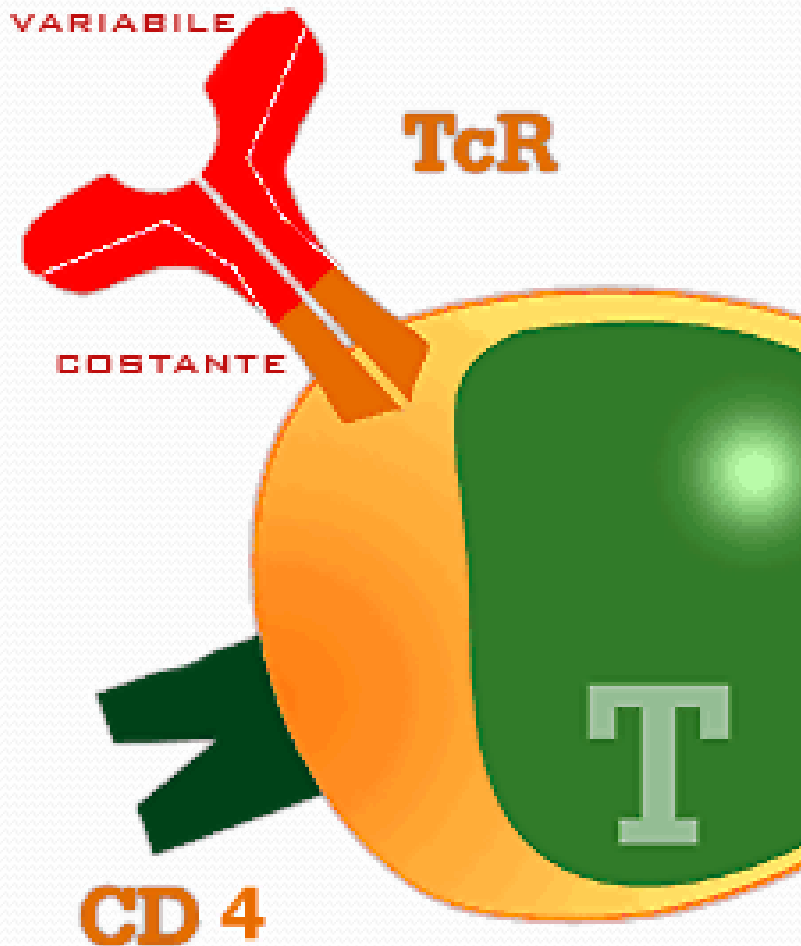
- **El desarrollo de los linfocitos depende de tres procesos básicos:**
 - **Migración y proliferación**
 - **Diferenciación: adquisición de fenotipos maduros**
 - **Selección del repertorio: células específicas a los antígenos (Ag) extraños y restringidas por las moléculas de histocompatibilidad (MHC) 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 α y β
(γ y δ) asociados
con CD3 (γ, δ, ϵ , y $\zeta\zeta$)
Moléculas que
permiten la
comunicación
intracelular

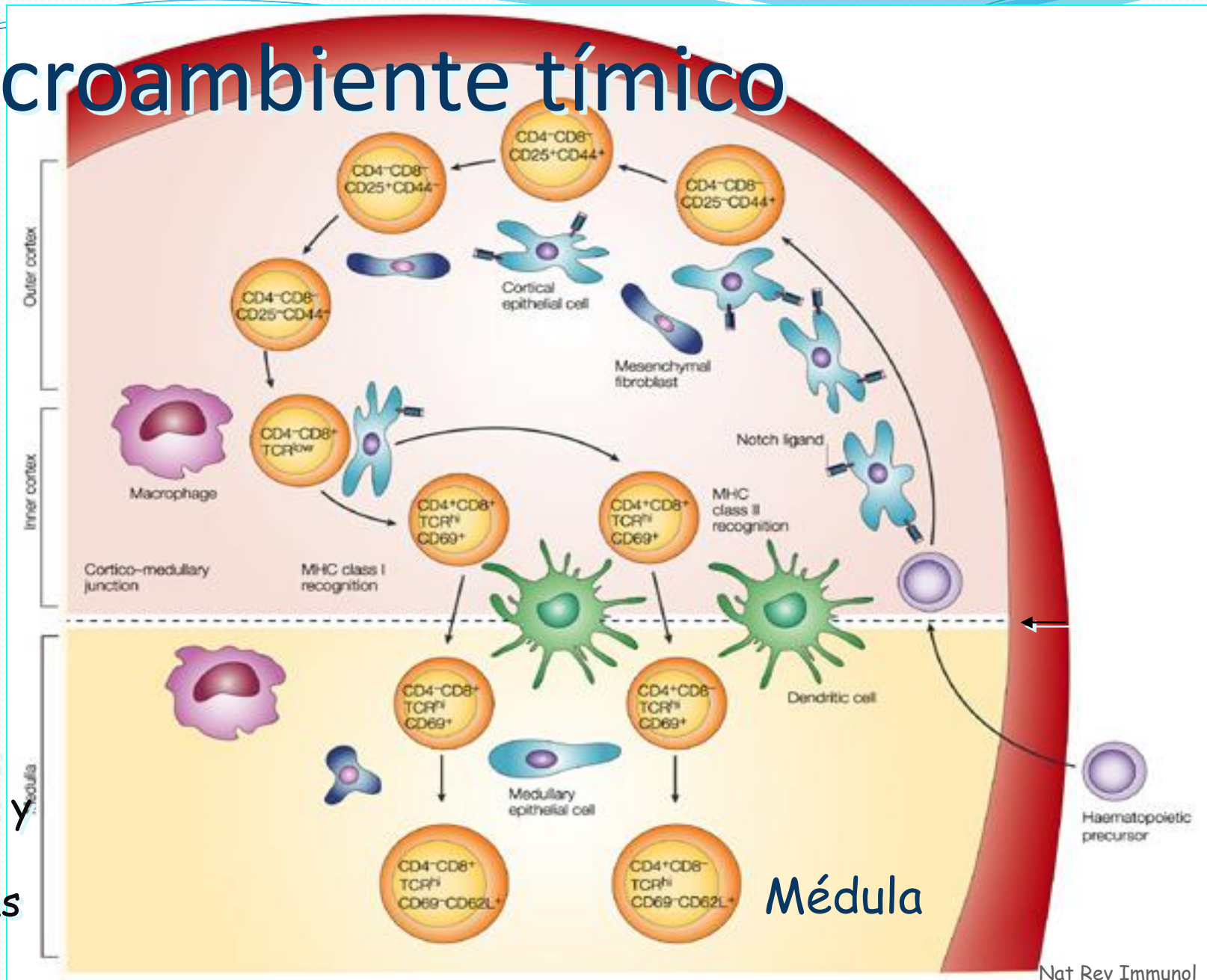
Ontogenia de linfocitos T

- 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 $\text{TCR}\gamma\delta$ o $\text{TCR}\alpha\beta$
 - Selección positiva y negativa
 - Escoger entre CD_4 o CD_8

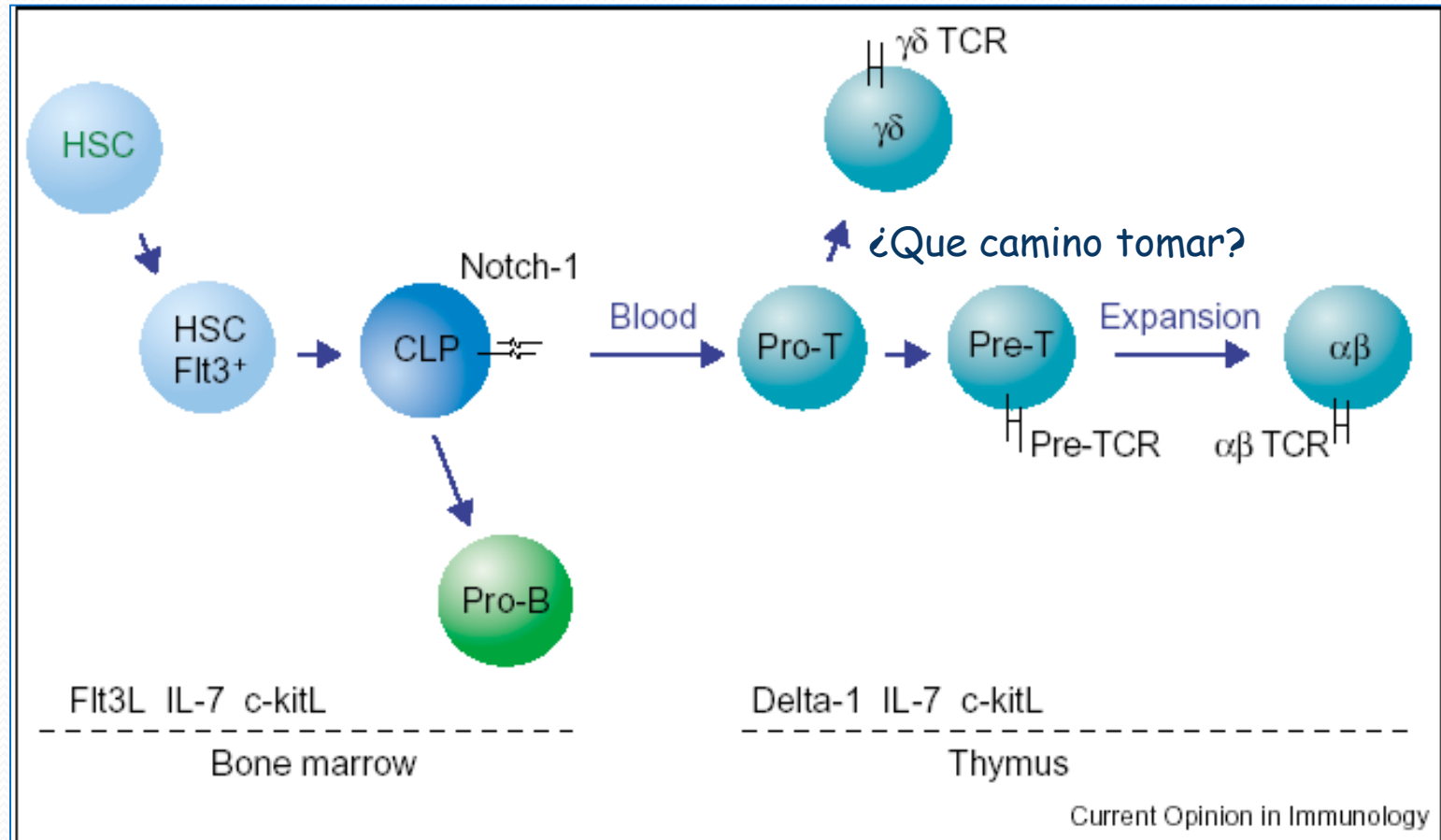
Microambiente tímico

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

- Decisión $T\gamma\delta$ vrs $T\alpha\beta$
 - Células $T\gamma\delta$
 - Comienzan a desarrollarse primero que los precursores de linfocitos $T\alpha\beta$
 - Sin embargo, predomina desarrollo de $T\alpha\beta$
 - Su desarrollo en el timo es inhibido por la expresión del **pre-TCR**
 - Emigran del timo, para ubicarse en las barreras epiteliales, donde culminan su desarrollo

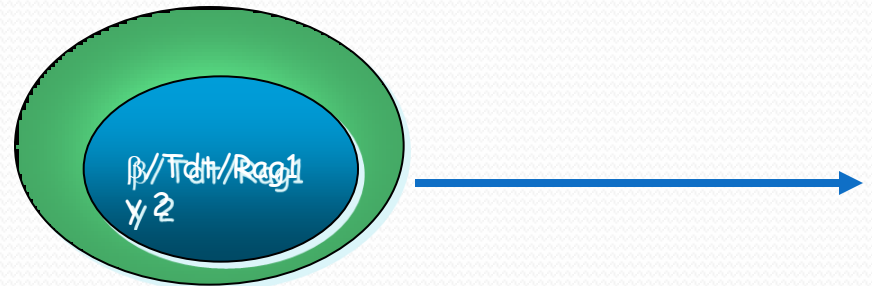
Ontogenia de Linfocitos T

Timocito temprano:

Pro-T:

Reordenamiento de la Cadena β del TCR (receptor del linfocito T)

Doble negativo (DN=CD4-/CD8-)



Mediado por Recombinasas 1 y 2 (Rag1 y 2)



1er alelo

Familia de genes de la región variable, diversidad y unión

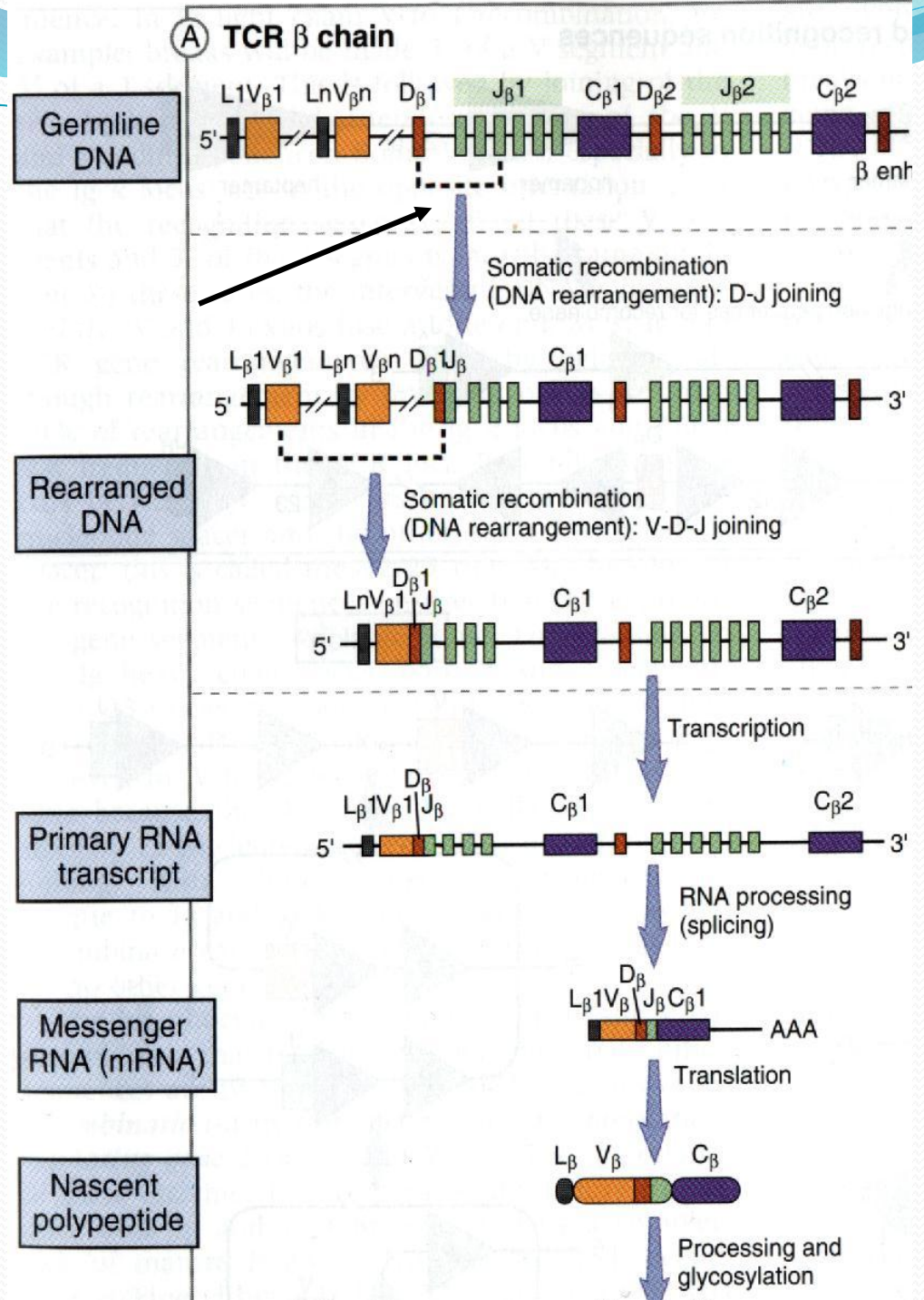
Región constante

Reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β

Dos alelos:

el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el

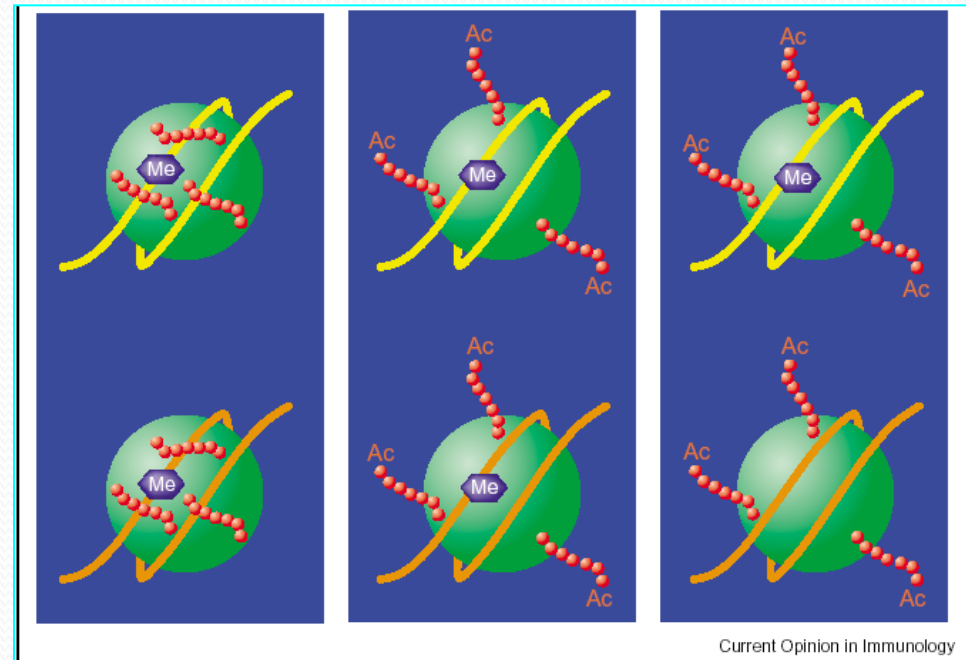
reordenamiento del otro: **EXCLUSIÓN ALÉLICA**



Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

Modificaciones de las histonas

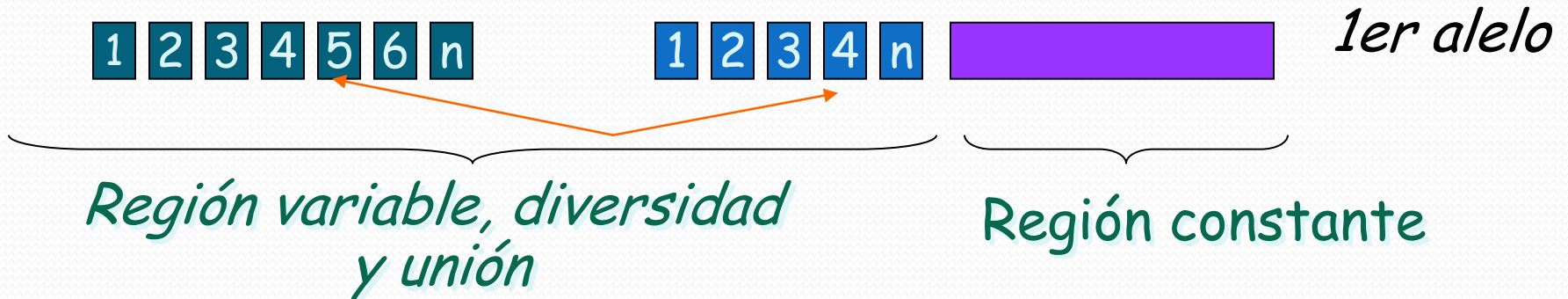
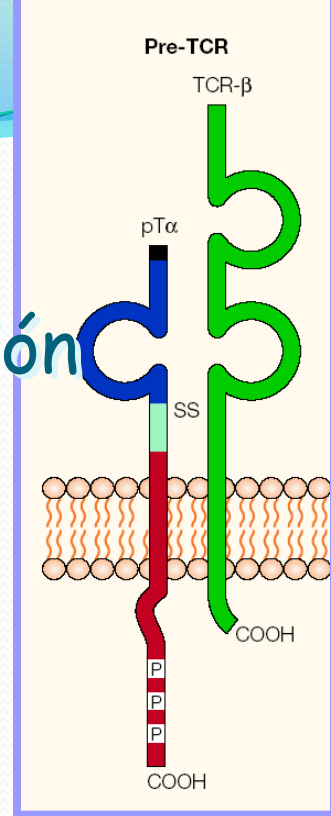
- Acetilación: accesibilidad a la cromatina
- Demetilación del ADN
 - Un solo alelo
 - Exclusión alélica



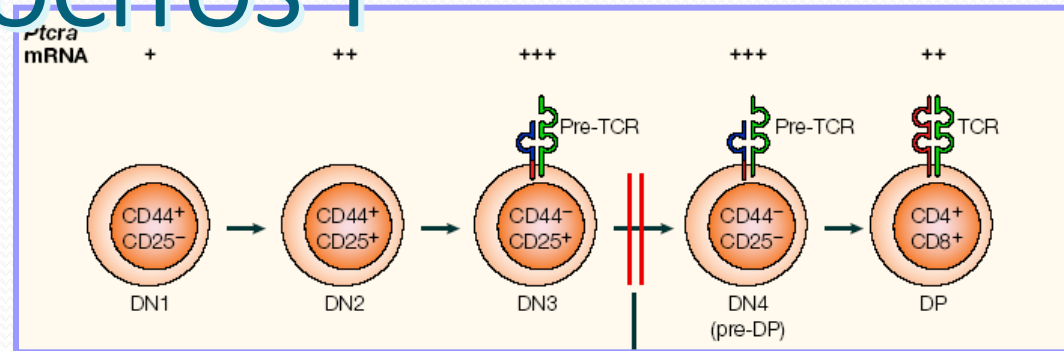
Ontogenia de Linfocitos T

Pre-T: expresión de la cadena β y formación de pre-TCR

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

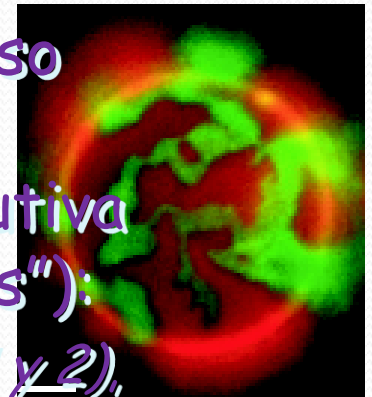


Ontogenia: LINFOCITOS T



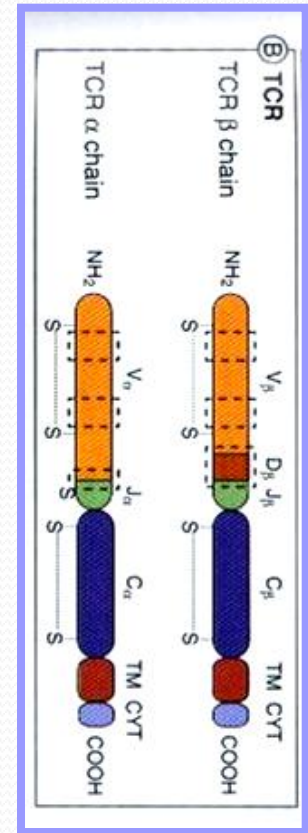
preTCR:

- Es expresado seguido al reordenamiento exitoso de TCR β .
- 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 mas reordenamiento de β (*exclusión alélica*)
 - Favorece reordenamiento de la cadena α
 - Proliferación y da paso a timocitos Doble Positivos (co-expresión de CD4 y CD8)



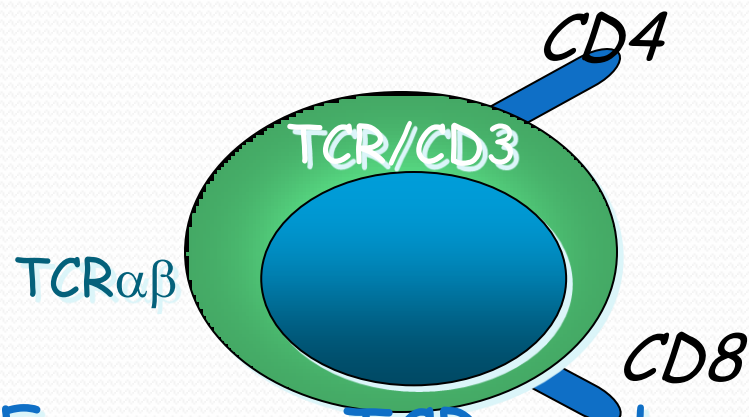
Ontogenia de linfocitos

- Mecanismos involucrados en la generación de la diversidad
 - Diversidad en las posibilidades de combinación
 - Familias de genes V, D y J
 - Combinaciones entre las cadenas β y α (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

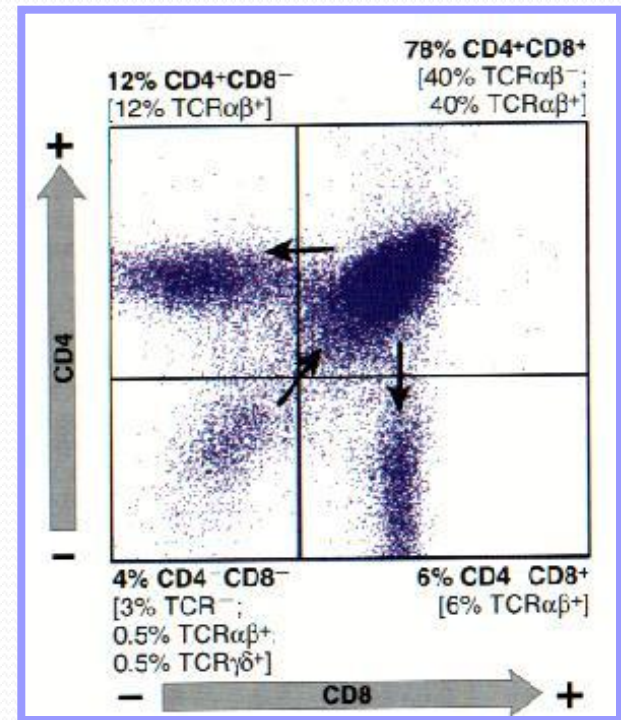


Ontogenia de Linfocitos T

Timocito doble positivo (DP):

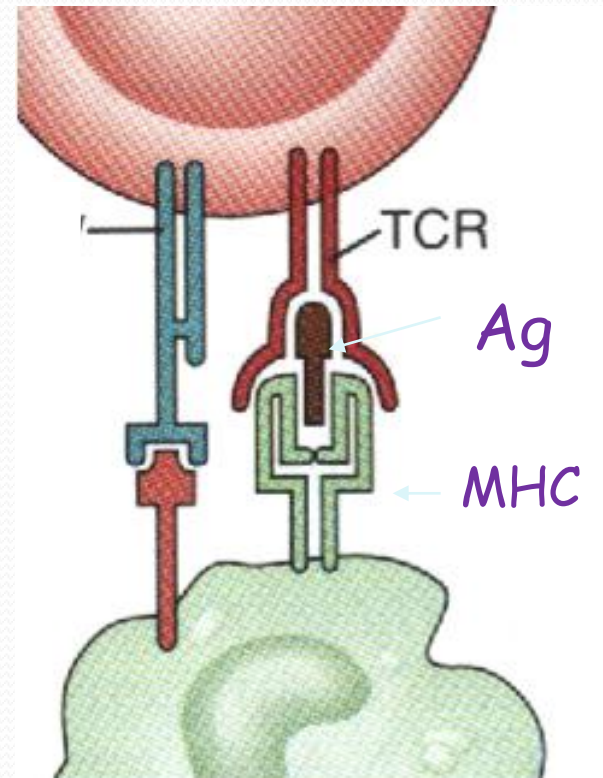


Expresan TCR y además CD4 y CD8 (Doble Positivas) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo



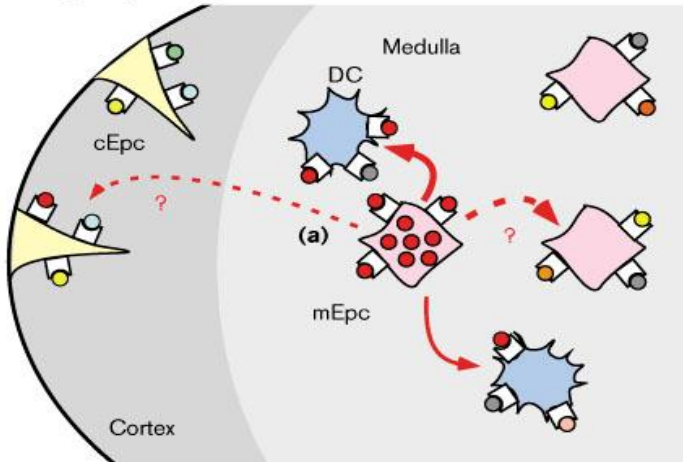
Ontogenia de Linfocitos T

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

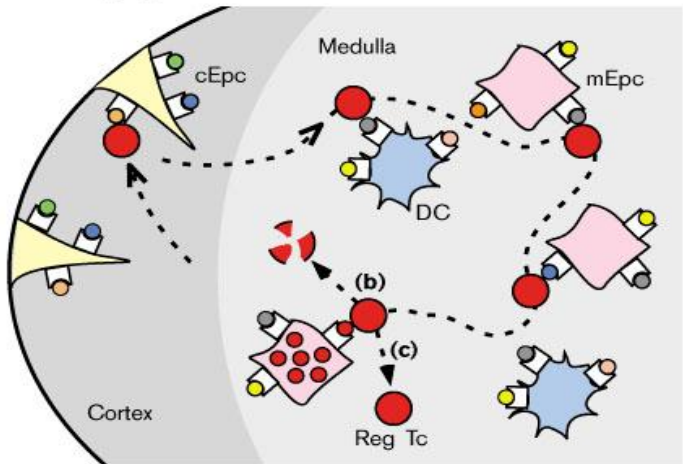


Ontogenia de linfocitos T: CÉLULAS DEL ESTROMA TÍMICO

Antigen spreading



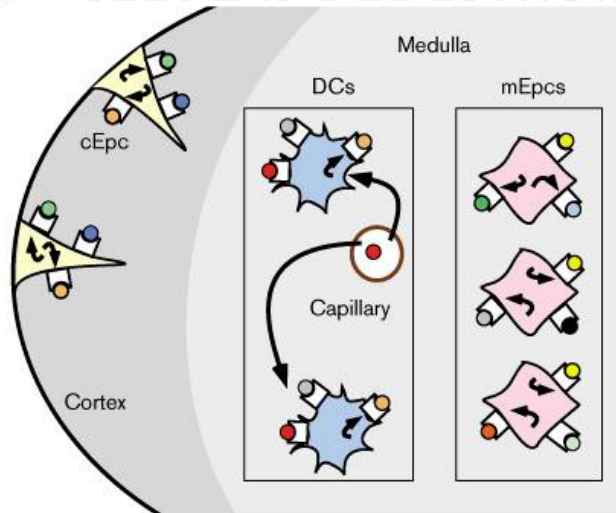
Scanning by T cells



Current Opinion in Immunology

Current Opinion in Immunology

- Tienen la capacidad de expresar diversas proteínas de los tejidos periféricos por vía endógena presentarlos a los timocitos y transferirlas a las DCs. Mediado por AIRE (autoimmune regulator) que es un activador transcripcional expresado en TEC



'Hemopoietic self' DCs, macrophages, B cells, T cells
 'Non-hemopoietic self' Liver, pancreas, skin, muscle, brain, lens
 Current Opinion in Immunology

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

Funciones asociadas a las ETC

Desarrollo de las células DN a DP

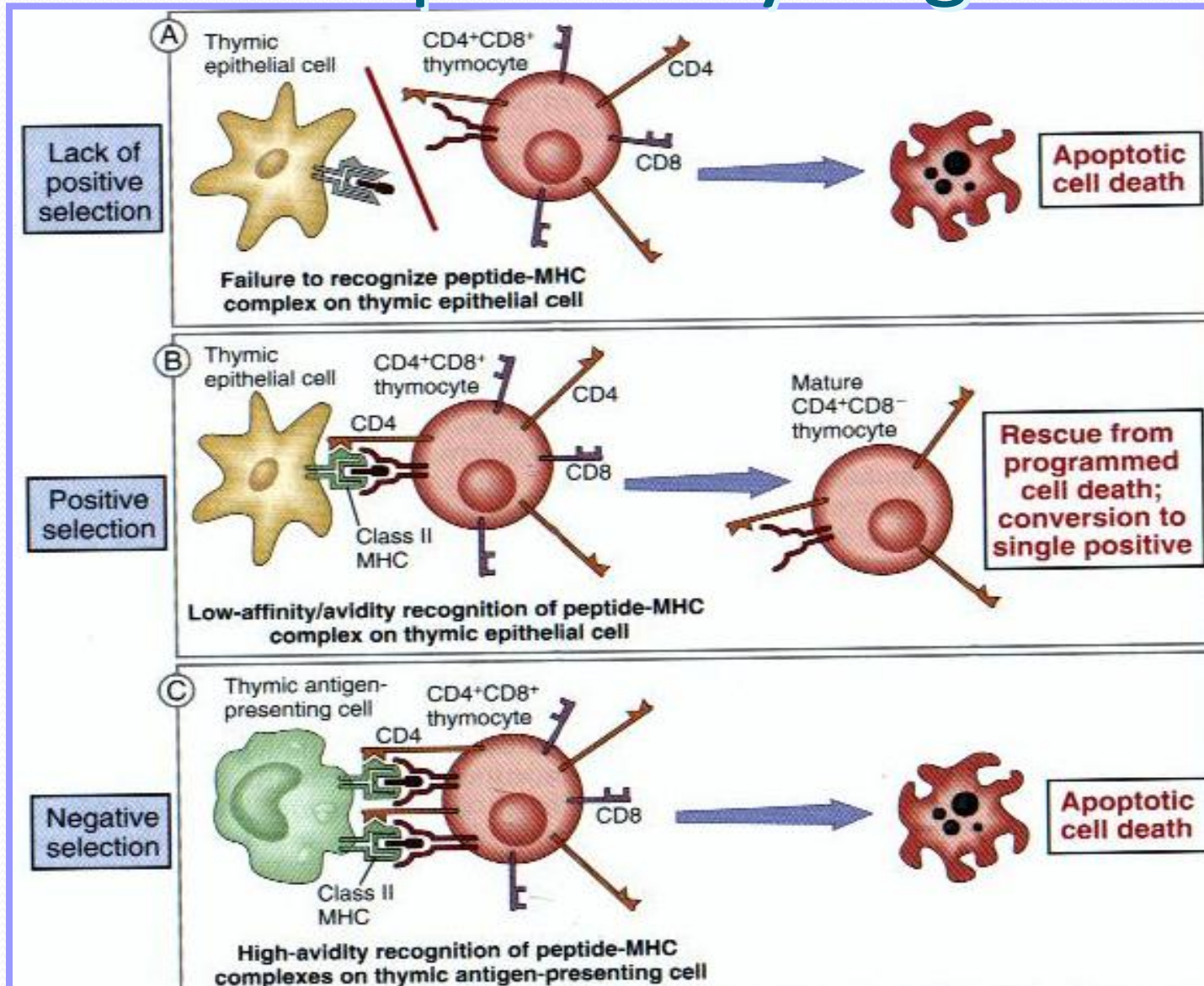
La selección positiva regulada por las cEpc

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

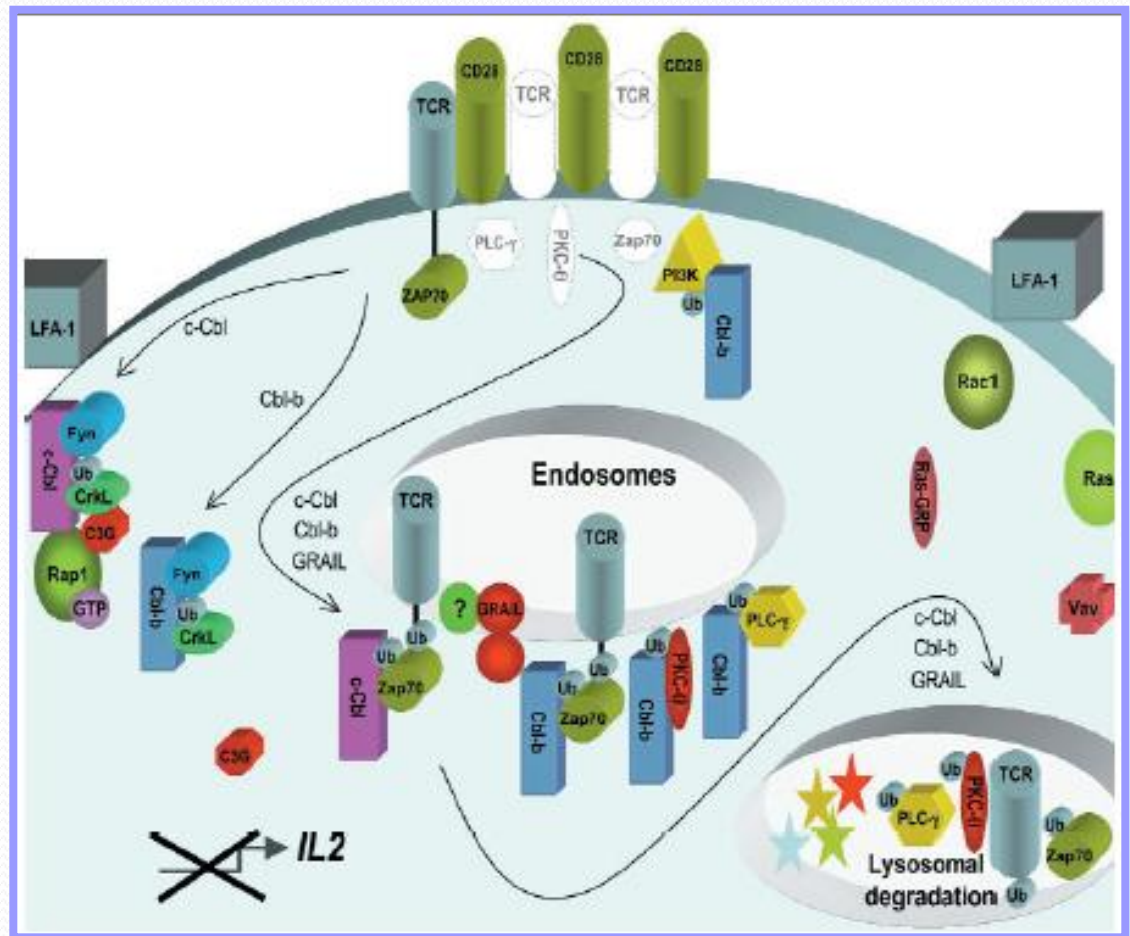
Ontogenia de Linfocitos T: Selección positiva y negativa



Muerte o
anergia

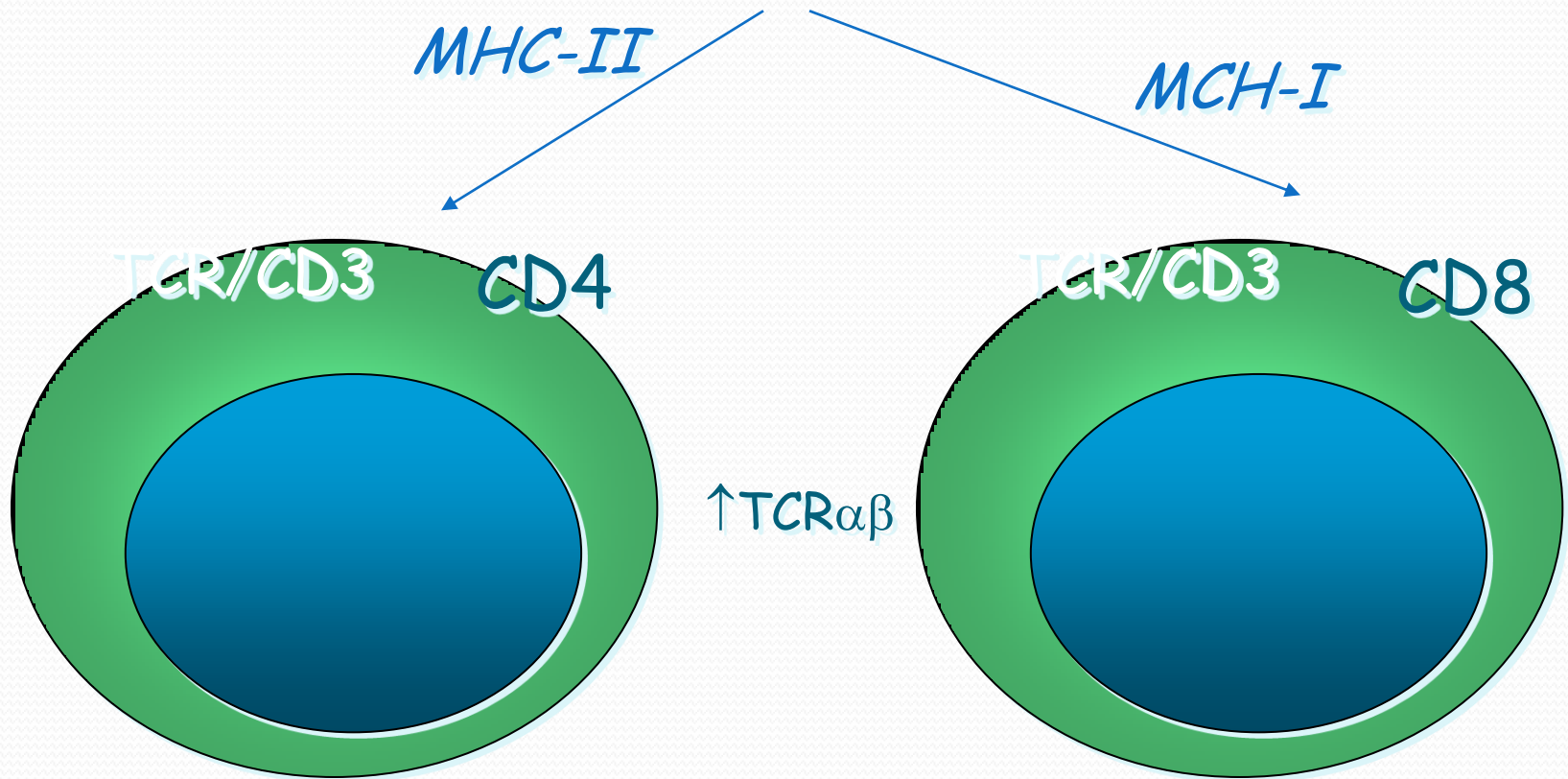
Ontogenia: MECANISMOS DE SELECCIÓN

- 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:

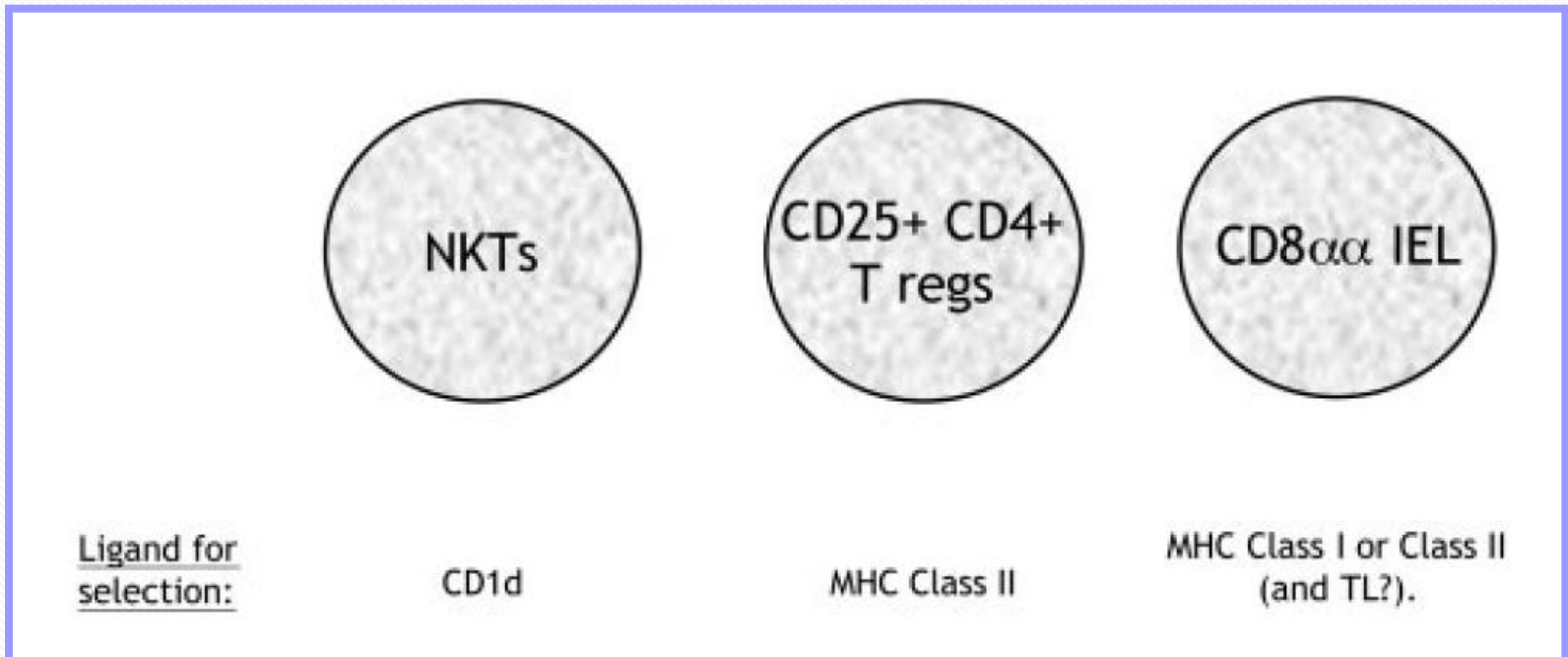


Ontogenia de linfocitos T

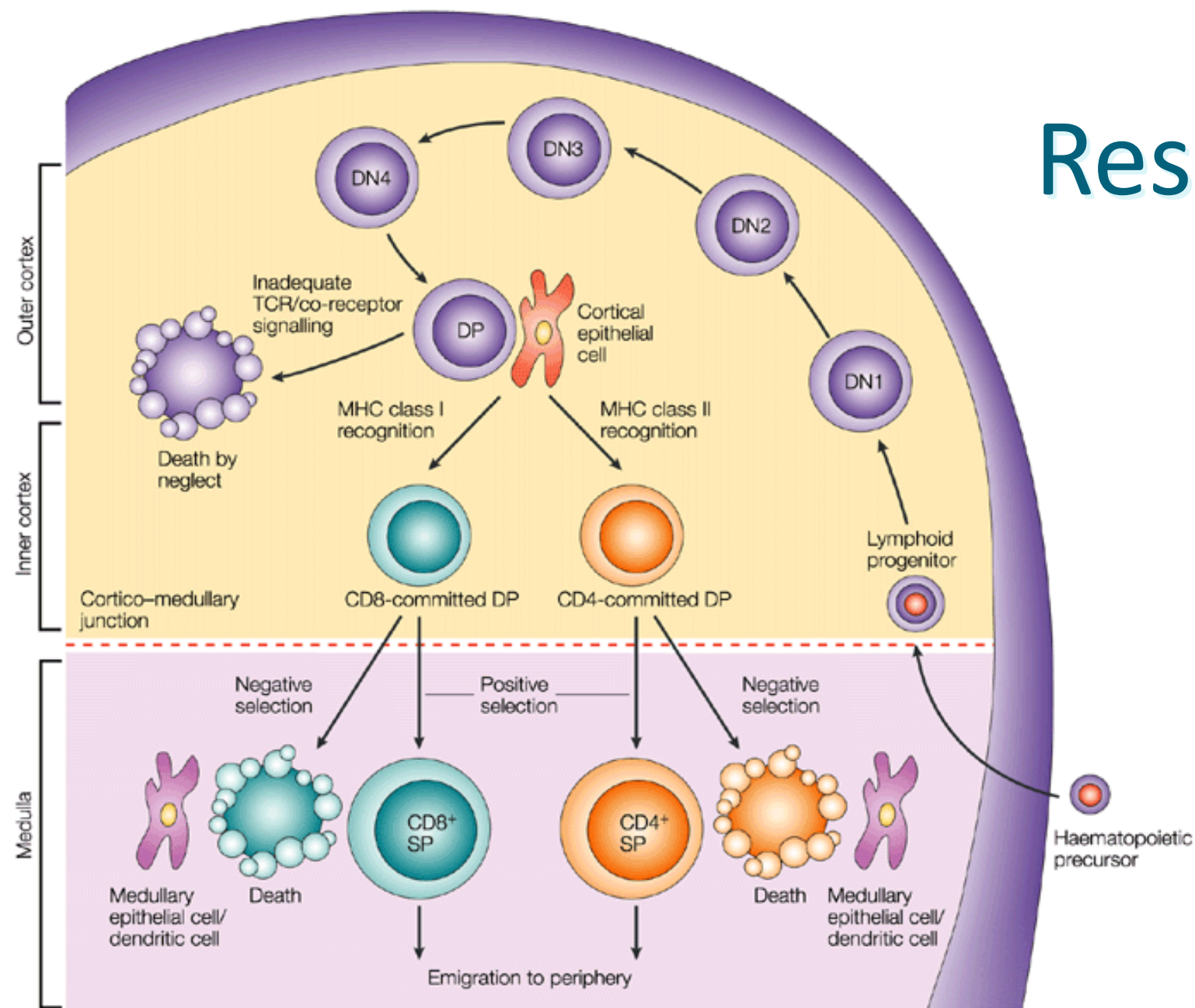
- Selección positiva (rescate de la apoptosis):
 - TCR tenga baja afinidad por los Ag propios
 - Células epiteliales tímicas
- Selección negativa:
 - TCR con alta afinidad por el Ag propio o incapaz de interactuar con MHC (I y II)
 - Corteza profunda, unión córtico-medular y médula
 - Células interdigitantes

Ontogenia de linfocitos: DESARROLLO DE CÉLULAS T REGULADORAS

- Selección positiva por agonista



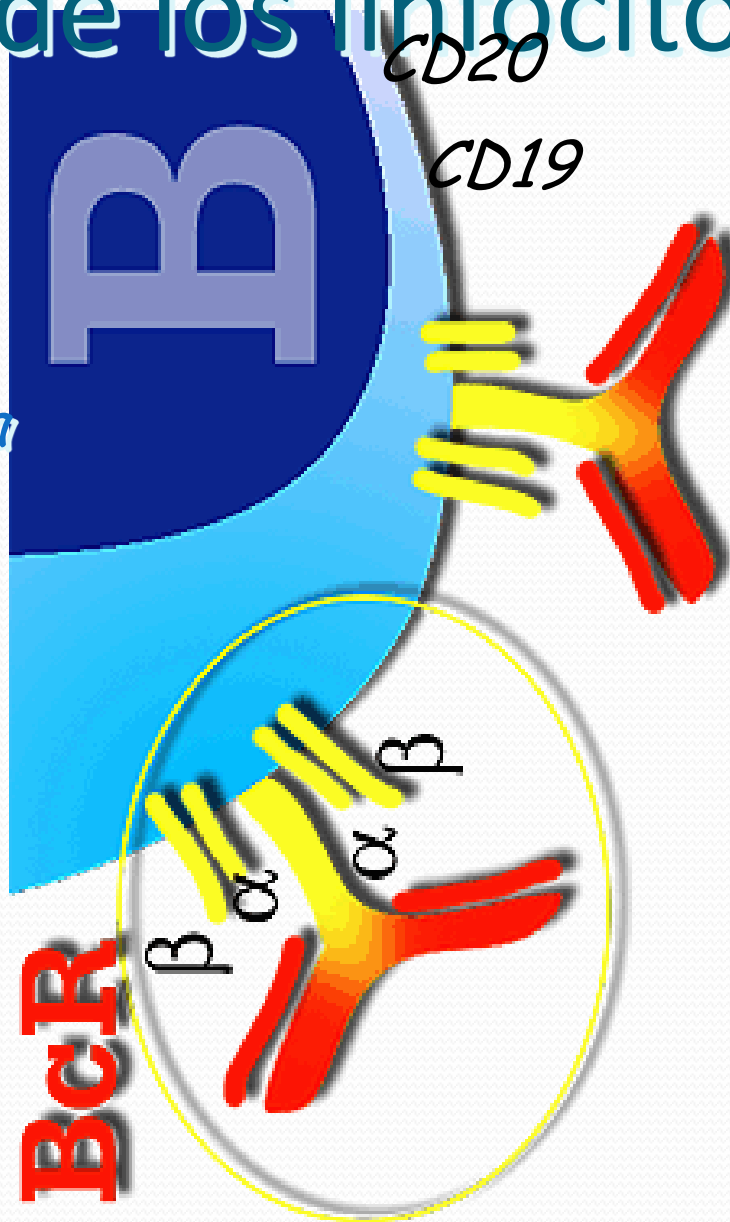
Resumen



Ontogenia de los linfocitos B

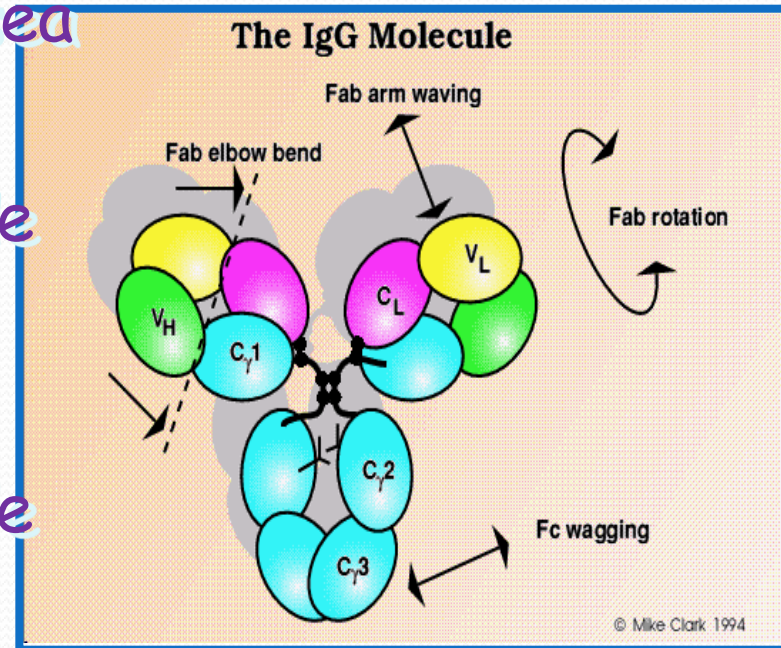
BCR:

*Inmunoglobulina
(IgM e IgD) +
cadenas α y β
(comunicación
intracelular)*

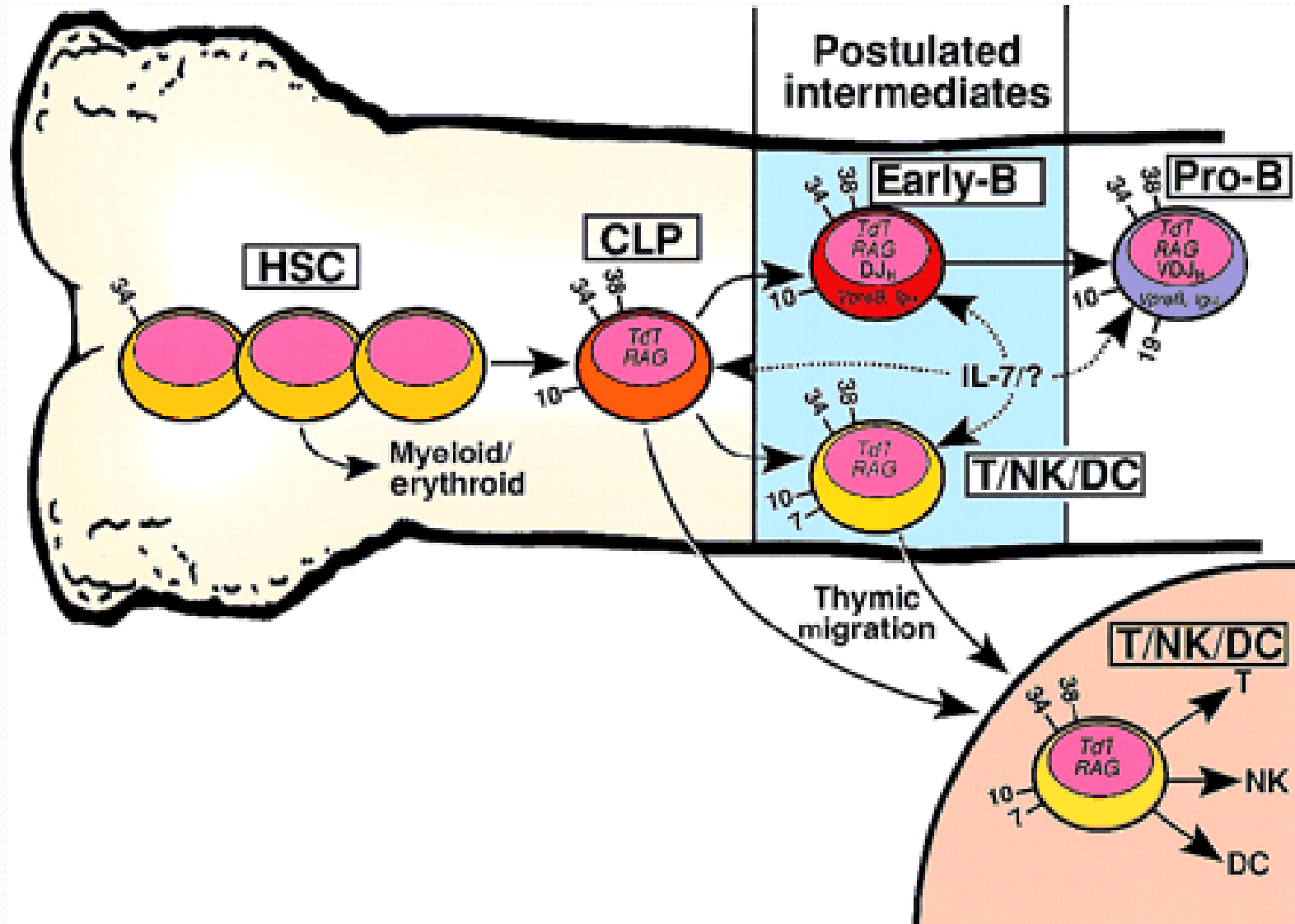


Ontogenia de linfocitos B

- Su desarrollo se inicia en el hígado fetal 8^{va}-9^{na} 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



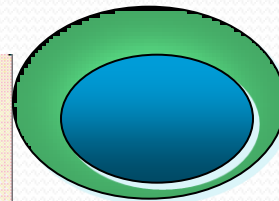
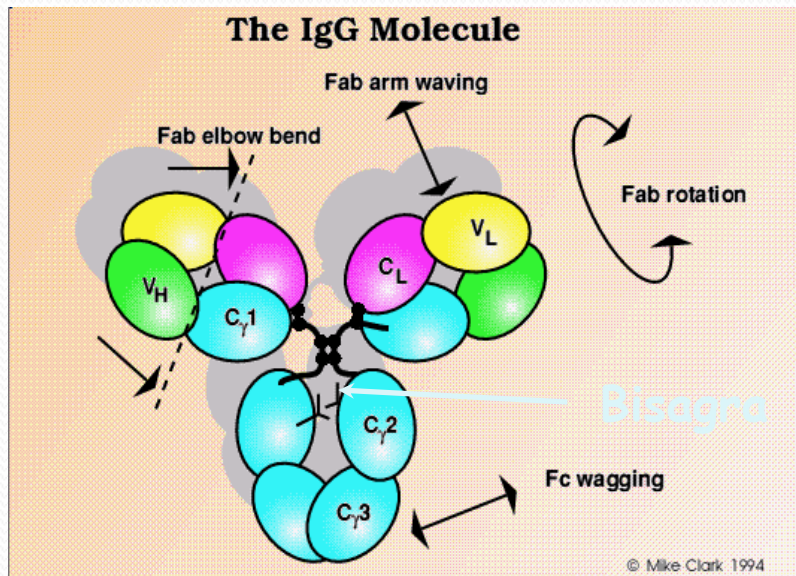
Ontogenia: LINFOCITOS B



Ontogenia de Linfocitos B

pro-B:

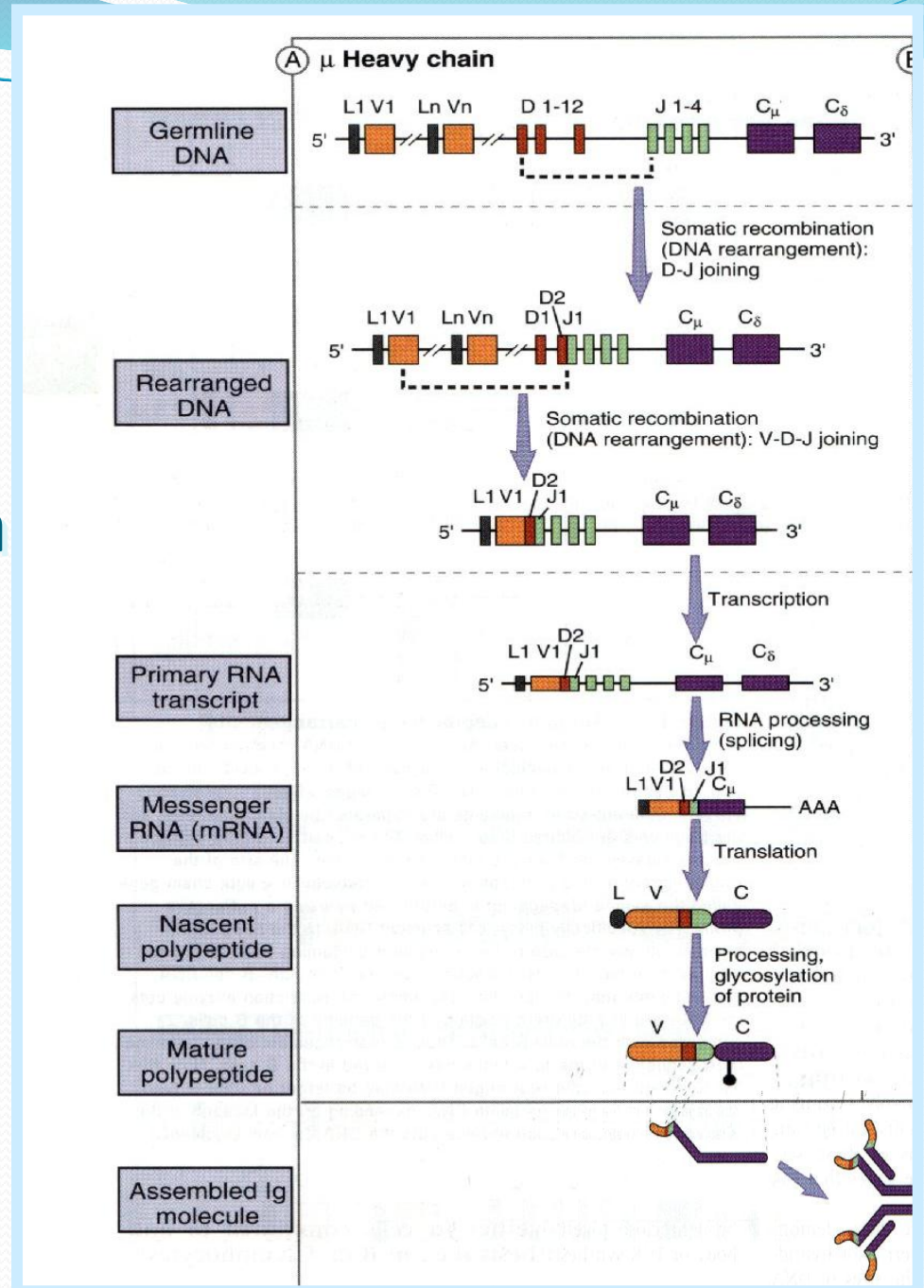
Reordenamiento genético de la cadena pesada de las inmunoglobulinas : cadena μ



IL-7R
IL-3R

Reordenamiento de los genes que codifican para las inmunoglobulinas

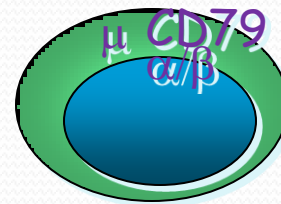
Dos alelos:
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: EXCLUSIÓN ALÉLICA



Ontogenia de Linfocitos B

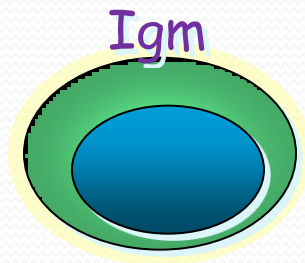
pre-B:

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

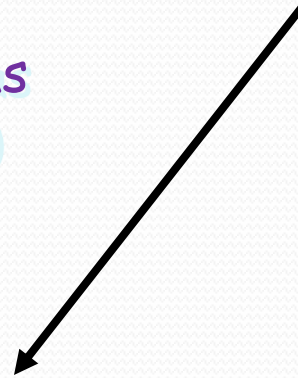
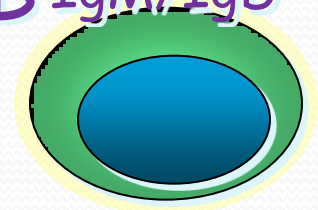


Las señales del pre-BCR median la exclusión alélica del locus de la cadena pesada
-Reordenamiento genético de las cadenas livianas Ig

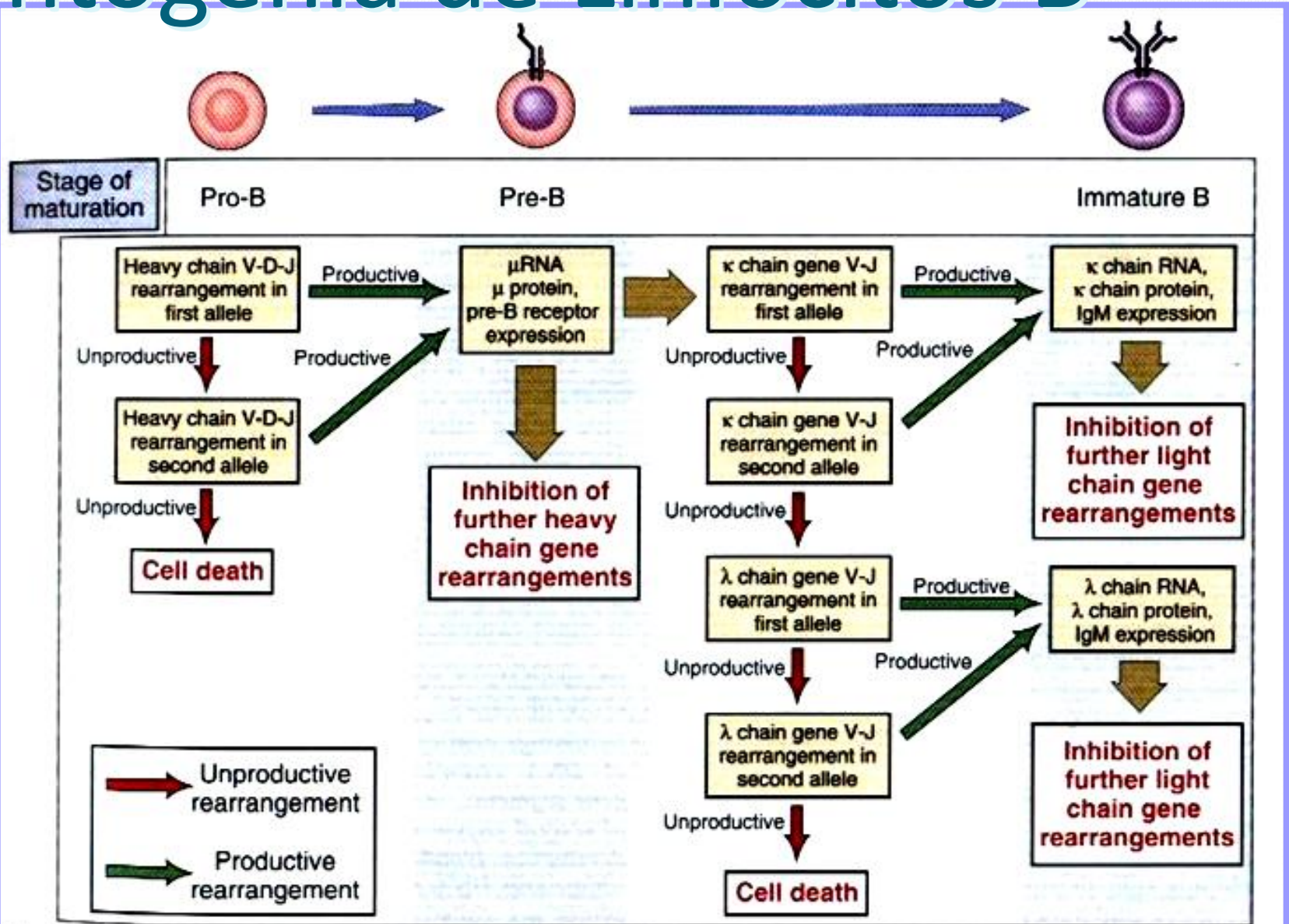
Linfocito B inmaduro:



Linfocito B IgM/IgD maduro:



Ontogenia de Linfocitos B

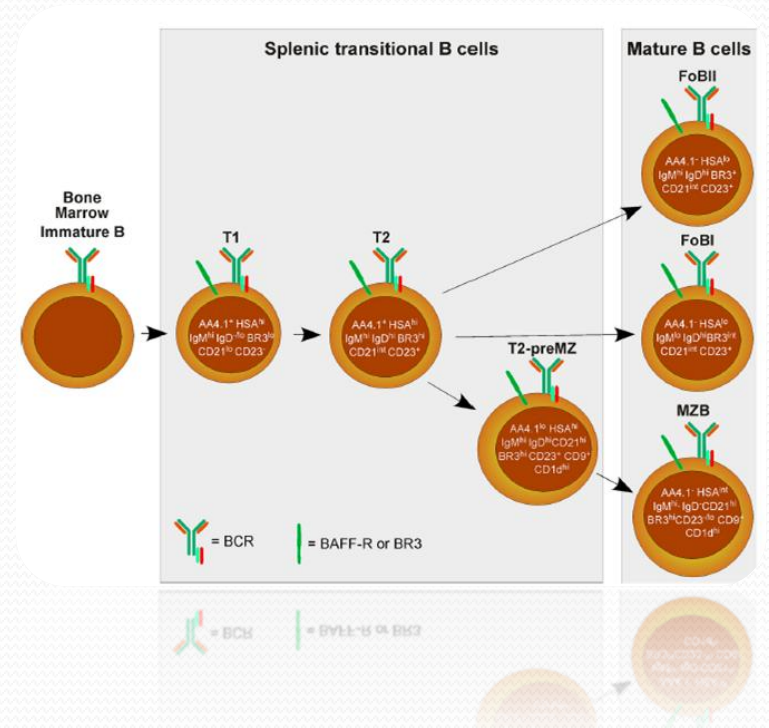
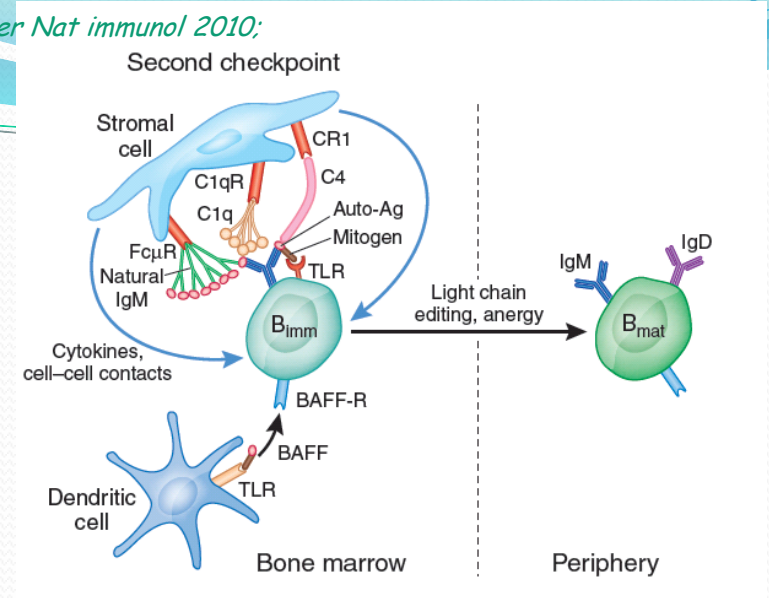


Ontogenia: LINFOCITO B

▶ Emigran de la MO (ya evaluadas?: selección positiva)

◦ Estadíos:

- T1: no expresa o tiene bajos niveles de IgD, CD21 y CD23
 - Fase donde ocurre la selección negativa y la gran mayoría muere (autoreactivas) o re-editan BCR
 - Altos niveles de Fas y ausencia de Bcl2
 - Activación del BCR=apoptosis
- T2: entran y sobreviven en el bazo y expresan IgM/IgD, CD21, CD23
- T3: CD23+ , bajos niveles de IgM



T2 se hace mas resistente a la apoptosis

Ontogenia:

LINFOCITOS, mecanismos de selección

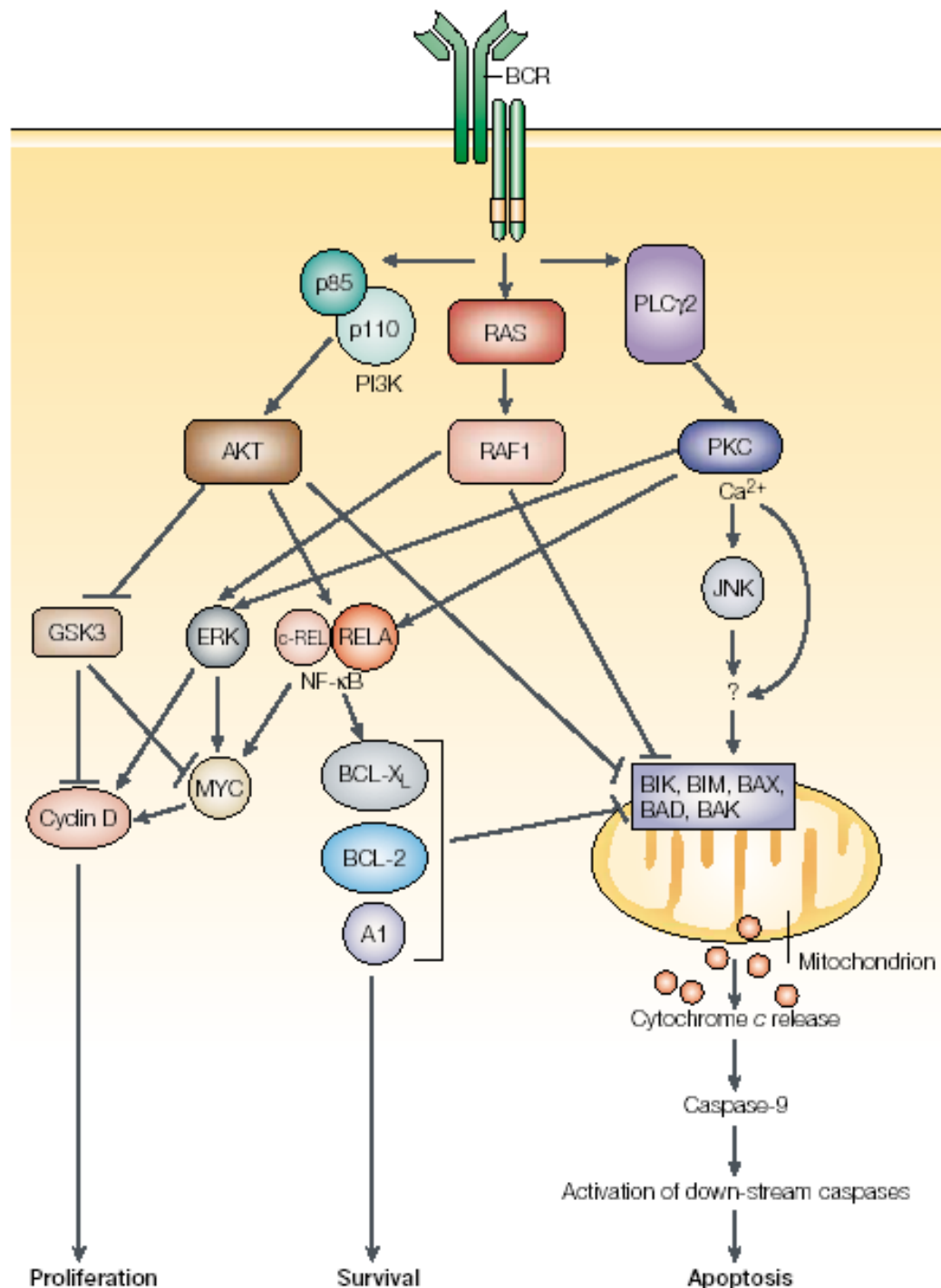
Selección positiva

Selección negativa:

- Muerte
- Anergia
- Re-edición del BCR

Escape de la selección negativa por cambio de la especificidad antigénica

- No es exclusivo de B, también se ha demostrado en T



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	-	+	++	++/- ^a	++/- ^a	-
HSA(J11d/30F1)	+++	++	+	++	++	++
CD43	+/-	-	-	++/- ^a	++/- ^a	
CD5	-	-	-	+	-	-
CD11b/Mac-1	-	-	-	+ ^b	+ ^b	-

^a part are ++ and part are -.

^b Only in peritoneal cavity; B-1 cells are CD11b/Mac-1⁻ in spleen.

T1, T2 = transitional (maturing) B cells.

MR = mature recirculating B cells.

MZ = marginal zone B cells.

AA4.1 = anti-CD5 B cells

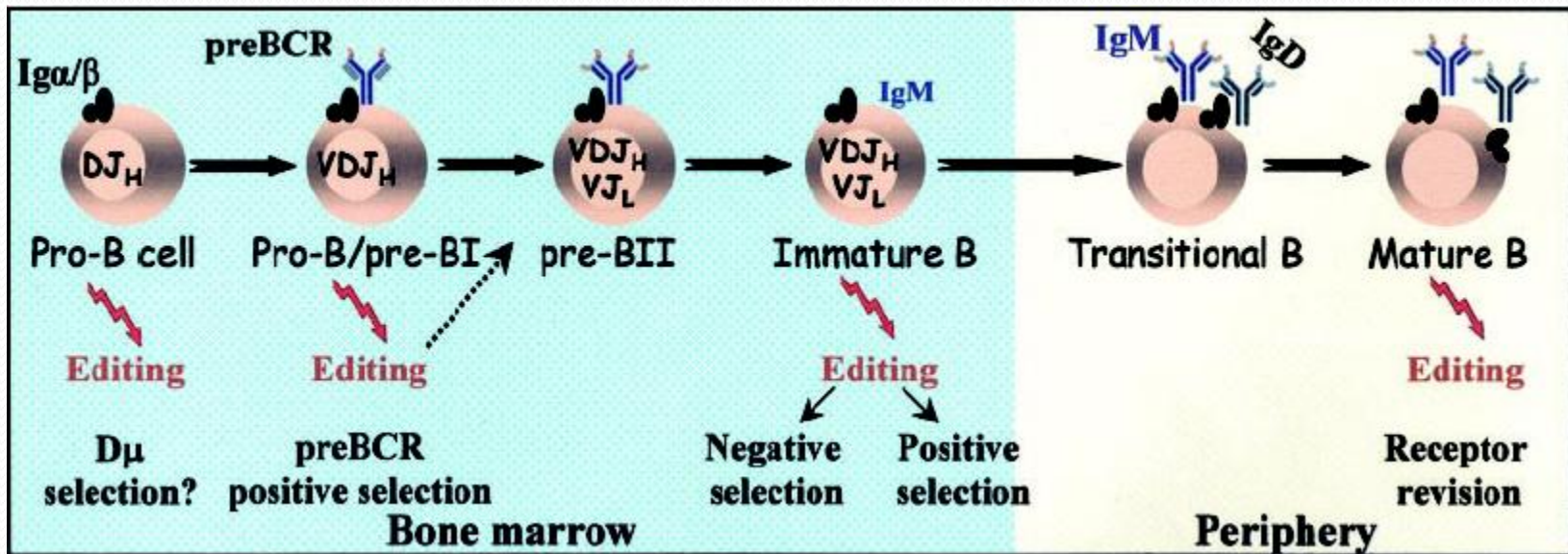
B220 = anti-B cell surface B cells

J11d/30F1 = anti-HSA (anti-HSA) B cells

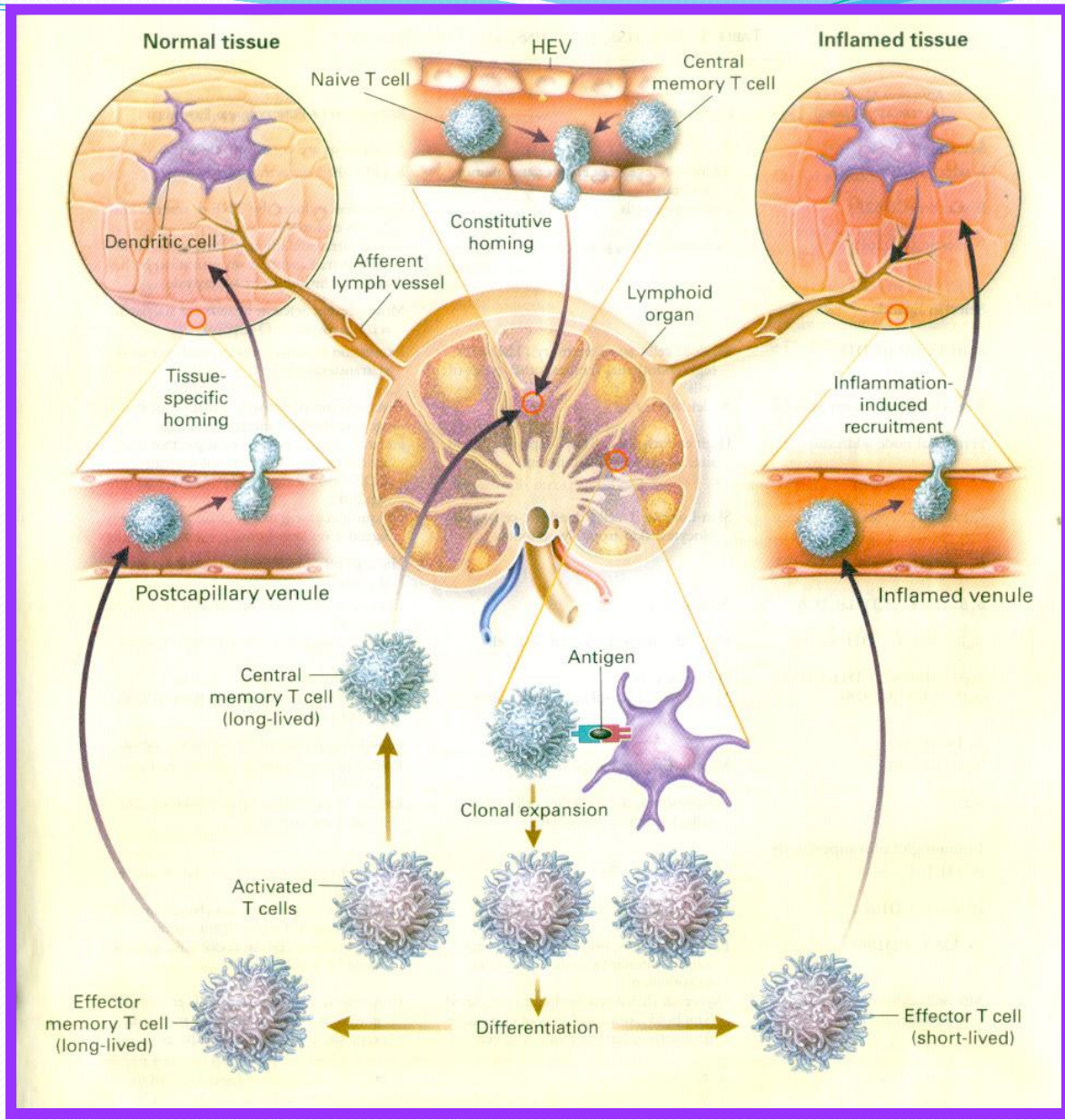
CD11b/Mac-1 = anti-CD11b/Mac-1 in spleen

CD5 = anti-CD5 B cells

Resumen

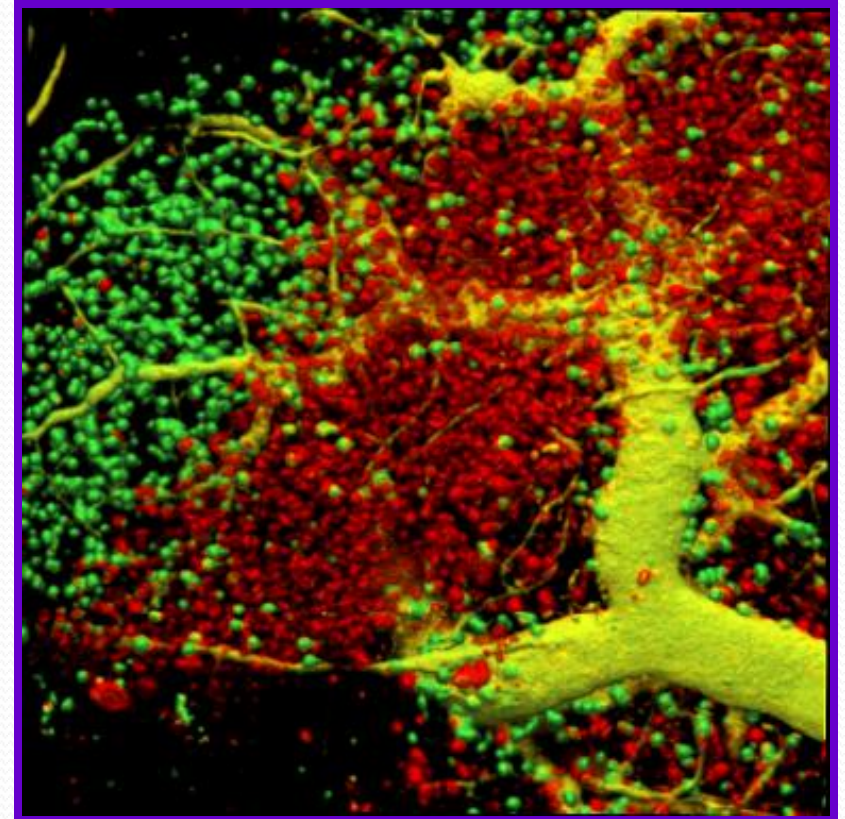


¿Que eventos regulan la migración y alojamiento dentro de un tejido o de un tejido a otro?



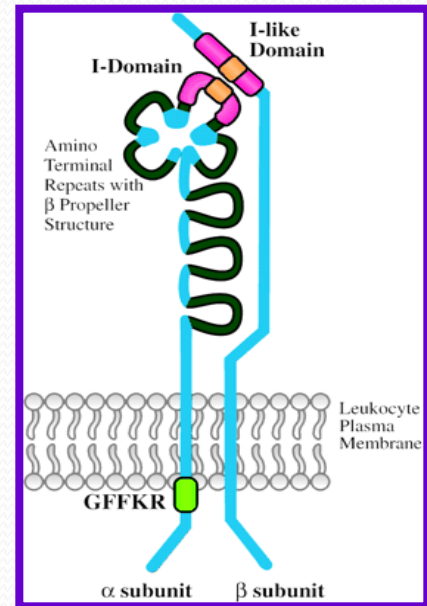
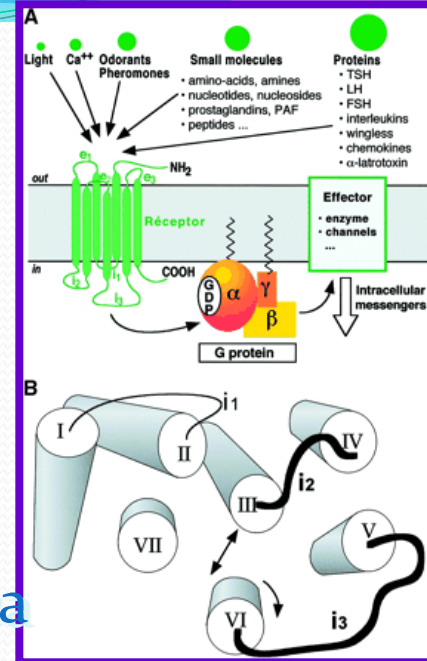
Recirculación y alojamiento de los leucocitos: ¿De qué depende?

- 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

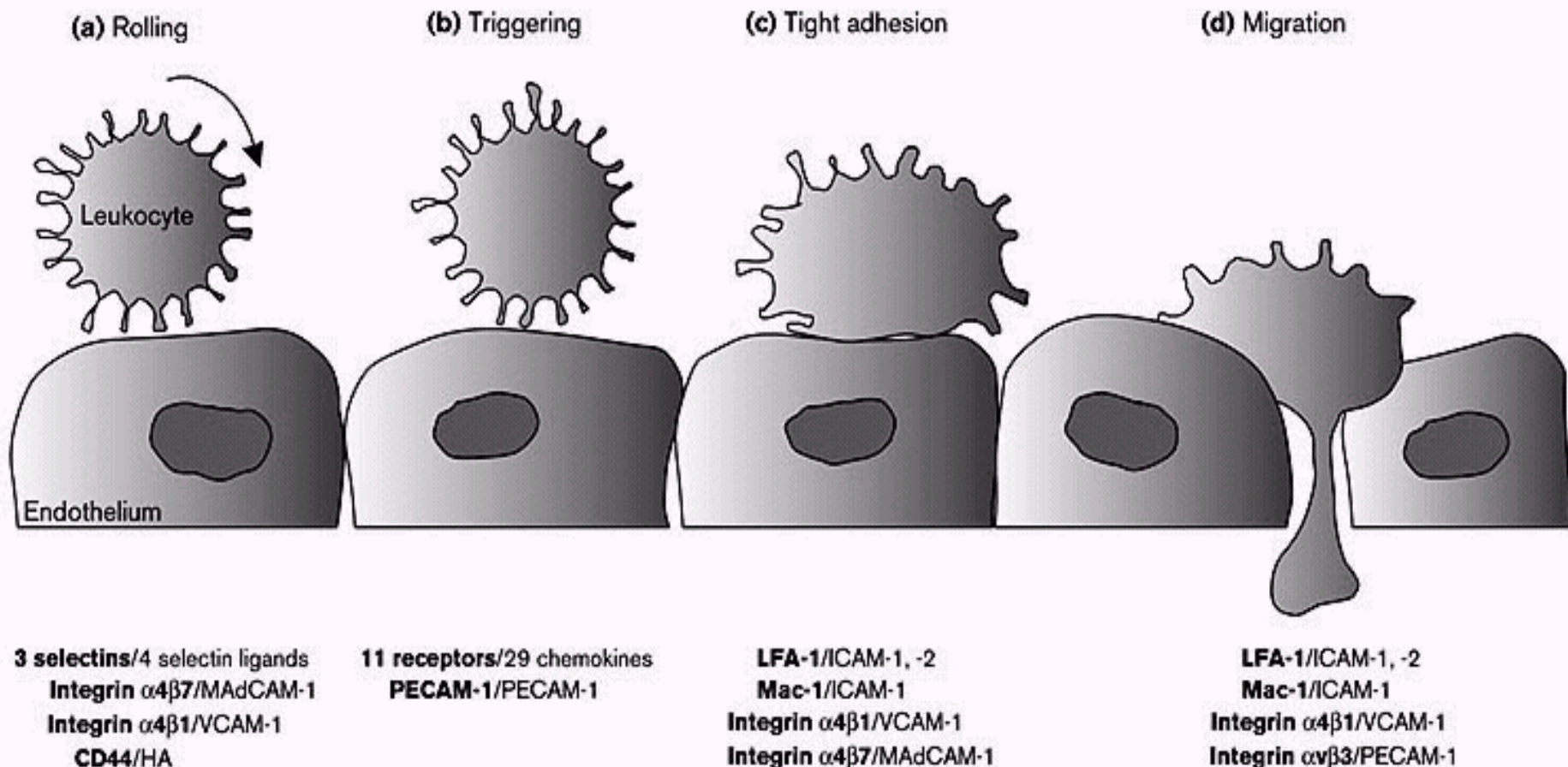


Migración de leucocitos: ELEMENTOS QUE PARTICIPAN

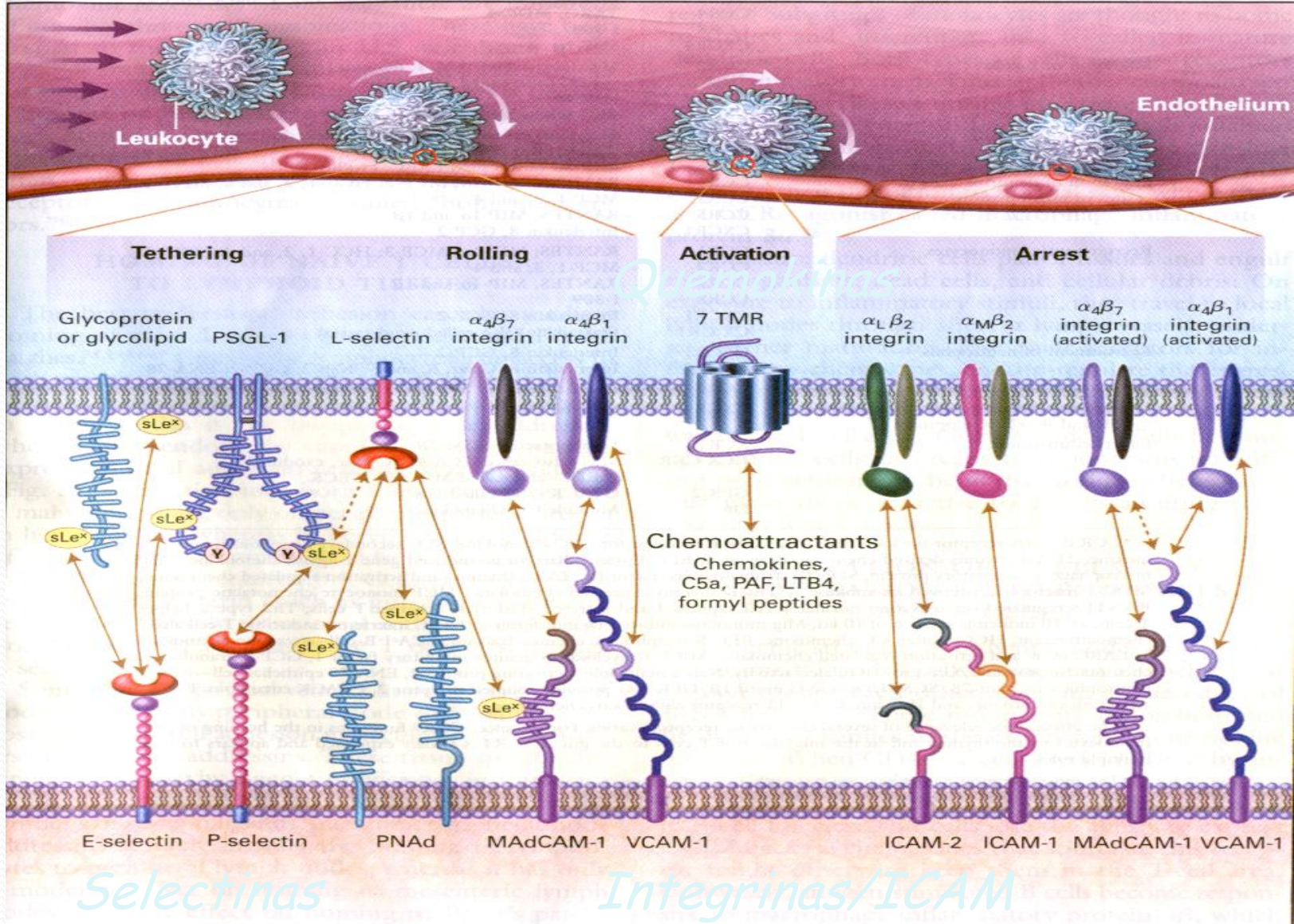
- Quemokinas y sus receptores
 - Interleukinas con capacidad quimiotáctica
- Integrinas
- Cadherinas
- Selectinas
- ICAM



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

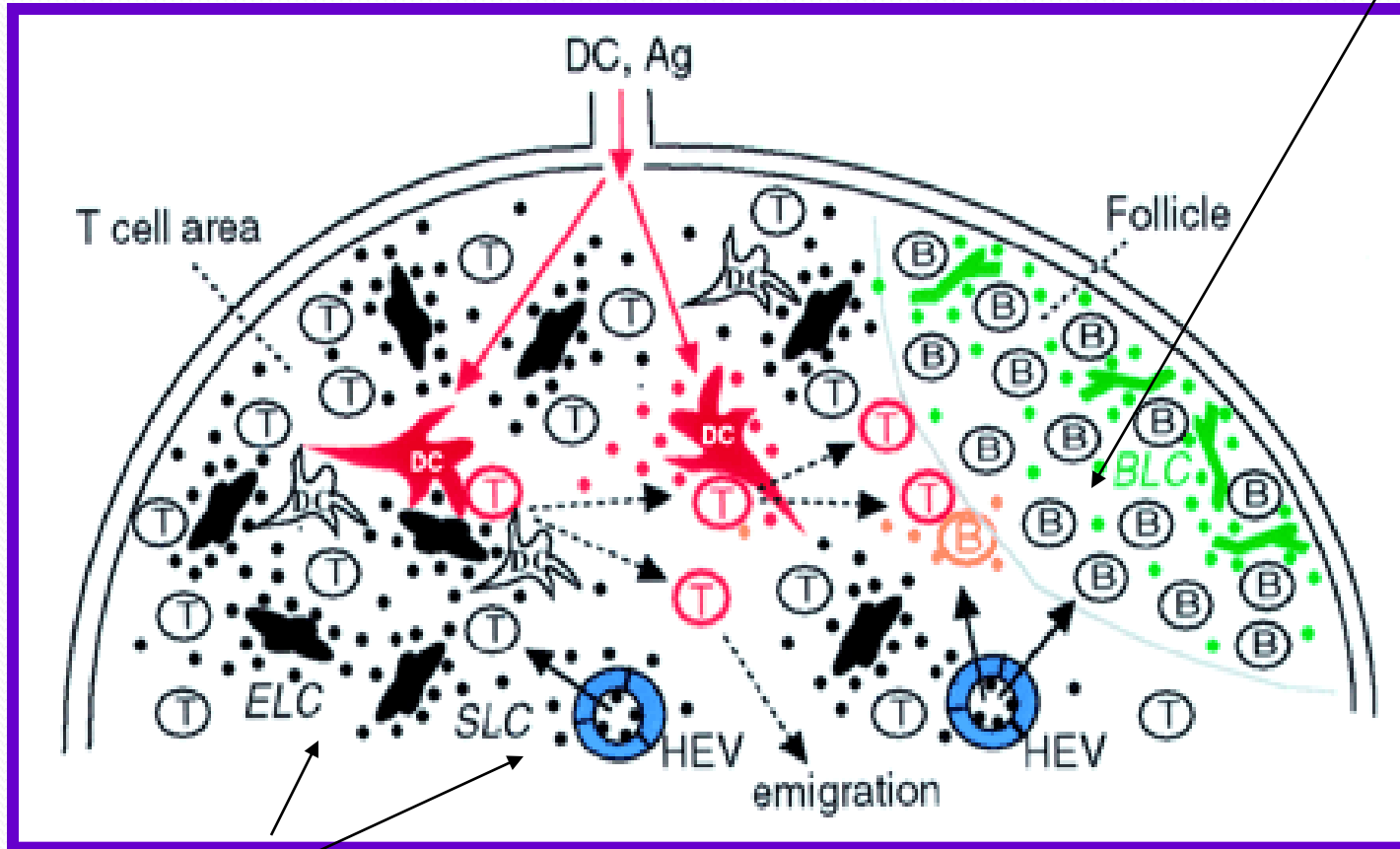


Recirculación de linfocitos



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

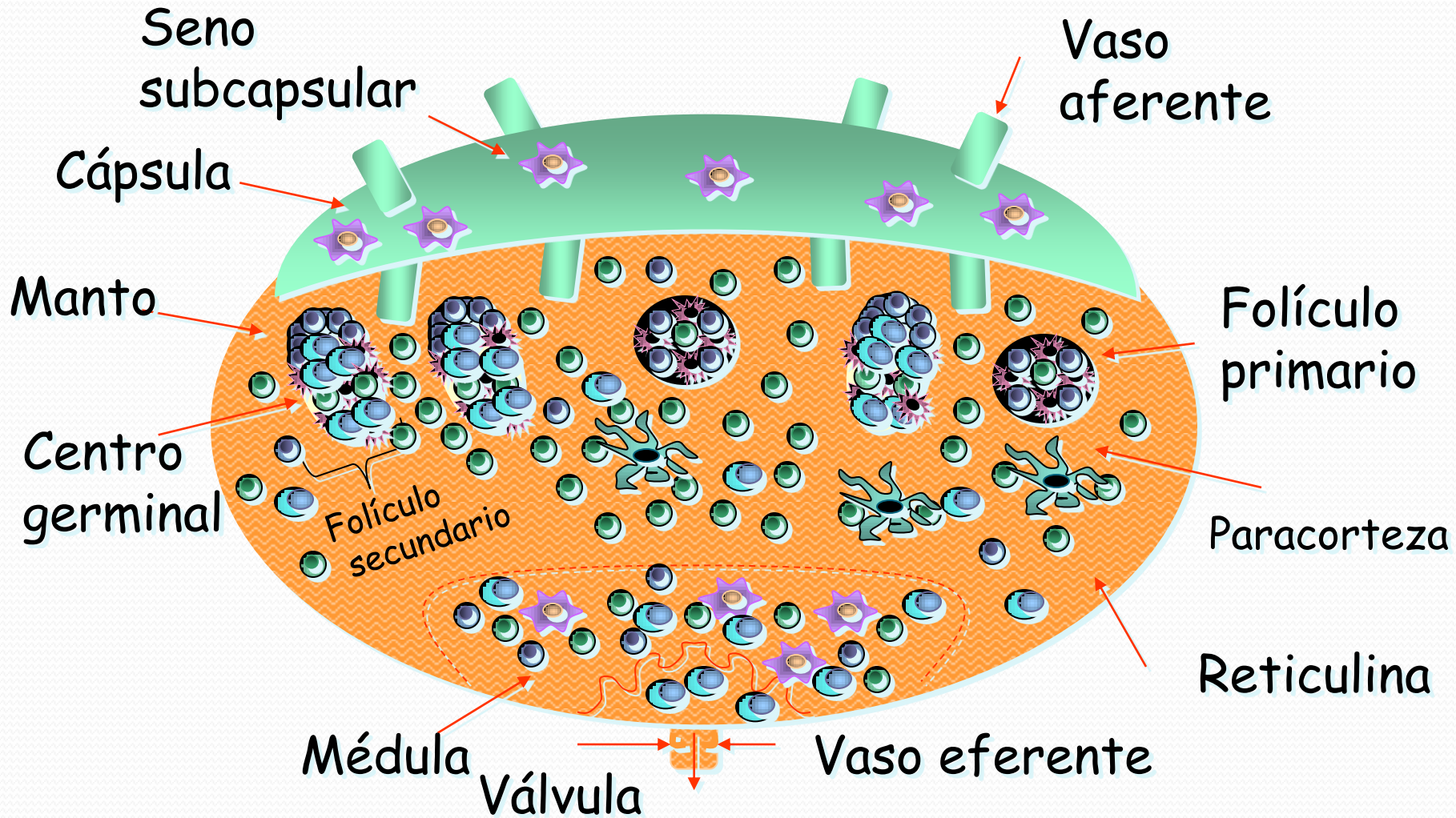
CCR7:
Expresado sobre los linfocitos T "naive" y DC maduras

Órganos secundarios y maduración final de los linfocitos

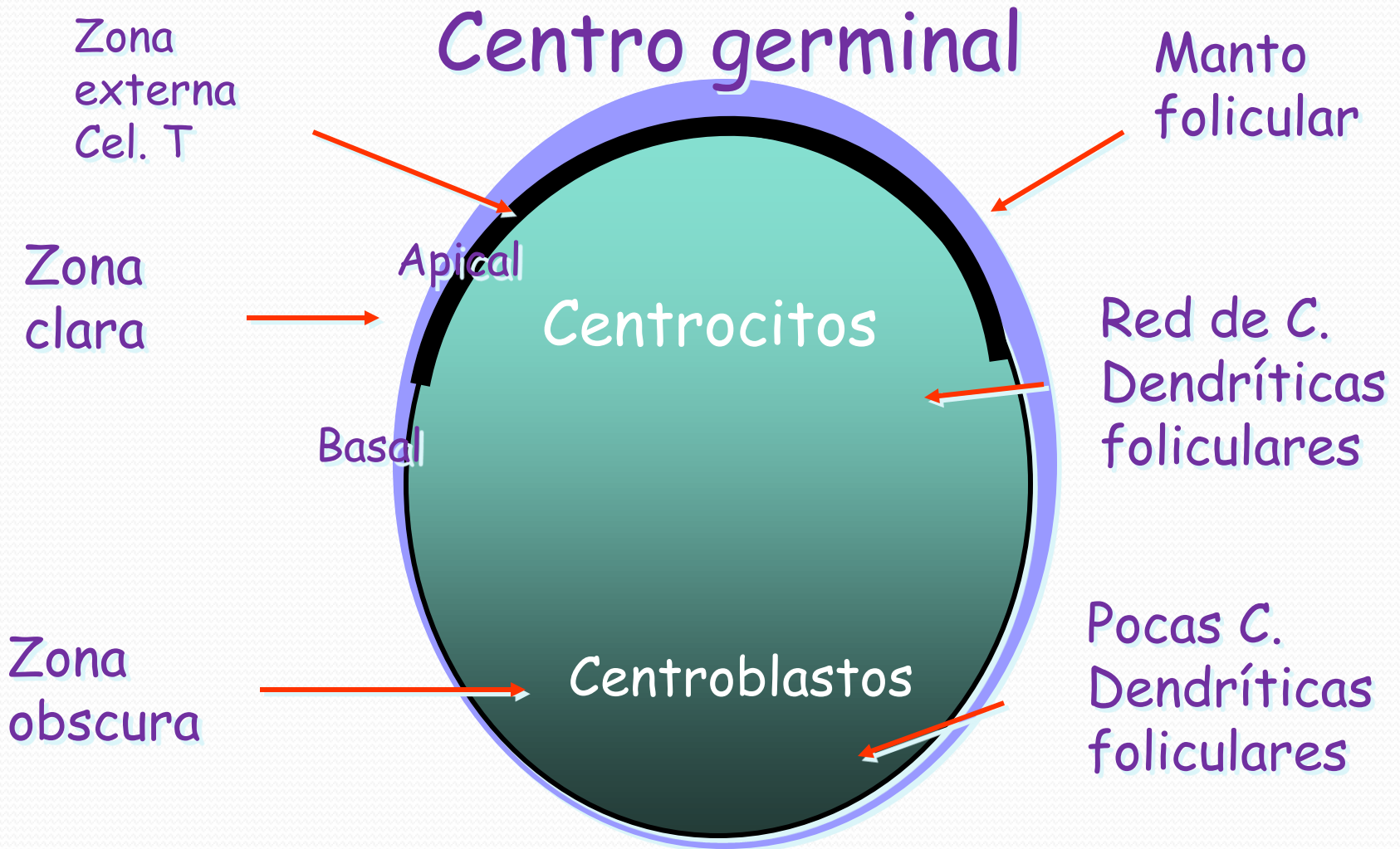
Órganos secundarios

- 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”

Órganos secundarios: nódulos linfáticos, sitio de activación de la respuesta inmune

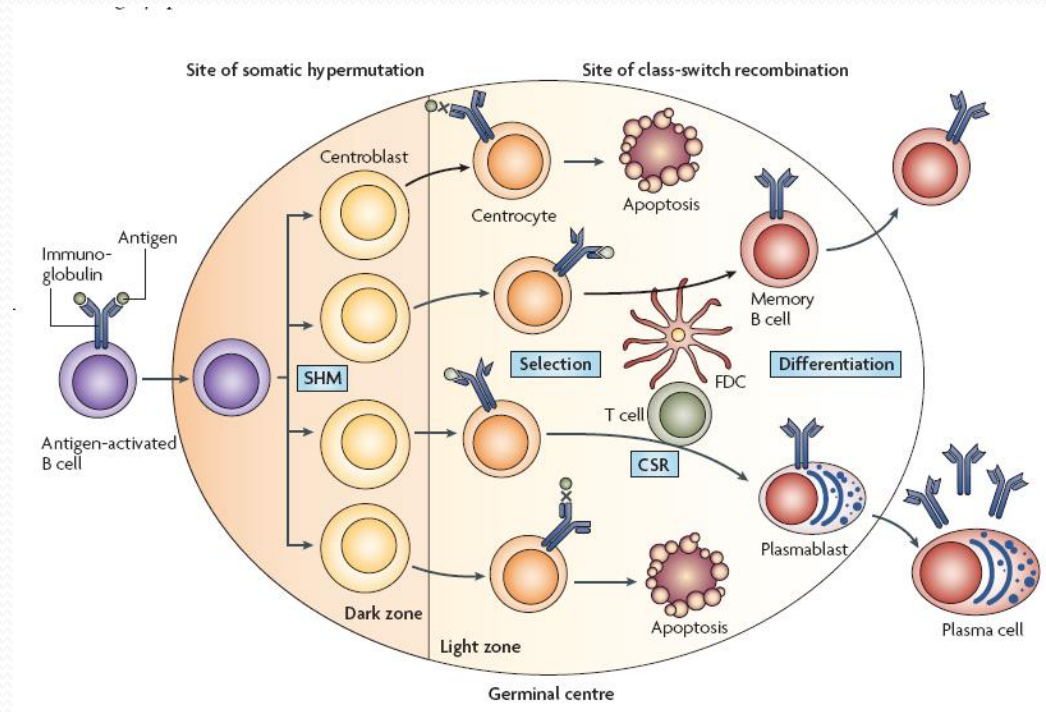


Órganos secundarios: Folículo secundario



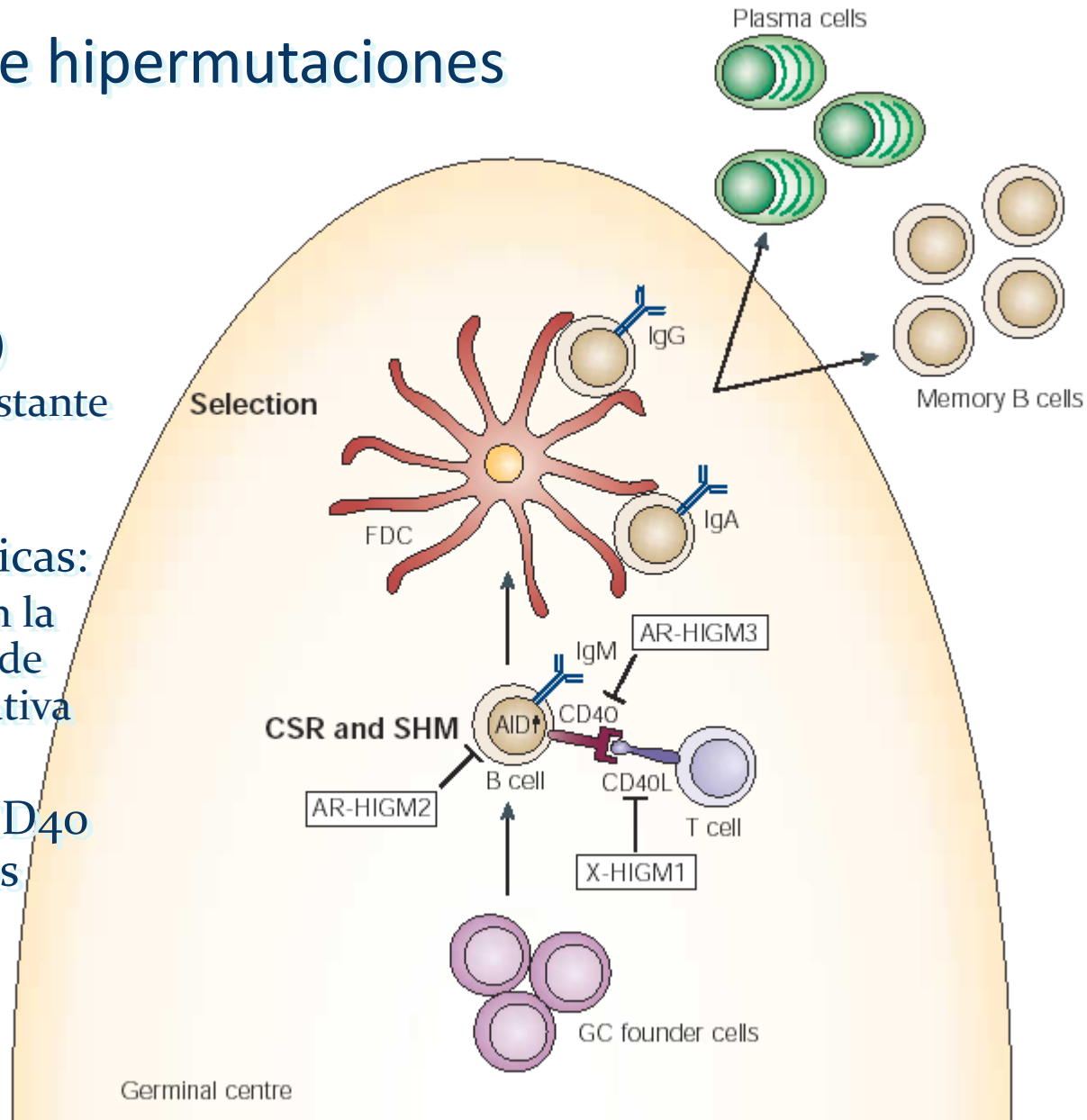
Órganos secundarios: Folículo secundario

- Centroblastos, completan su ciclo de replicación 6-12 horas
- Son altamente susceptibles a la apoptosis



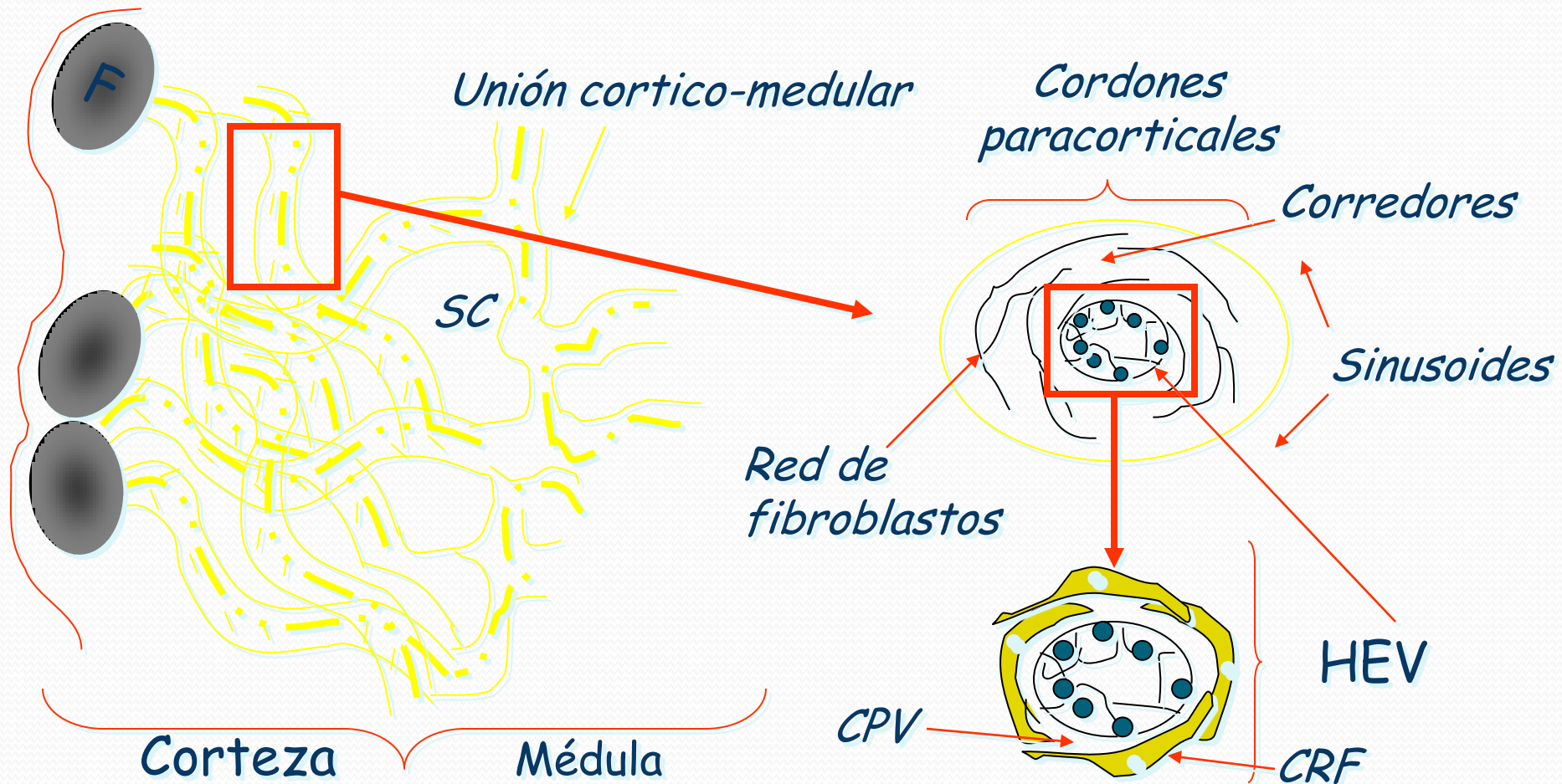
Ontogenia: CSR e hipermutaciones somáticas

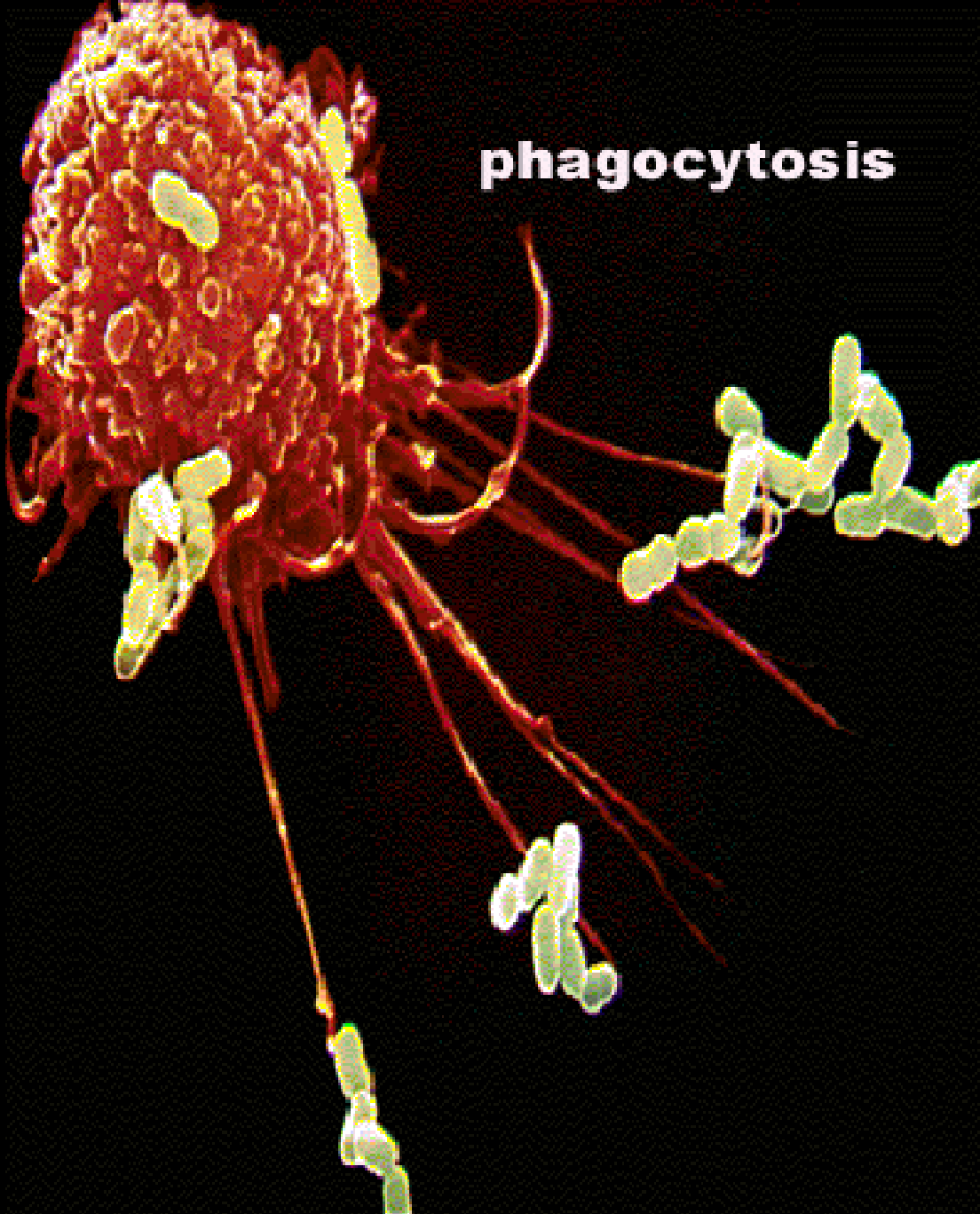
- ▶ Cambio de isotipo (CSR)
 - Cambio de la región constante conservando la misma especificidad antigénica
- ▶ Hipermutaciones somáticas:
 - Introduce mutaciones en la región variable, seguido de selección positiva o negativa
- ▶ Ambos activados por la interacción entre BCR/CD40 en los centros germinales



Órganos secundarios: nódulos linfáticos

Cordones paracorticales:





phagocytosis

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

Problema

- La proteína BTK (una tirosin kinasa de los linfocitos B), involucrada en la ontogenia de los linfocitos B, media la transición de células pro-B a pre-B y participa en la activación de los linfocitos B maduros. Ciertas mutaciones en el gen que codifica para esta proteína conducen a fallas en su expresión originando un síndrome conocido como Agammglobulinemia ligada al cromosoma X o Síndrome de Bruton.

Interrogantes

- a) ¿Cual elemento del sistema inmunológico se encuentra alterado en estos pacientes?
- b) Explique la ontogenia de los linfocitos B
- c) Si se realiza post-mortem una biopsia de los nódulos linfáticos, ¿Que modificaciones en el microambiente esperaría encontrar?
- d) Uno de los productos finales de la activación de los linfocitos B es la secreción de anticuerpos (inmunoglobulinas). ¿qué niveles de inmunoglobulinas esperaría encontrar en el suero del paciente?

Problema 2

- La falta de expresión de la molécula de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en la superficie de las células presentadoras de antígeno profesionales, es debida mutaciones en los factores de transcripción responsables de activar la transcripción del gen que codifica para MHC-II (RFX5, CIITA). Este trastorno molecular conduce a un cuadro de inmunodeficiencia severa causado por alteración en el desarrollo de los linfocitos T.

Interrogantes

- a) Explique cual es el papel de la presentación de antígenos en el contexto de MHC- II y MHC- I a nivel de los órganos linfoides primarios.
- b) Explique como se genera el proceso de selección positiva y negativa durante la ontogenia de los linfocitos y cual es el papel de las moléculas de histocompatibilidad en este proceso.
- c) ¿Que consecuencia tiene sobre la tolerancia a los tejidos propios la alteración de los mecanismos de selección positiva o negativa?