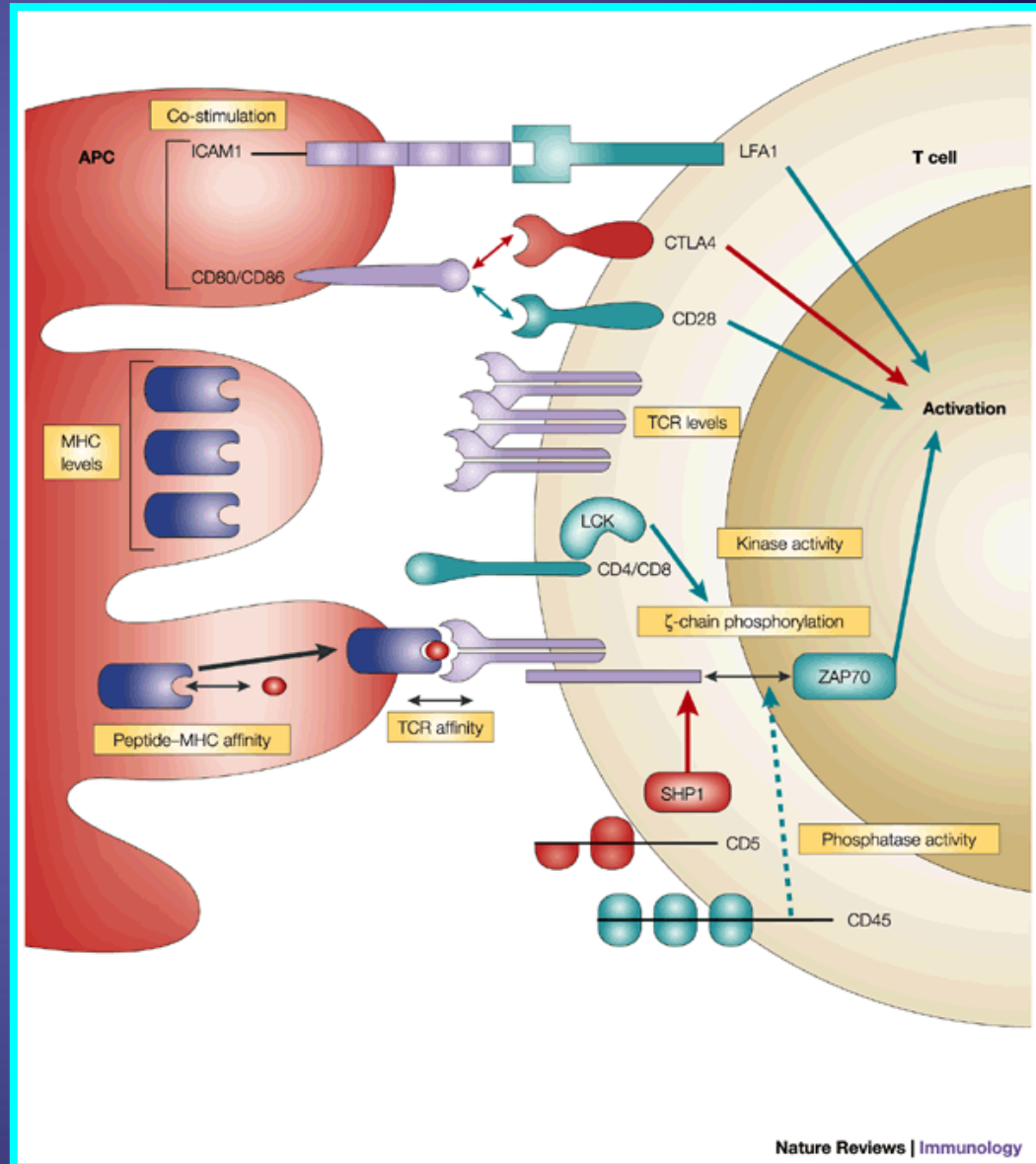


Ontogenia de linfocitos

- 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)

Ontogenias de linfocitos

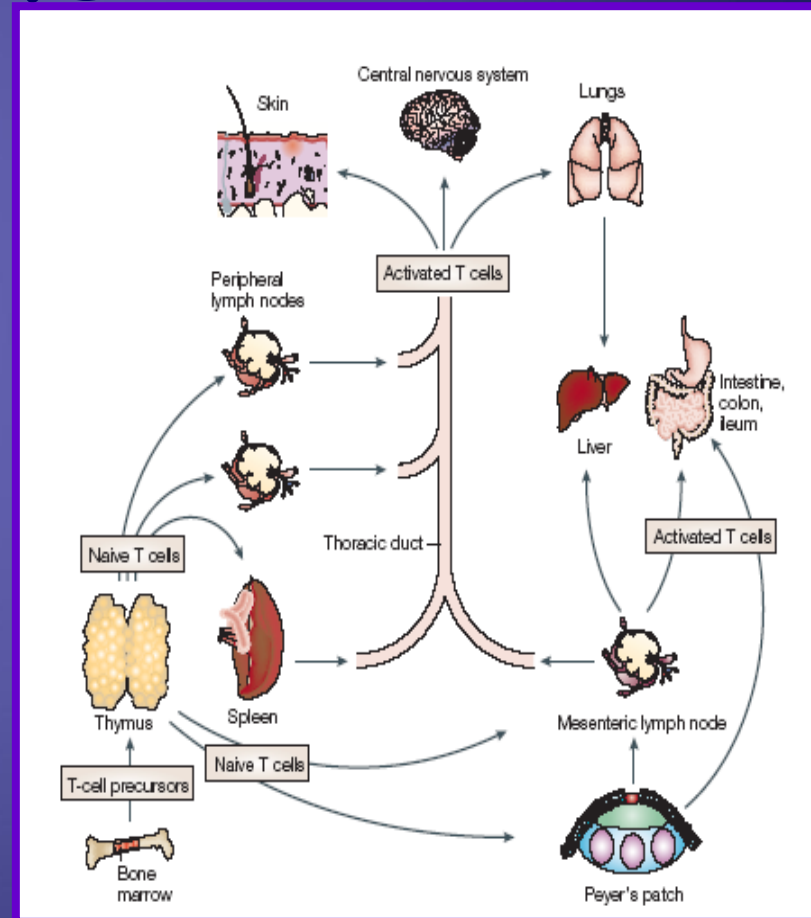
- Elementos que participan
 - Célula progenitora pluripotencial
 - Mediadores solubles
 - Interacción entre las células linfoides con elementos del microambiente

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)

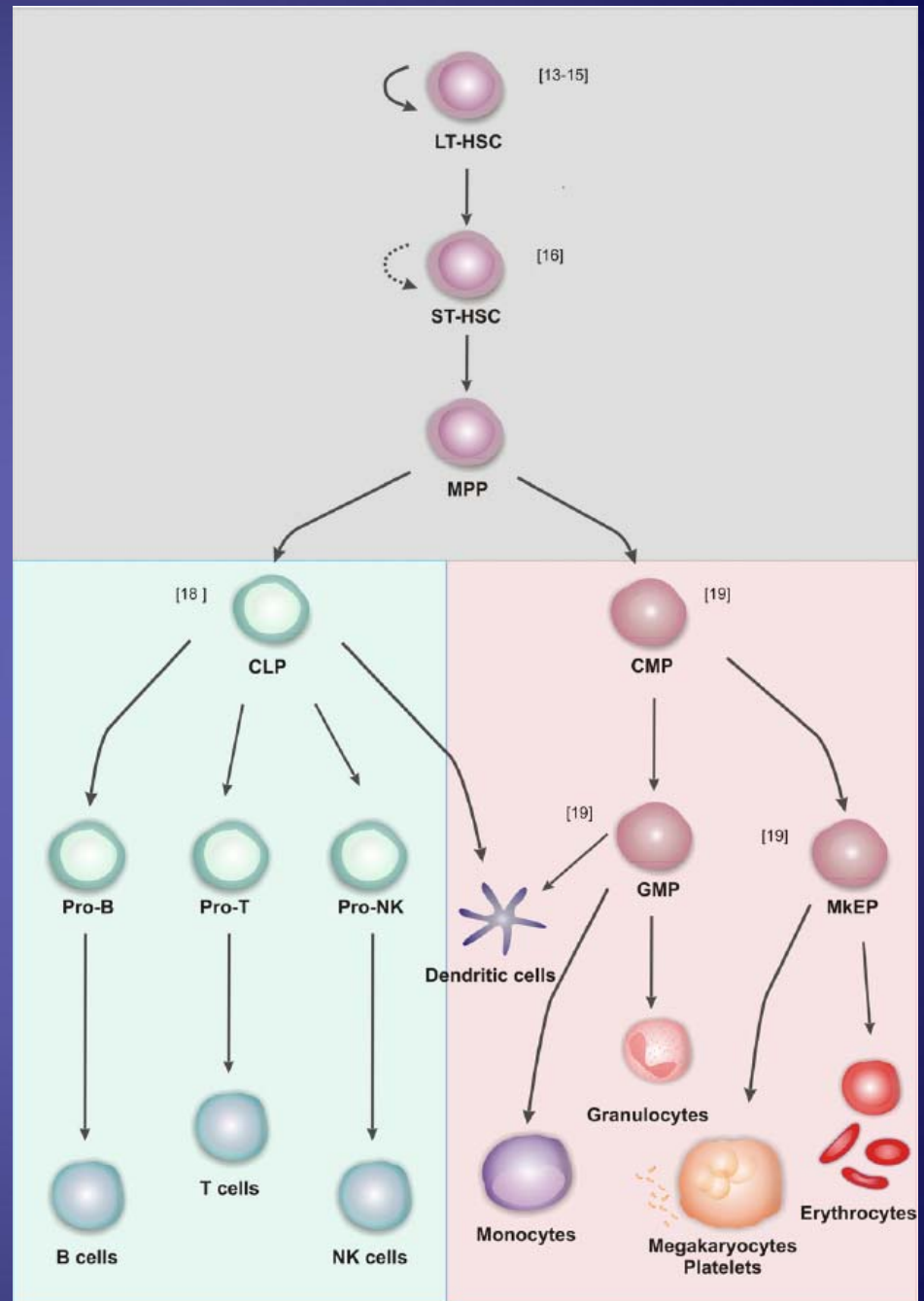
Órganos del sistema inmune

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



Órganos primarios y ontogenia

Ontogenia de linfocitos

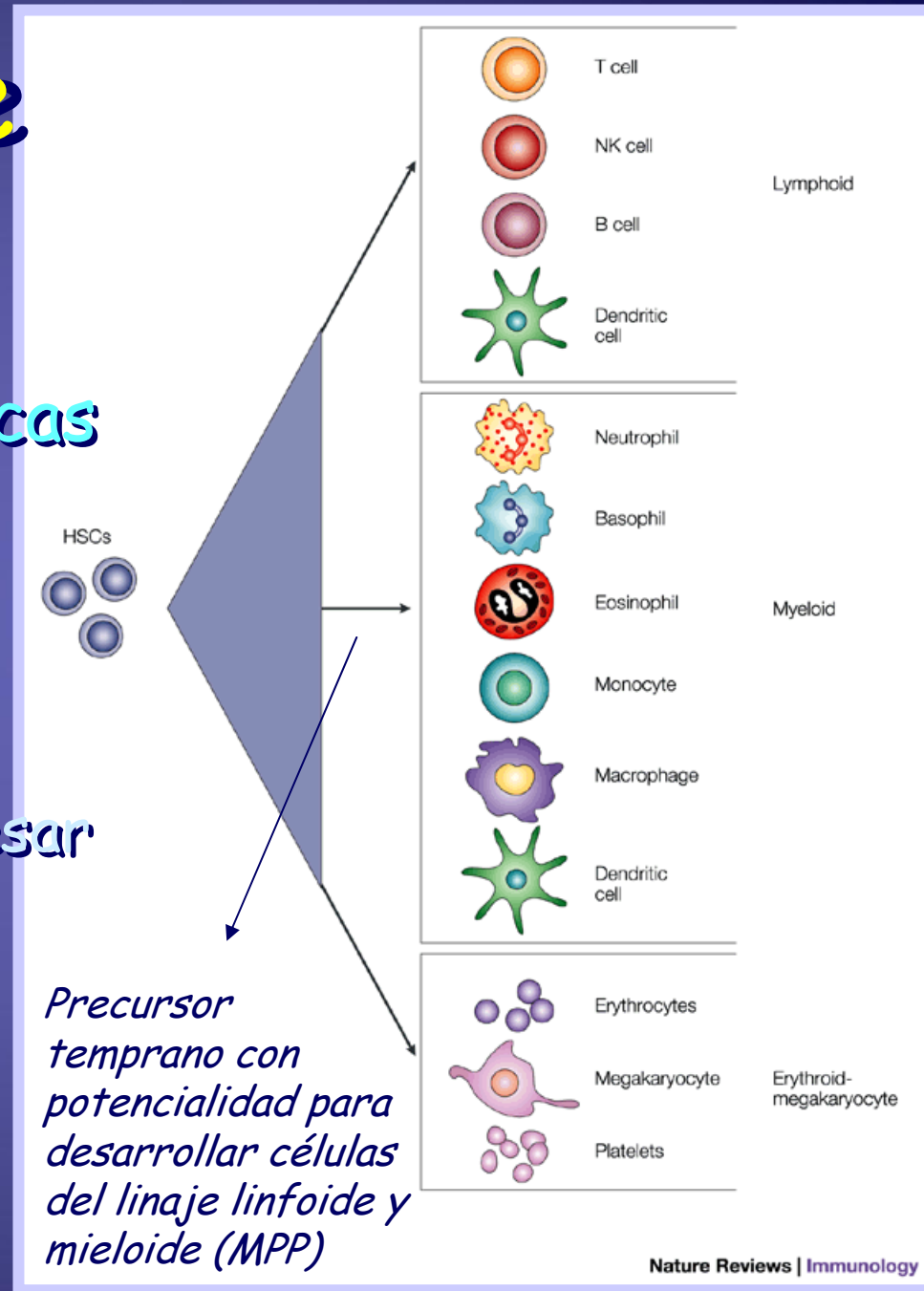


Luc et al Semin Imm 2008,20: 213.
Cobadela Curr Opin Imm 2008,
20:139

Ontogenia de linfocitos

- Células hematopoyéticas (HSC):

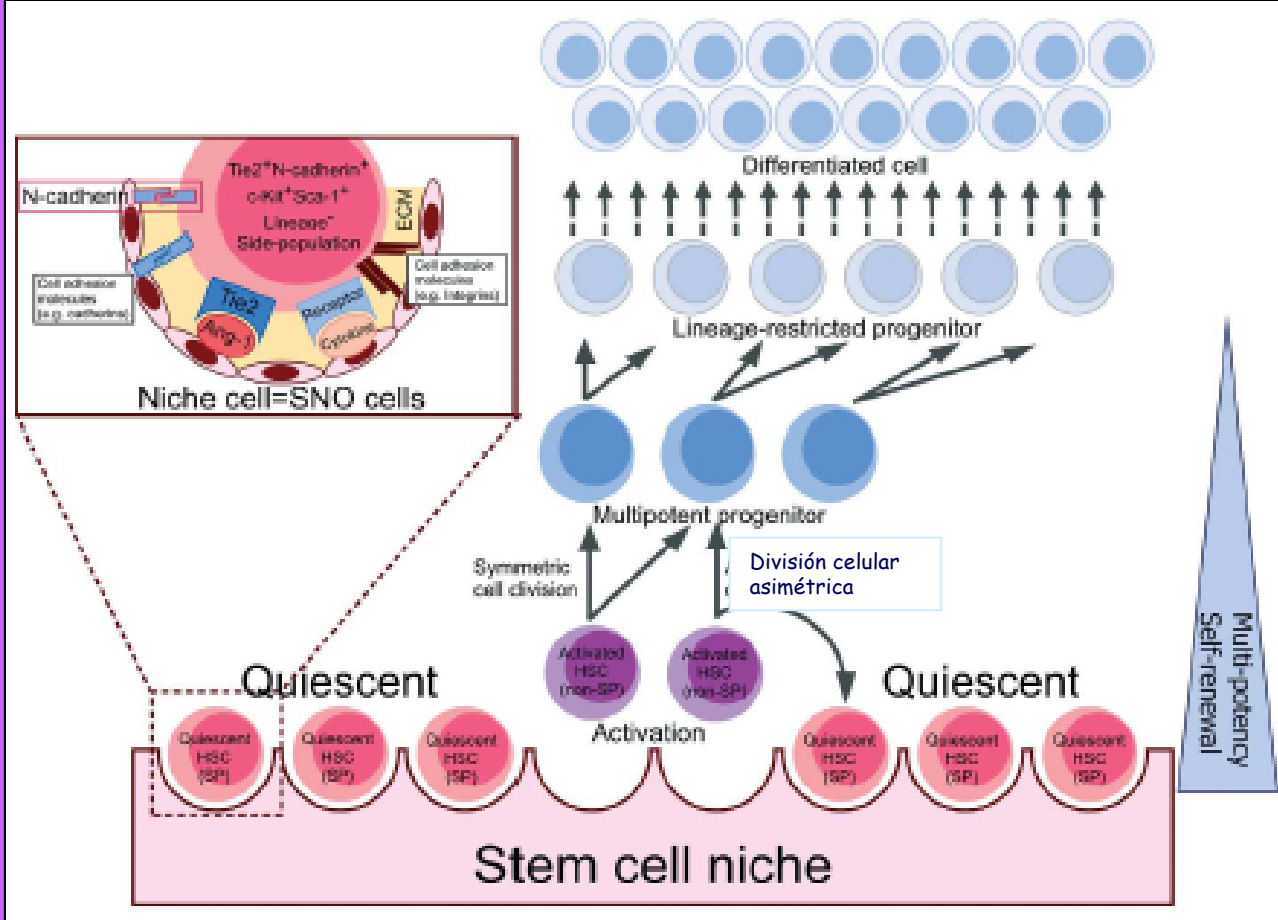
- Se alojan en la médula ósea
- Fenotípicamente son reconocidas por expresar CD34
- Actividad de la telomerasa y autorenovación



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-cadherina e integrinas.



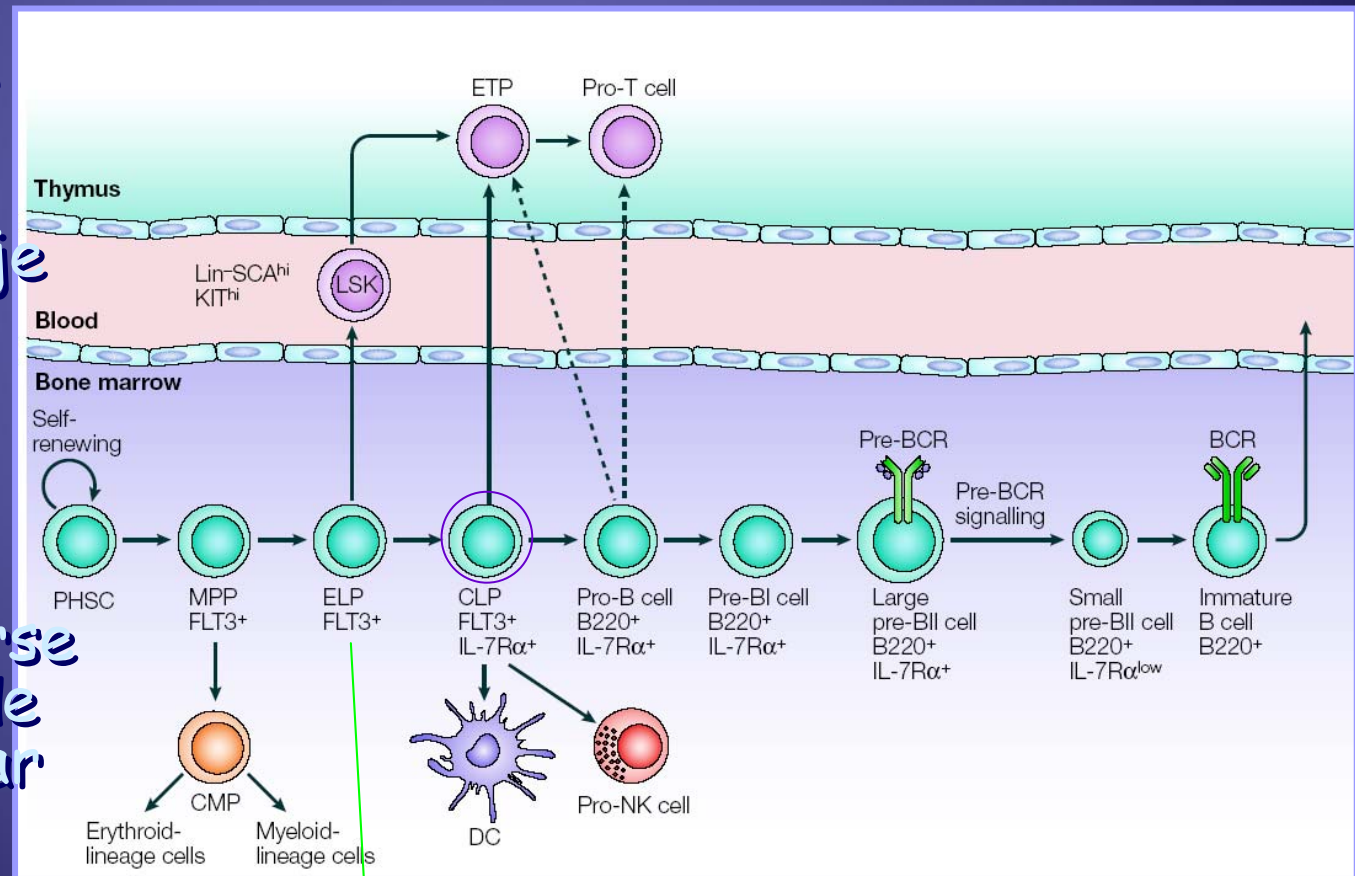
Características de las HSCs en reposo

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 y VCAM-1 a osteoblastos
3. Hipoxia en los nichos

Ontogenia de linfocitos

CLP: precursor linfoide común
CMP: precursor mieloide común

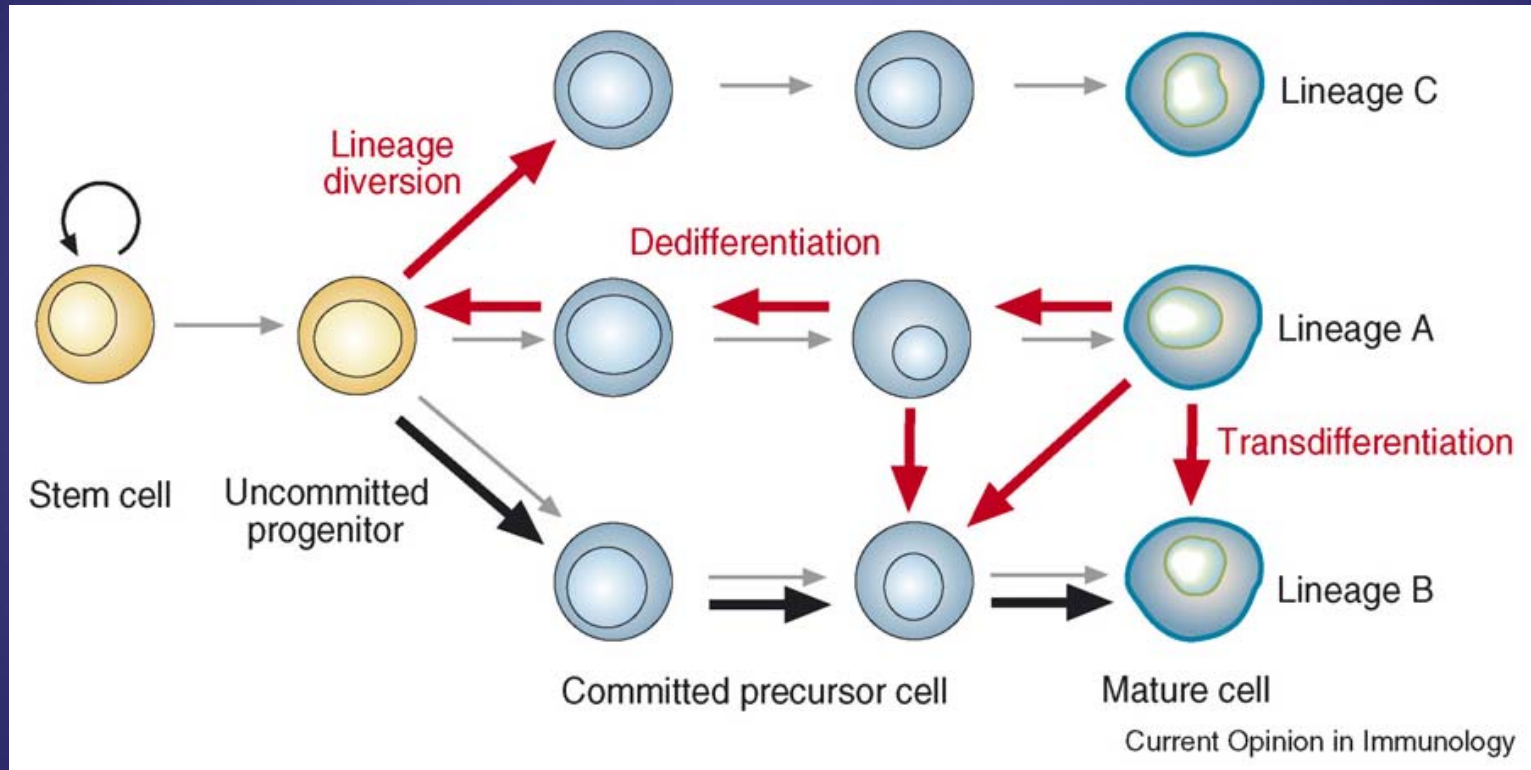
- **Primer paso:** Progenitor multipotencial origina el linaje linfoide y mieloide
- En ciertos estadios de maduración puede revertirse el desarrollo de un linaje celular



Comienza a expresar Rag (recombinasas)

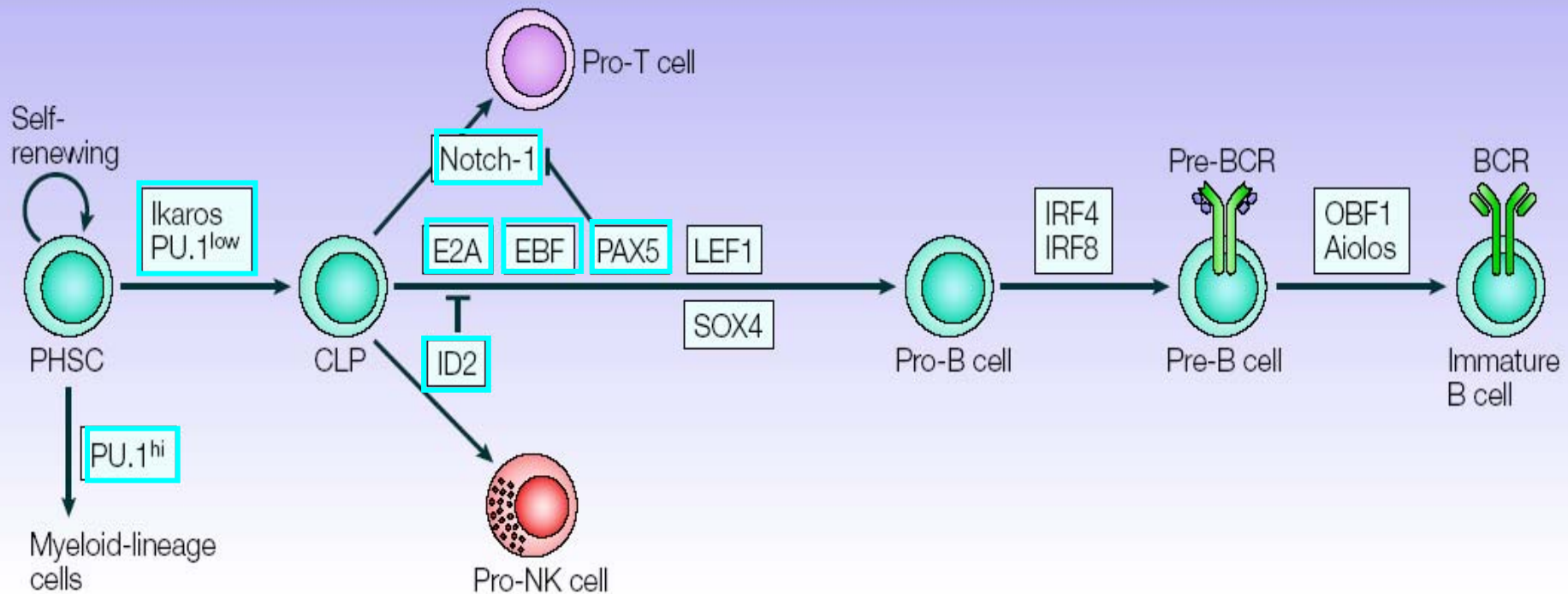
Ontogenia de linfocitos

Plasticidad del desarrollo



Estos procesos no ocurren en condiciones fisiológicas. Sin embargo, estos procesos de conversión de linaje pudieran ocurrir en condiciones anormales (enfermedad)

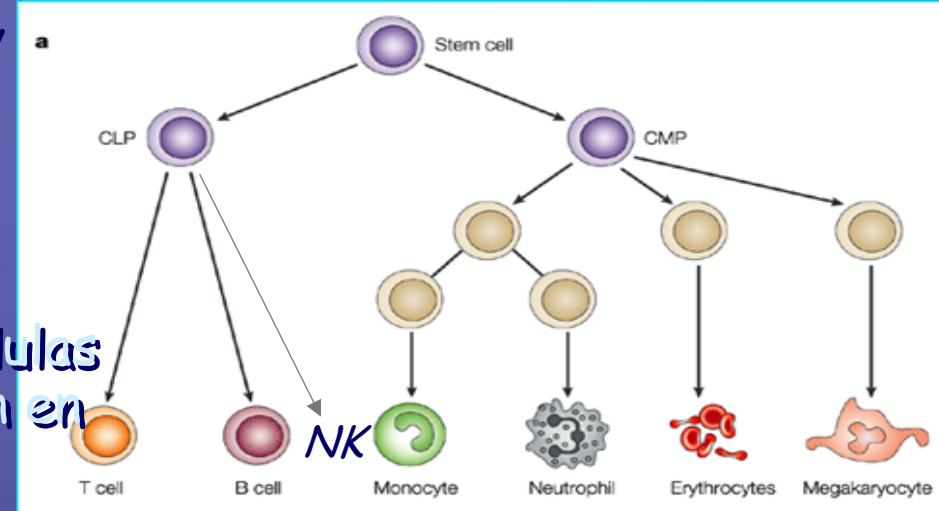
Que elementos contribuyen con la decisión: Linaje mieloide vrs linfoide o Lin T vrs B



Factores de transcripción involucrados en el desarrollo

Ontogenia: SERIE LINFOIDE

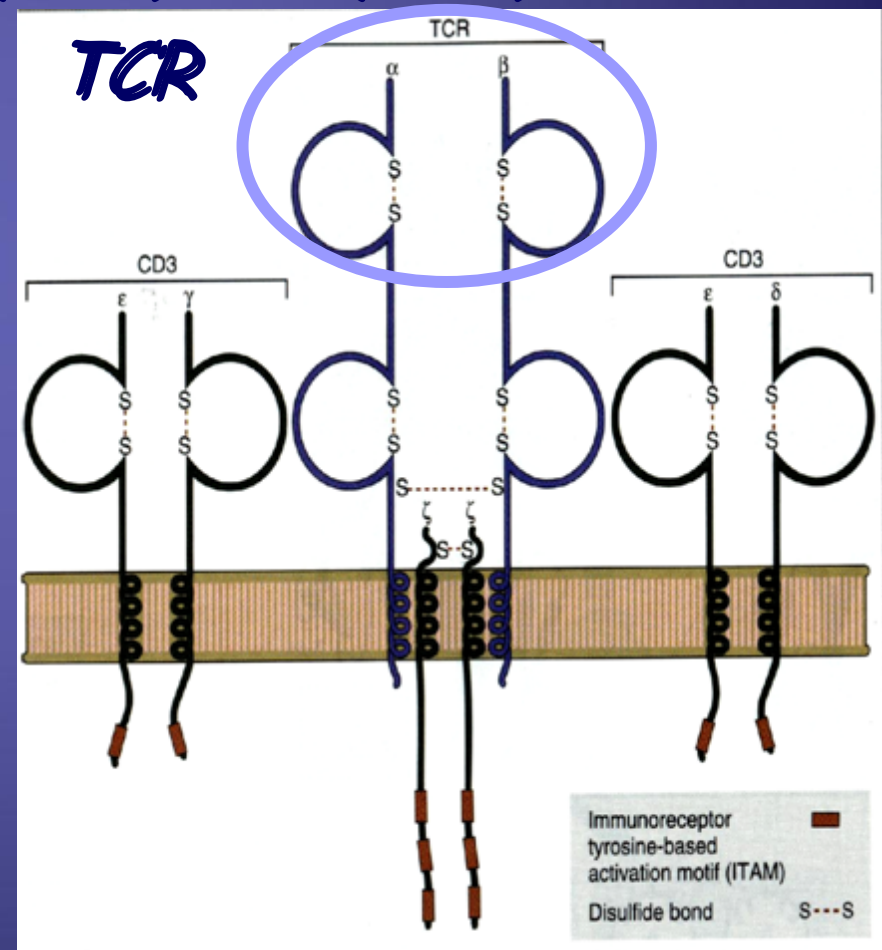
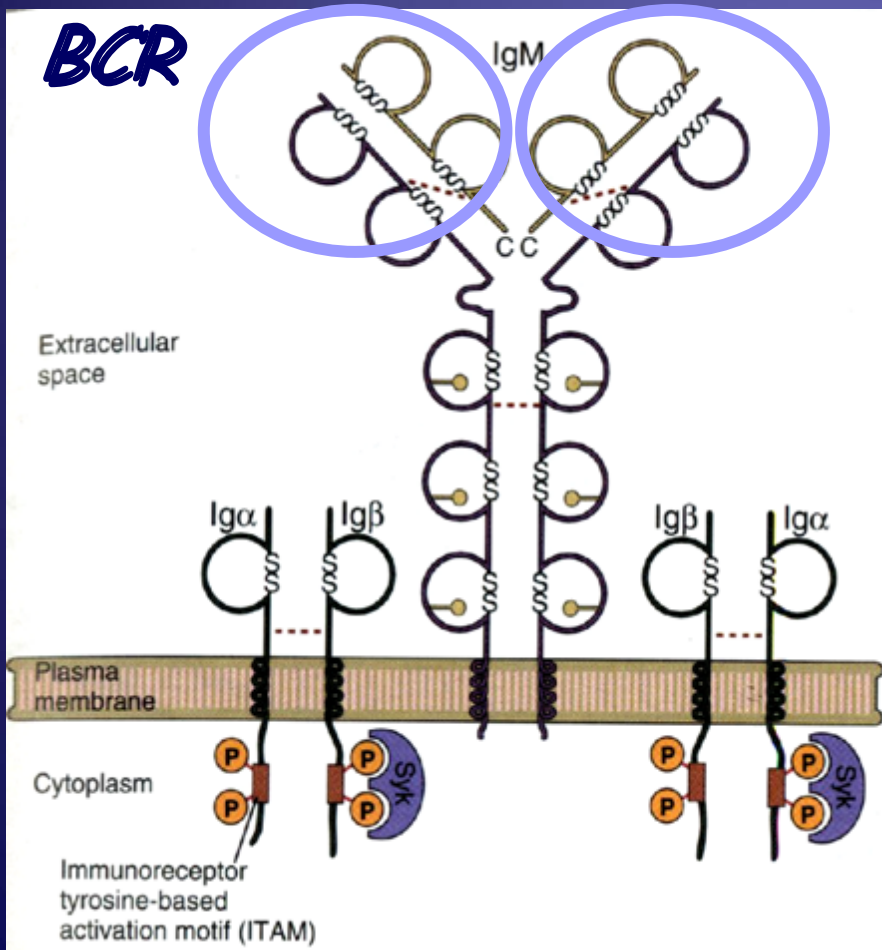
- Los linfocitos T, B y NK se originan de un precursor
 - El primer evento es ubicarse en estadio *precursor linfoide común* (CLP), dará origen a: T, B, NK y células dendríticas de origen linfoide (plasmocitoides)
 - Destinados a originar células B permanecen en la MO
 - Destinados a madurar como células 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



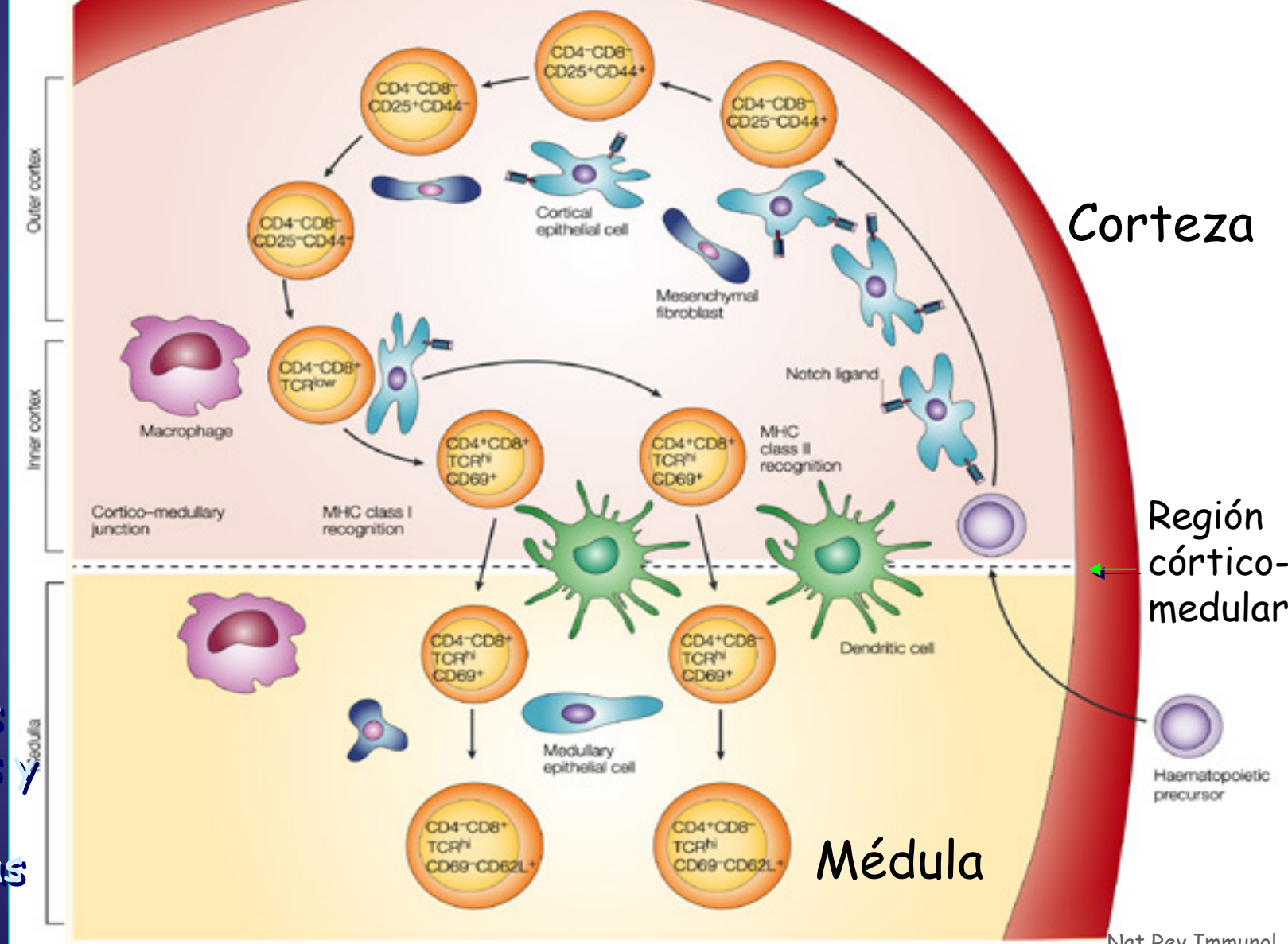
CD4 o CD8

TCR: cadenas α y β
(γ y δ) asociados
con CD3 ($\gamma, \delta, \epsilon, \eta$ 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 CD4 o CD8

Microambiente tímico



Corteza

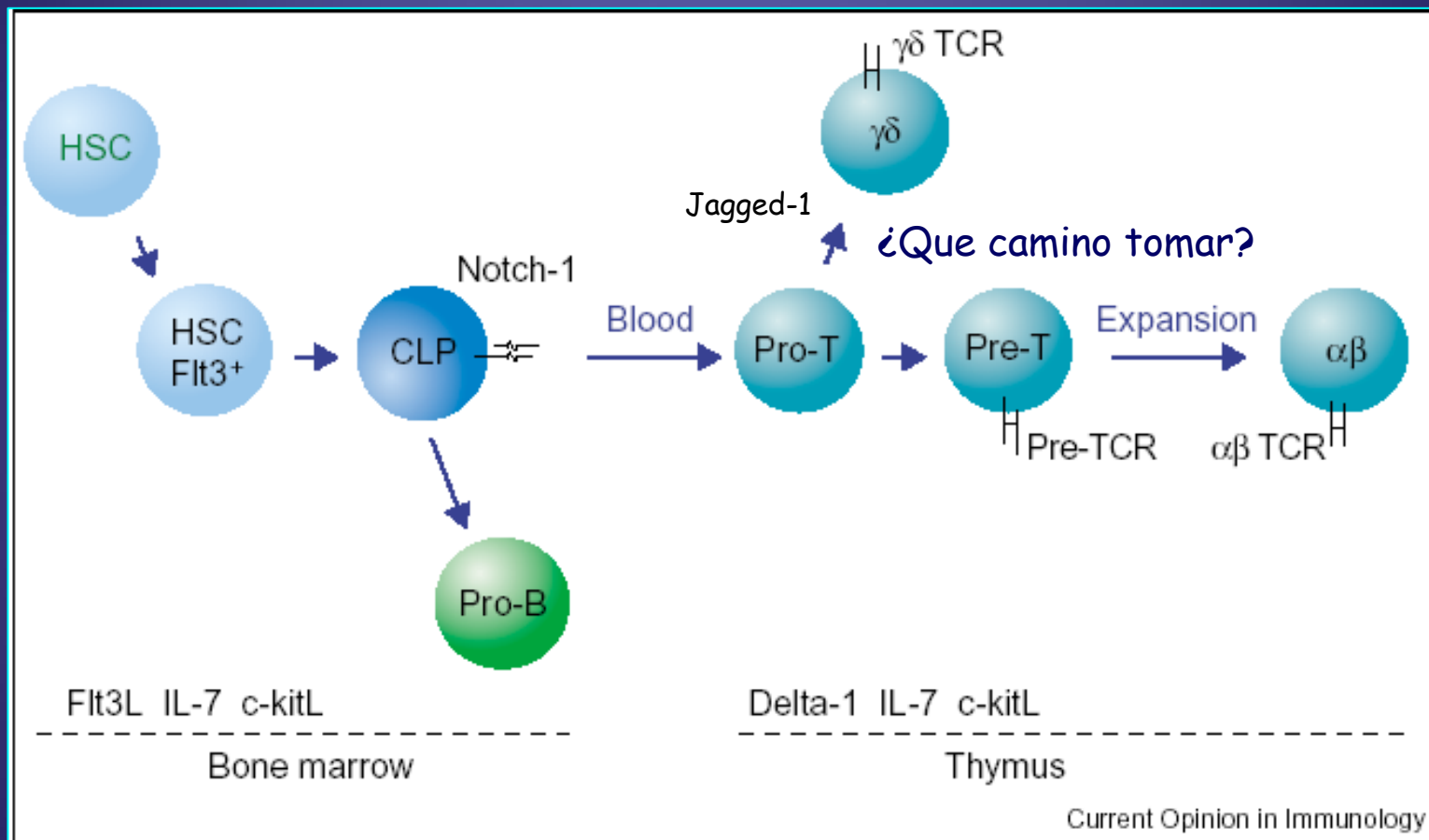
Región
córtilo-
medular

Médula

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

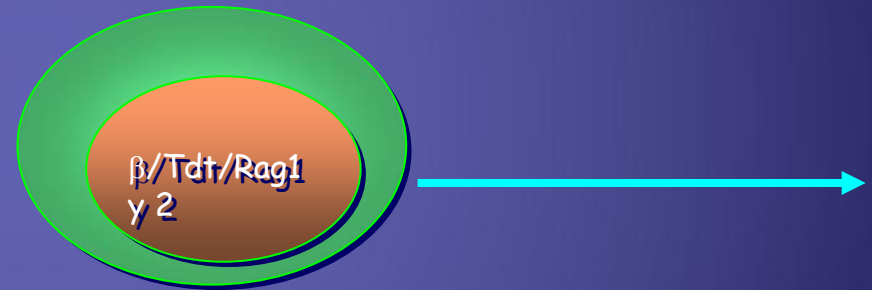
Ontogenia de Linfocitos T

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)

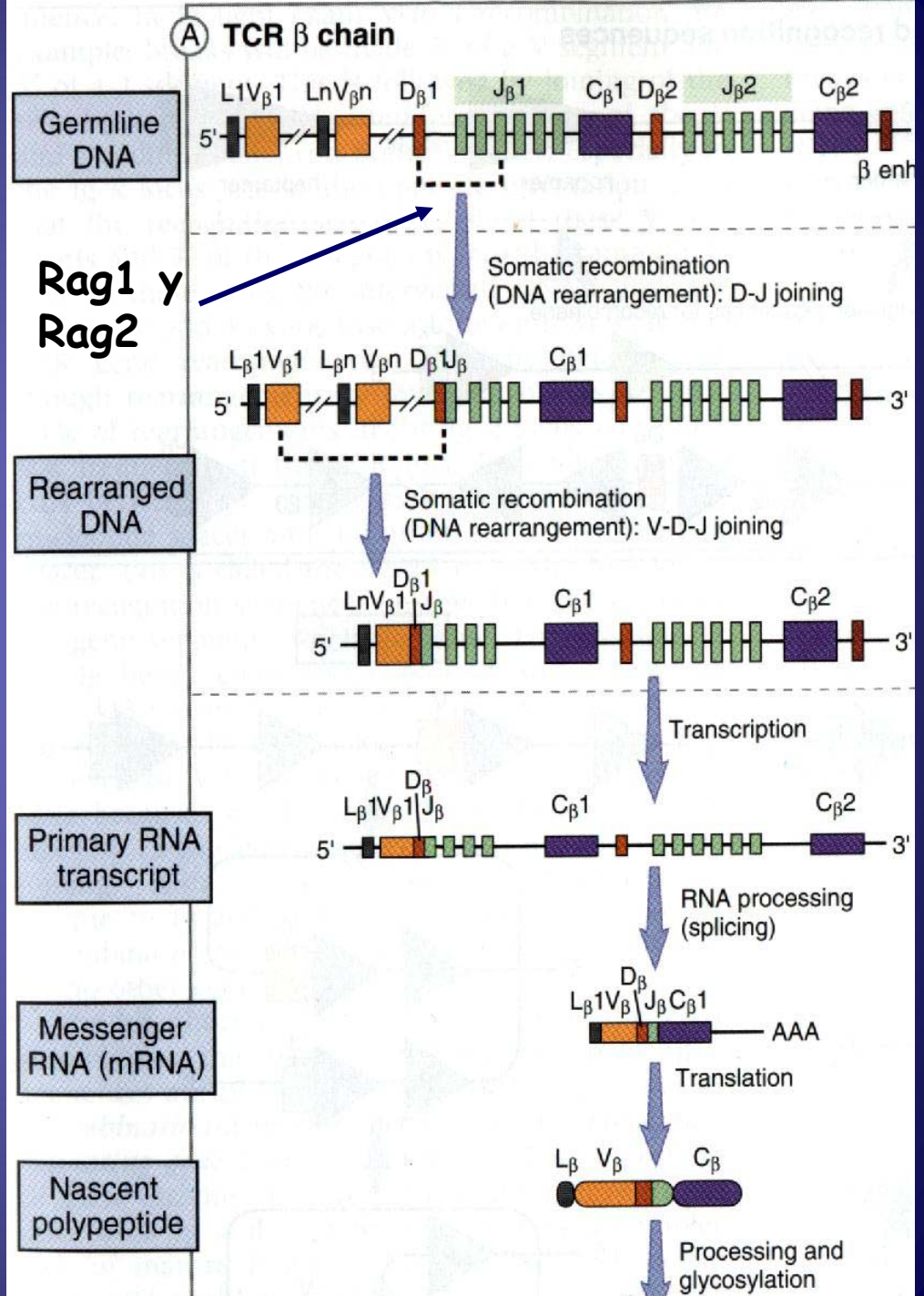


Familia de genes de la región variable, diversidad y unión

Región constante

Reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β

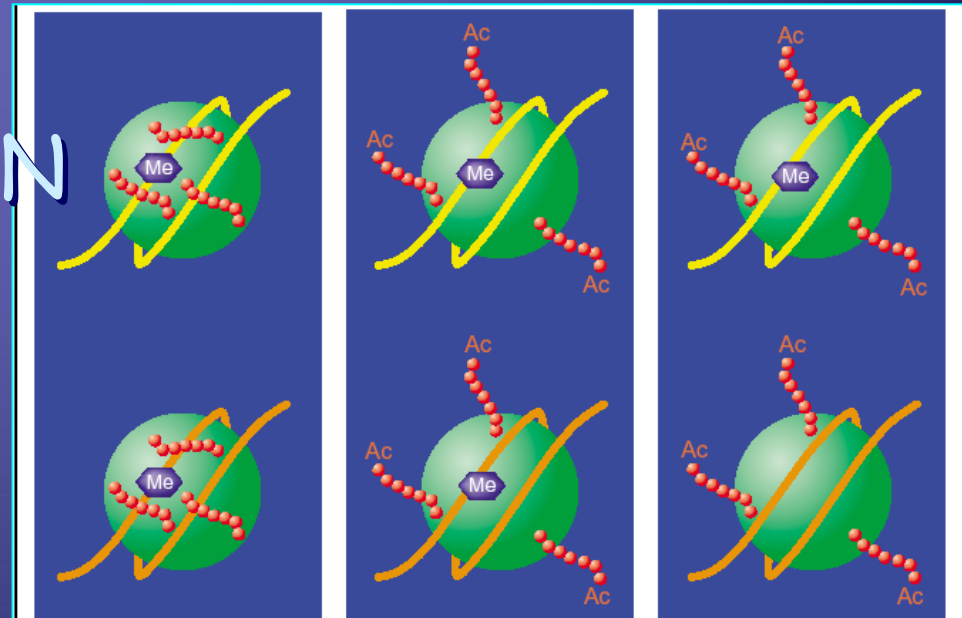
Dos alelos:
 el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: **EXCLUSIÓN ALÉLICA**



Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

Modificaciones de las histonas

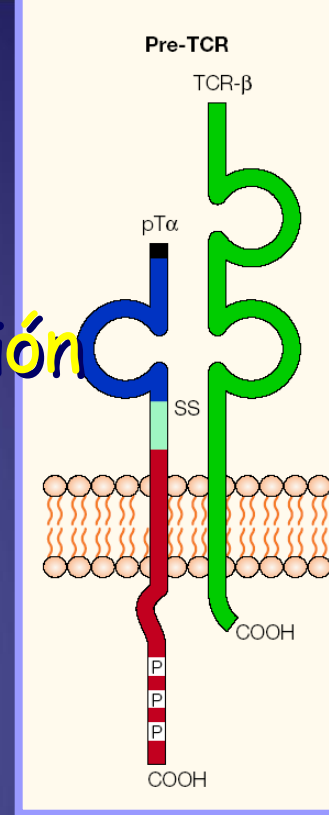
- **Acetilación:** accesibilidad a la cromatina
- **Demetilación del ADN**
 - Un solo alelo
 - Exclusión alélica



Ontogenia de Linfocitos T

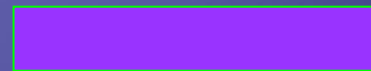
Pre-T: expresión de la cadena β y formación de pre-TCR

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-)



1 2 3 4 5 6 n

1 2 3 4 n

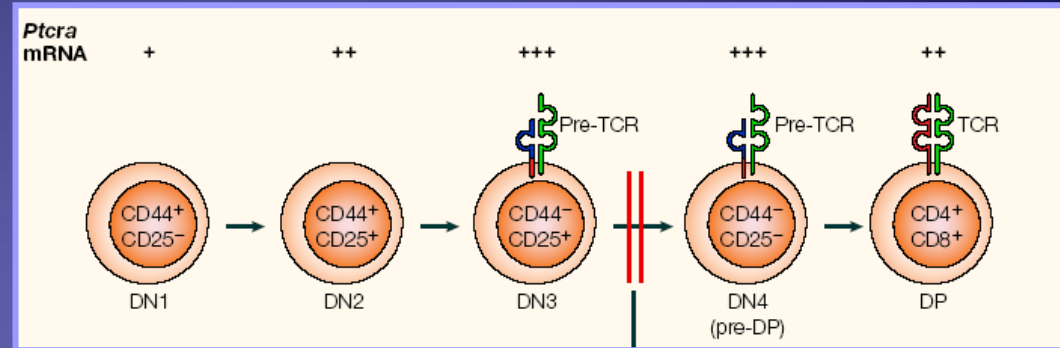


1er alelo

Región variable, diversidad y unión

Región constante

Ontogenia: LINFOCITOS T



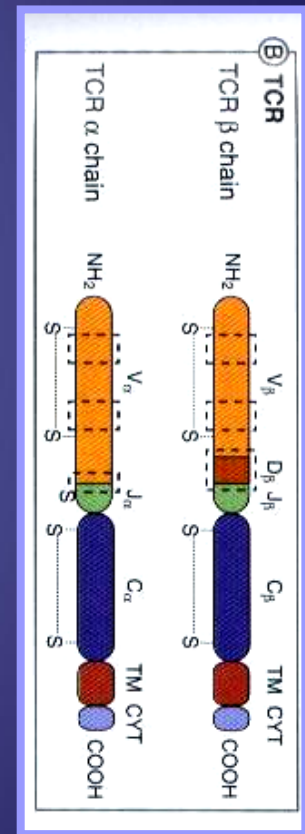
preTCR:

- 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*)



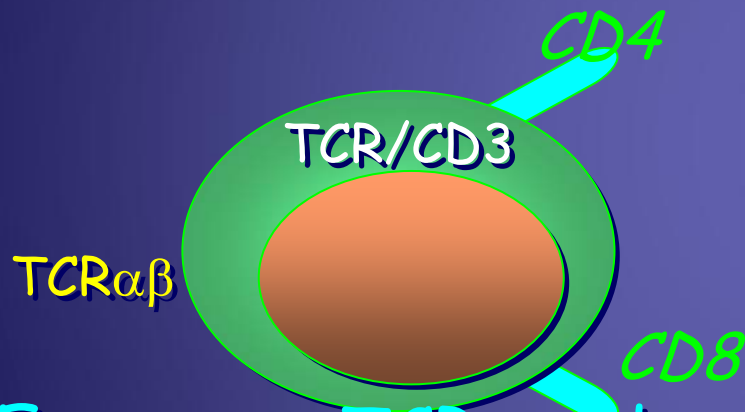
Ontogenia de linfocitos

- 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 deoxiribonucleotil transferasa terminal o **TdT**

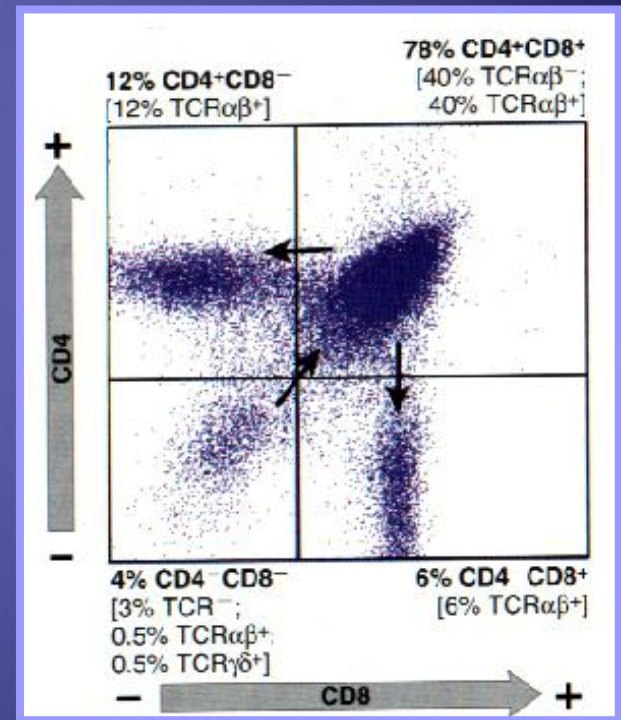


Ontogenia de Linfocitos T

Timocito doble positivo (DP):

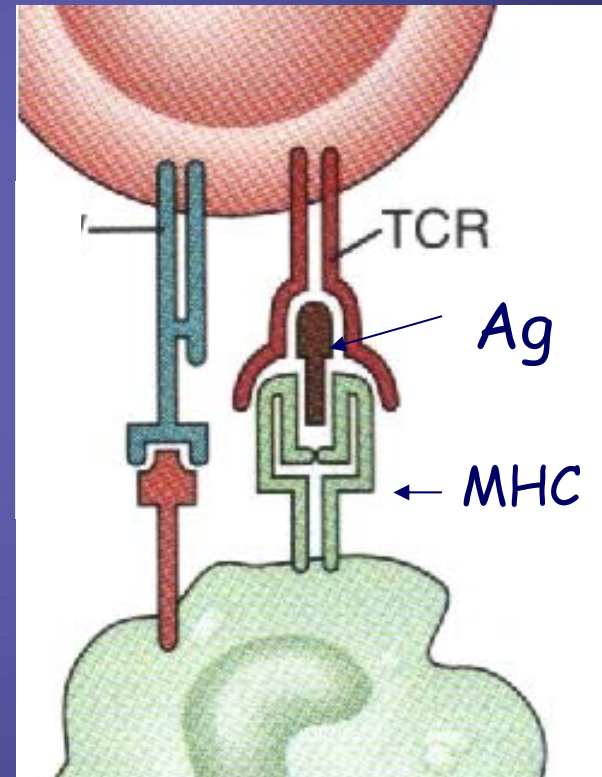


Expresan TCR y además CD4 y CD8 (Doble Positivas) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo

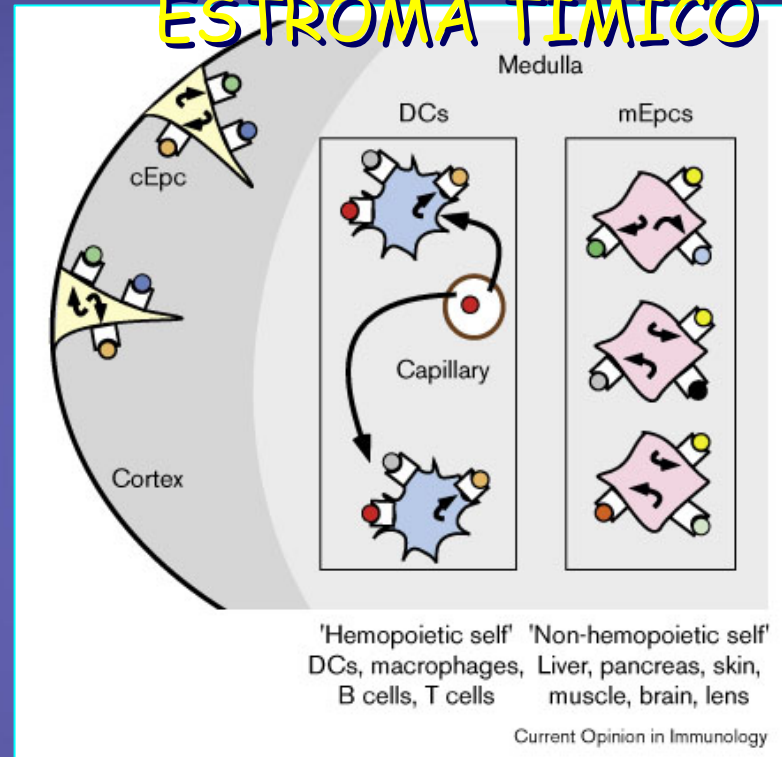
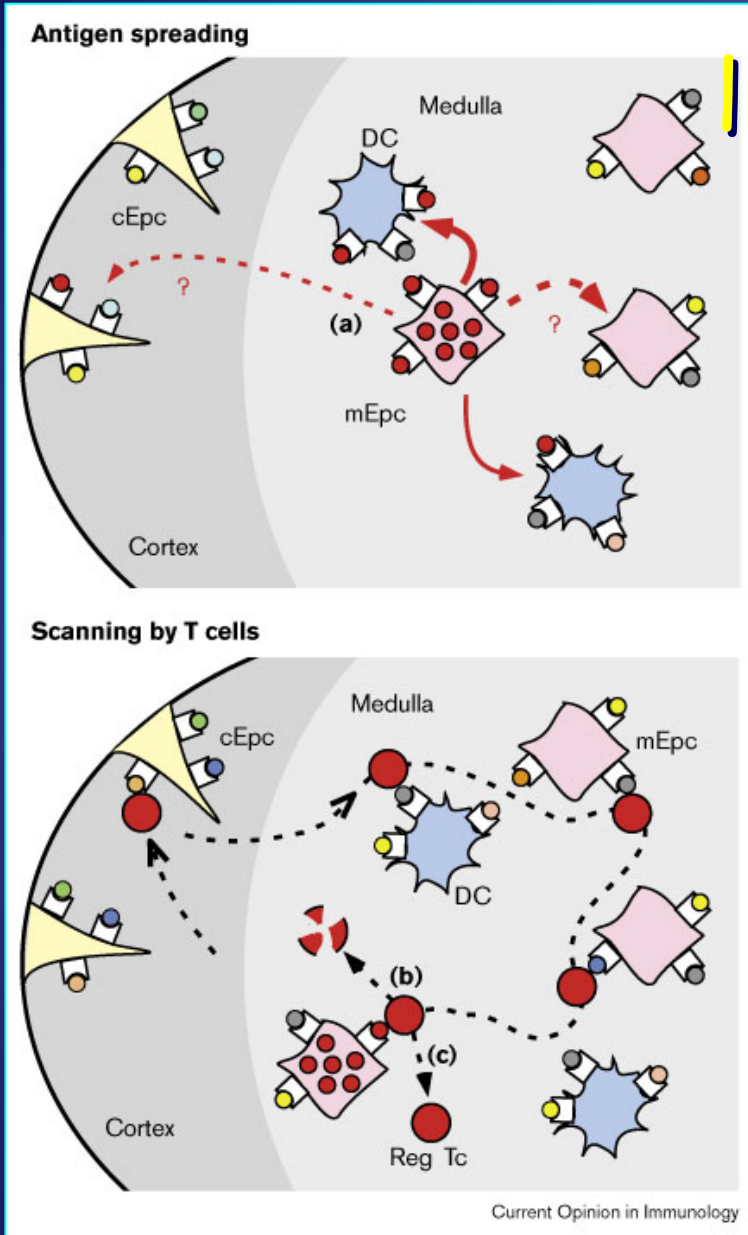


Ontogenia de Linfocitos T

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

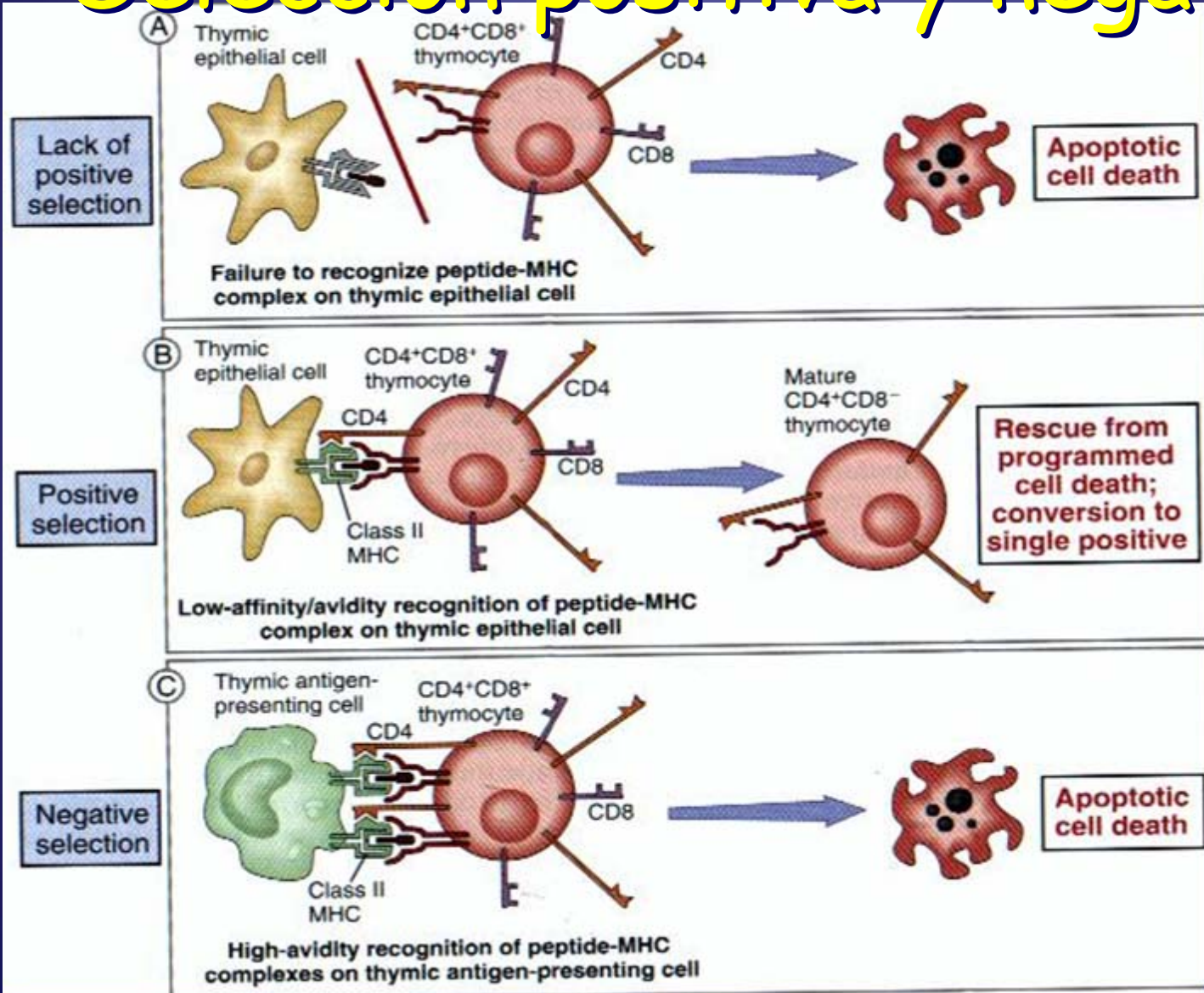


Ontogenia de linfocitos T: CÉLULAS DEL ESTROMA TÍMICO



- 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
- Otra vía las DC traen Ag periféricos)

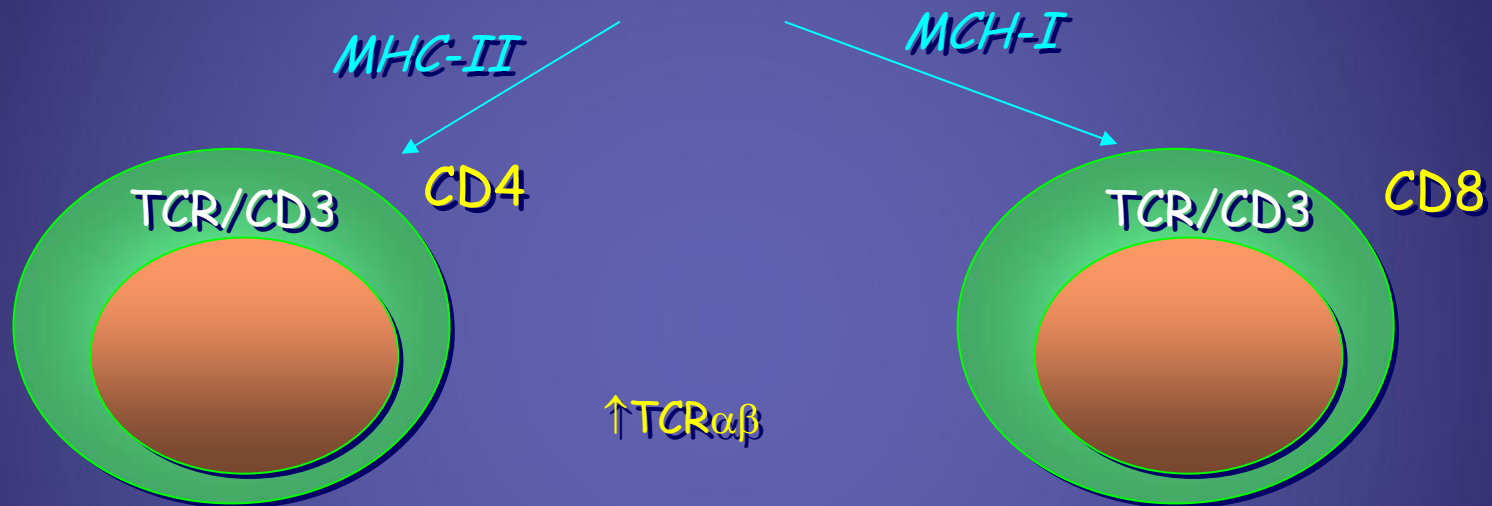
Ontogenia de Linfocitos T: Selección positiva y negativa



Muerte o
anergia

Ontogenia de Linfocitos T

Linfocito T maduro:



Modelo de la fuerza y cinética de la señalización:

Disponibilidad y funcionalidad de Lck

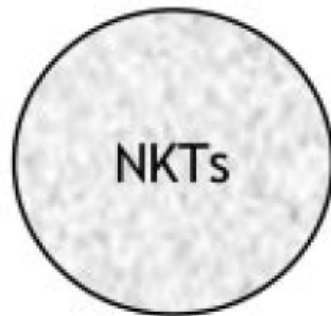
\uparrow actividad de Lck \rightarrow Desarrollo de CD4

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

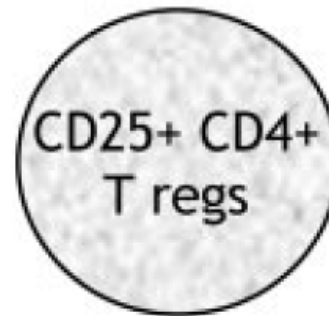
Ontogenia de linfocitos: DESARROLLO DE CÉLULAS T REGULADORAS

- Selección positiva por agonista



Ligand for
selection:

CD1d

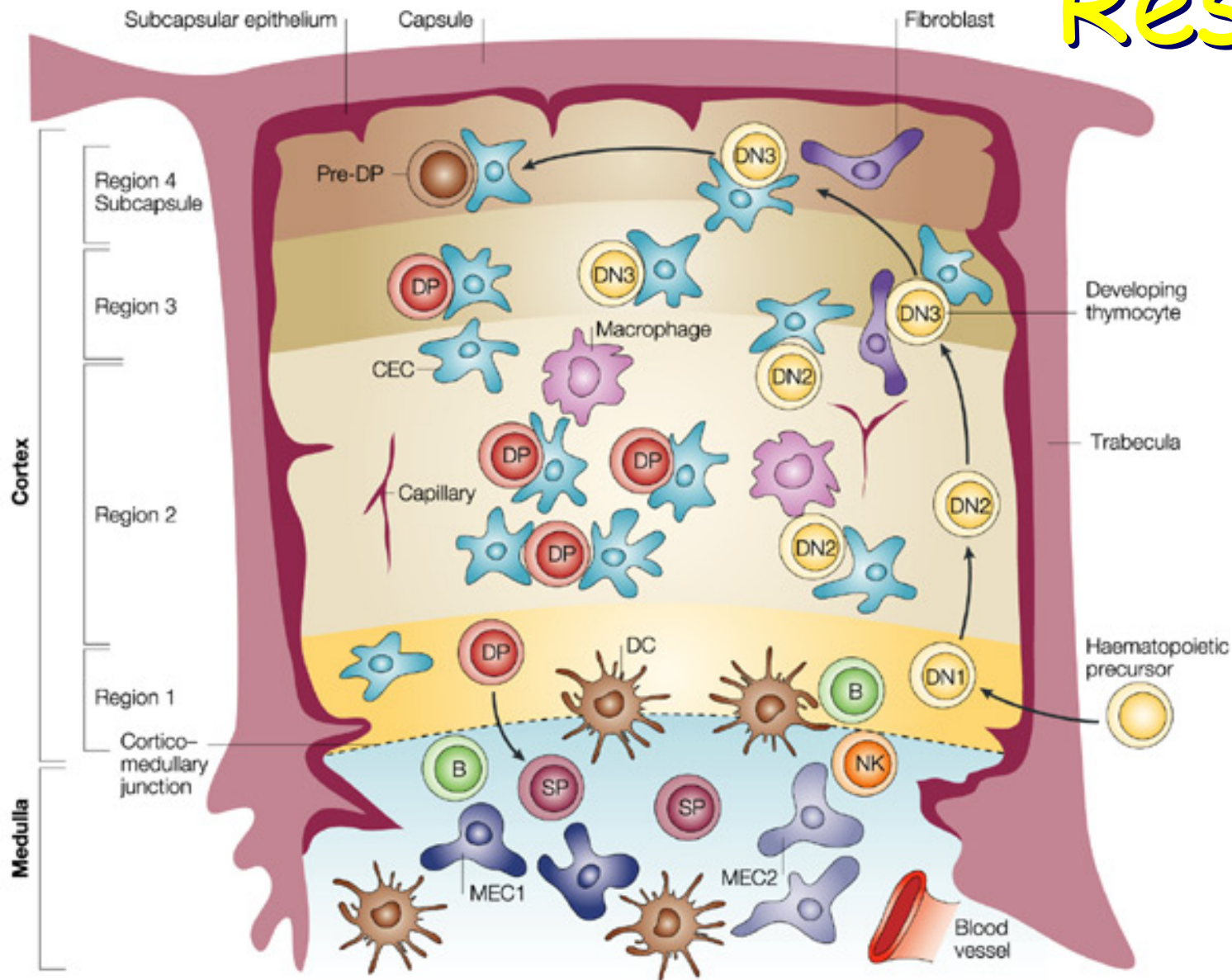


MHC Class II



MHC Class I or Class II
(and TL?).

Resumen



Ontogenia de los linfocitos B

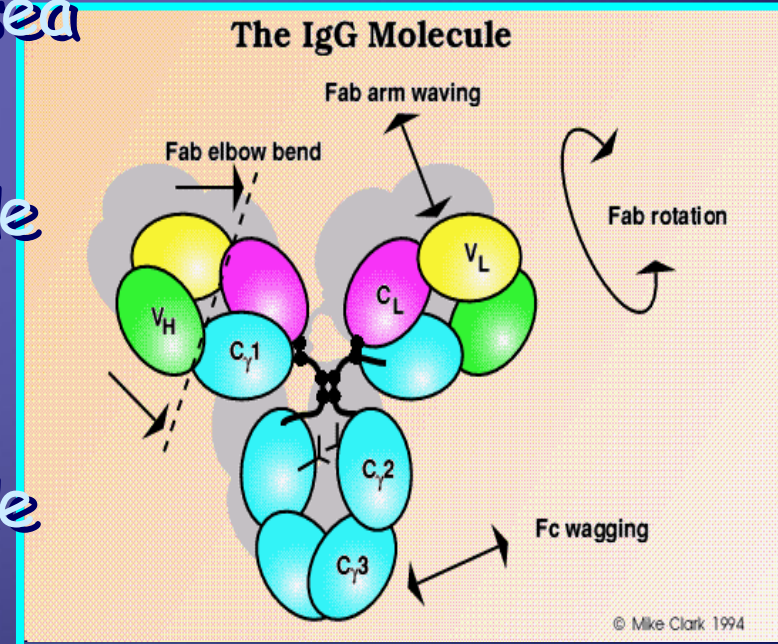
BCR:

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

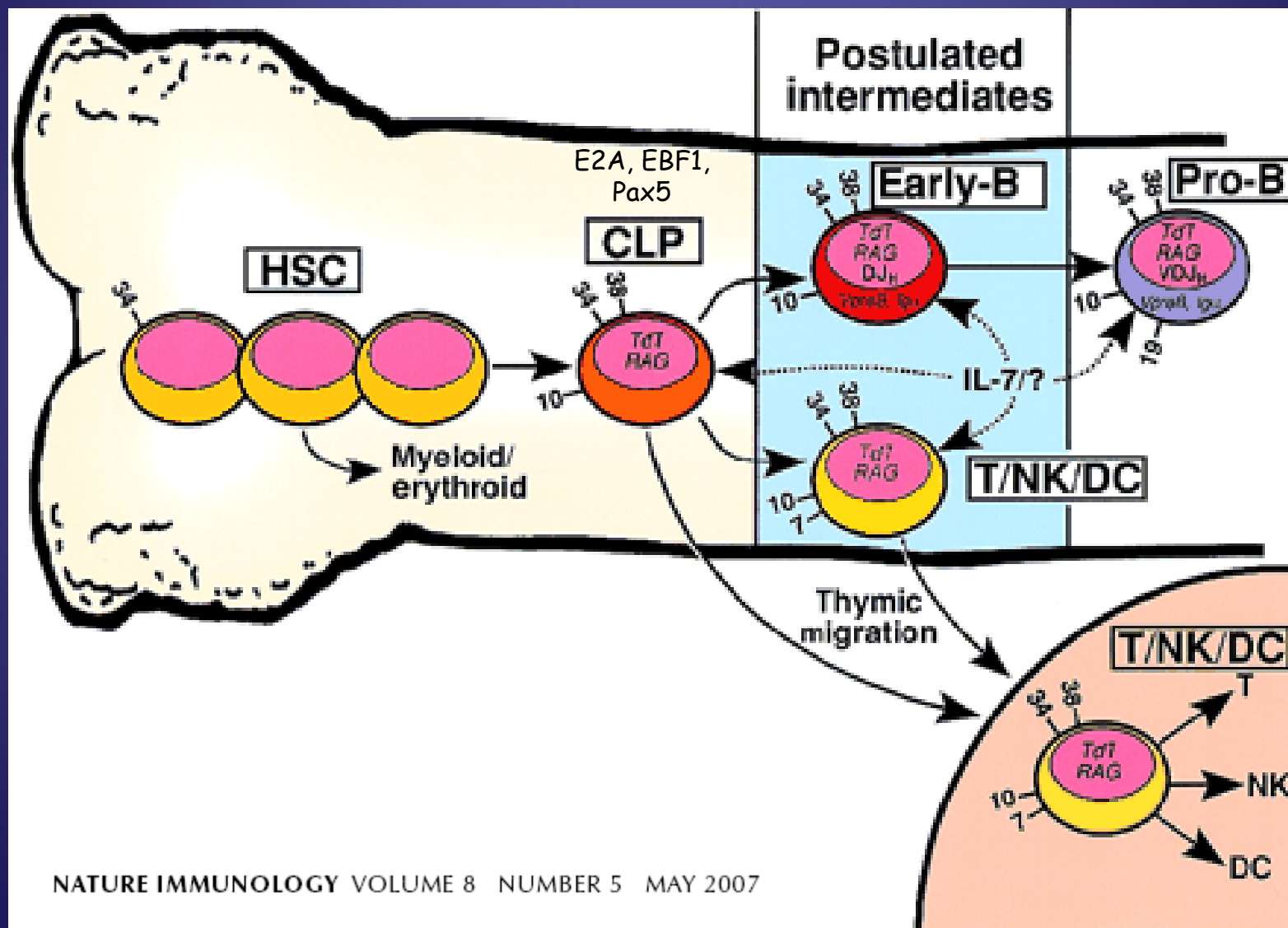


Ontogenia de linfocitos B

- 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



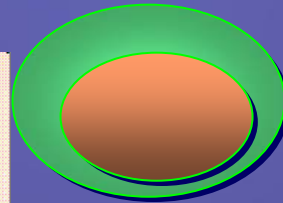
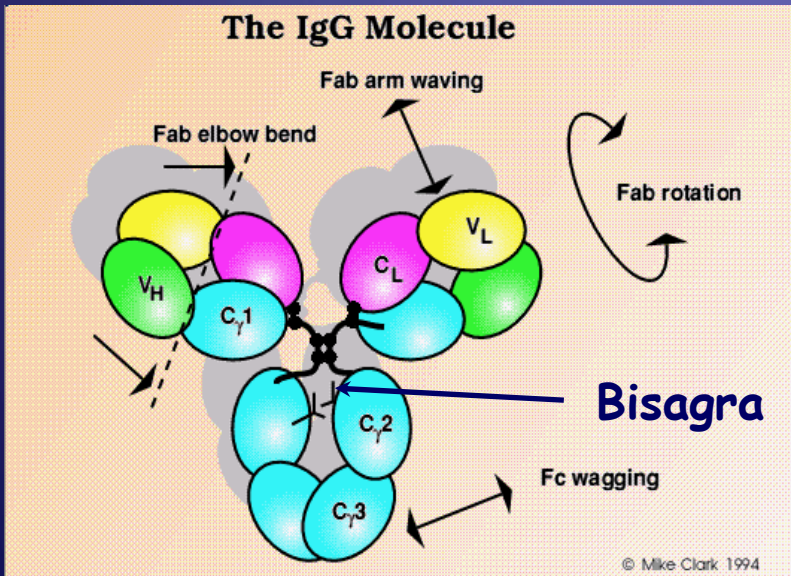
Ontogenia: LINFOCITOS B



Ontogenia de Linfocitos B

pro-B:

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

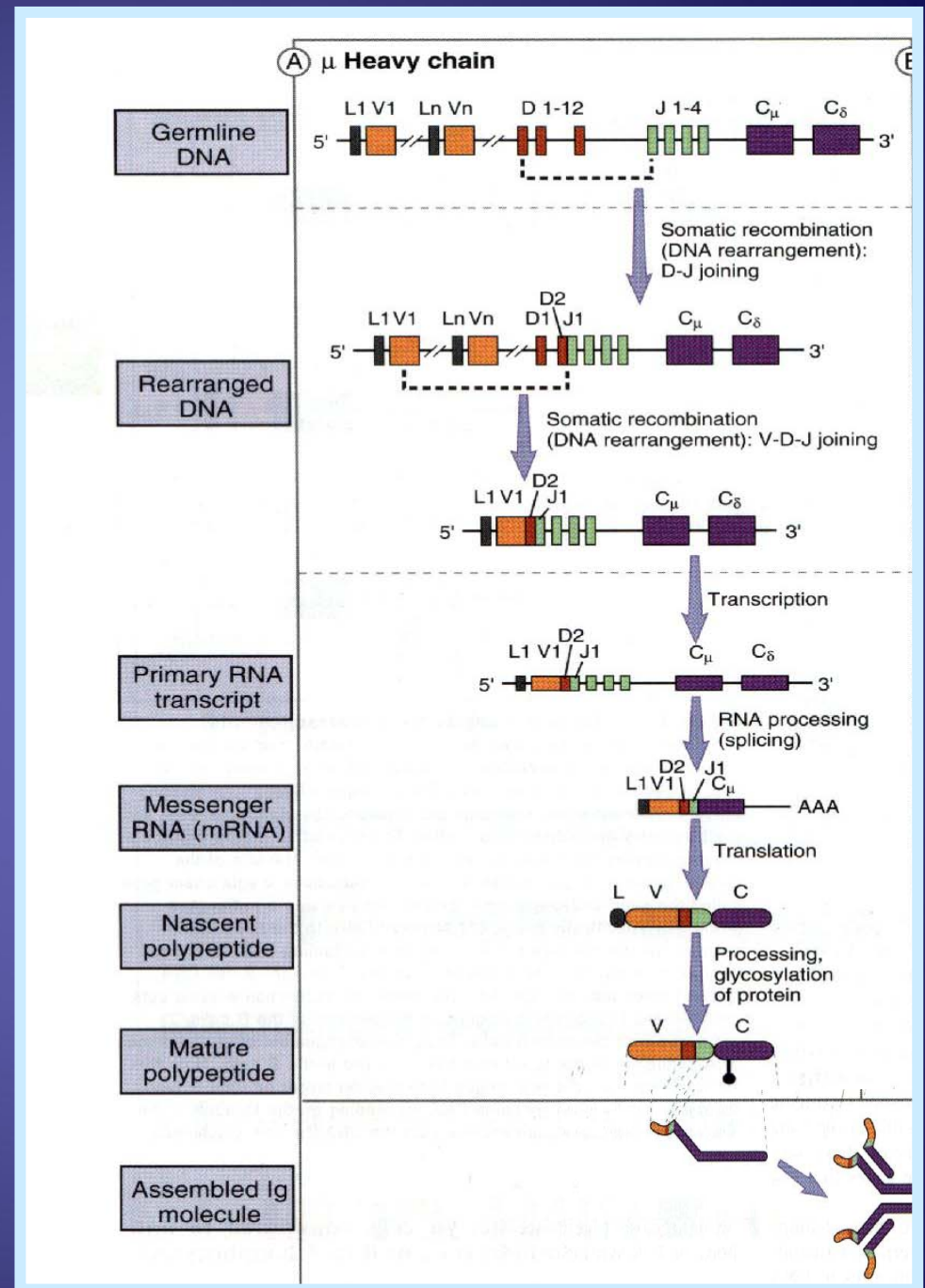


IL-7R
IL-3R

Reordenamiento de los genes que codifican para las inmunoglobulinas

Dos alelos:

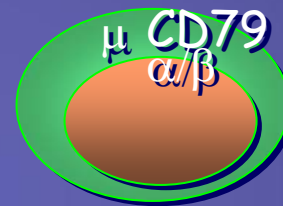
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro:
EXCLUSIÓN ALÉLICA



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

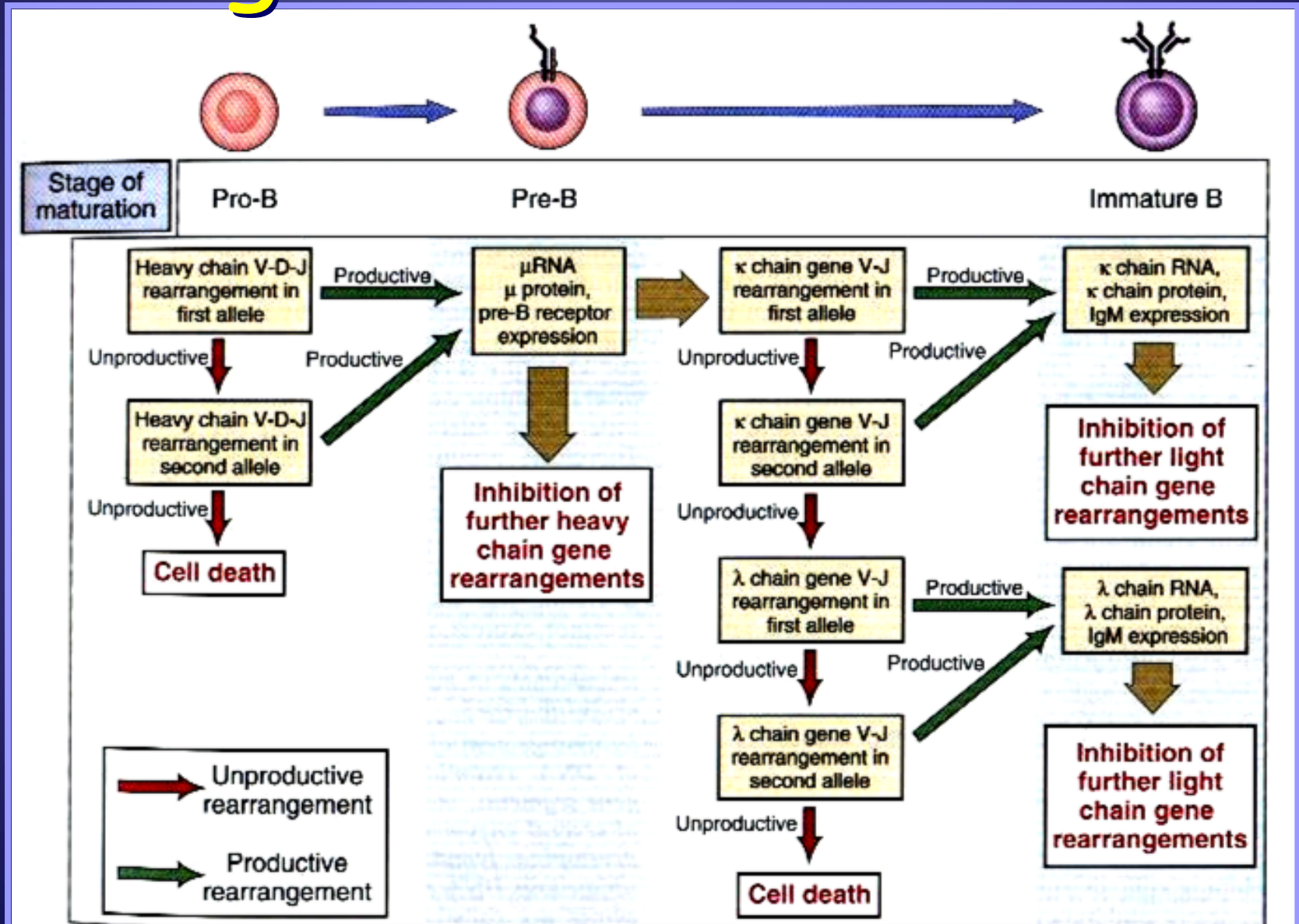
Linfocito B inmaduro:



Linfocito B maduro: IgM/IgD

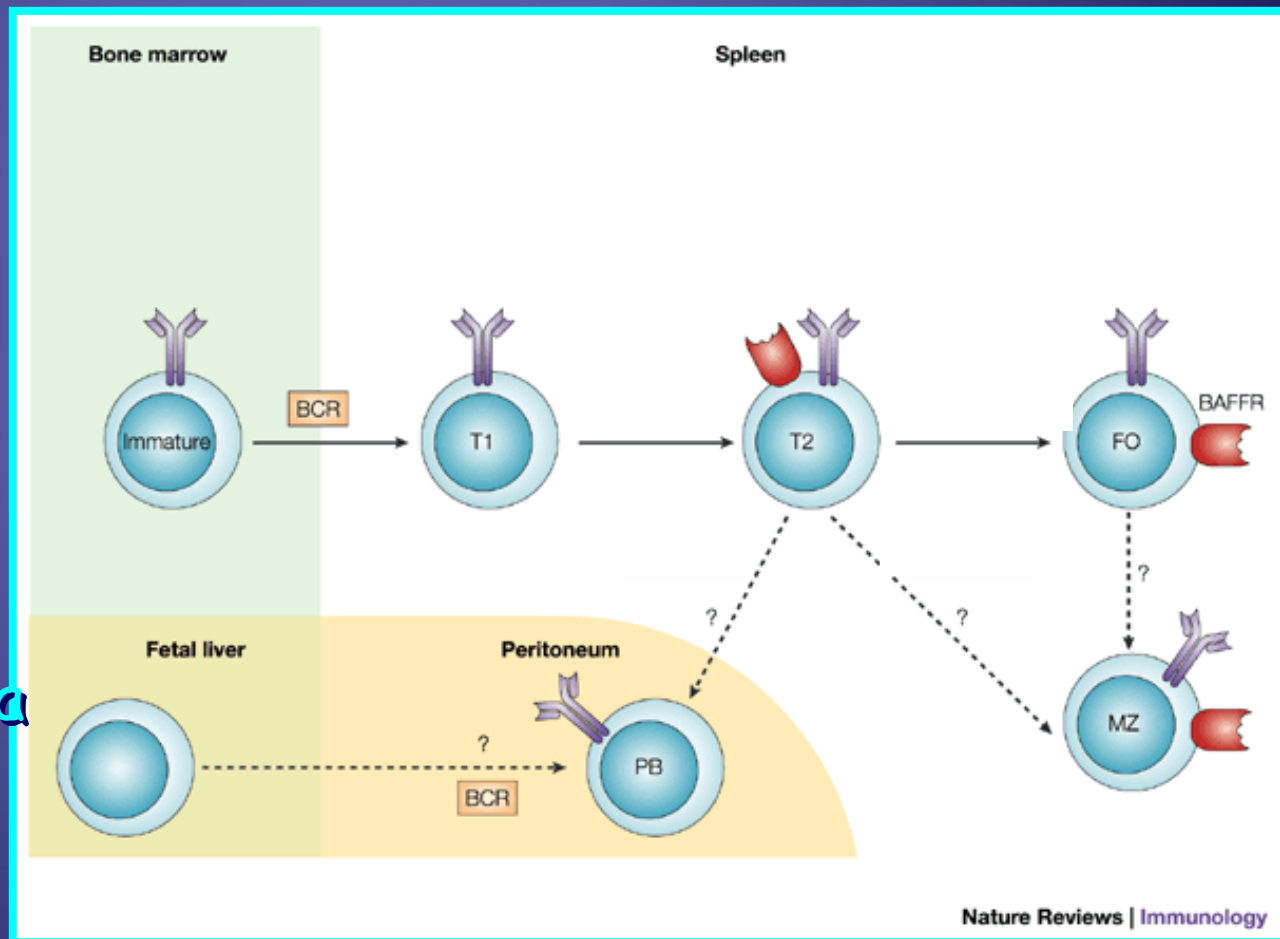


Ontogenia de Linfocitos B



Ontogenia: LINFOCITO B

- Emigran de la MO
- Tres poblaciones: Células B periféricas, células B foliculares y células de B de la zona marginal (MZ)



Ontogenia: LINFOCITOS, mecanismos de selección

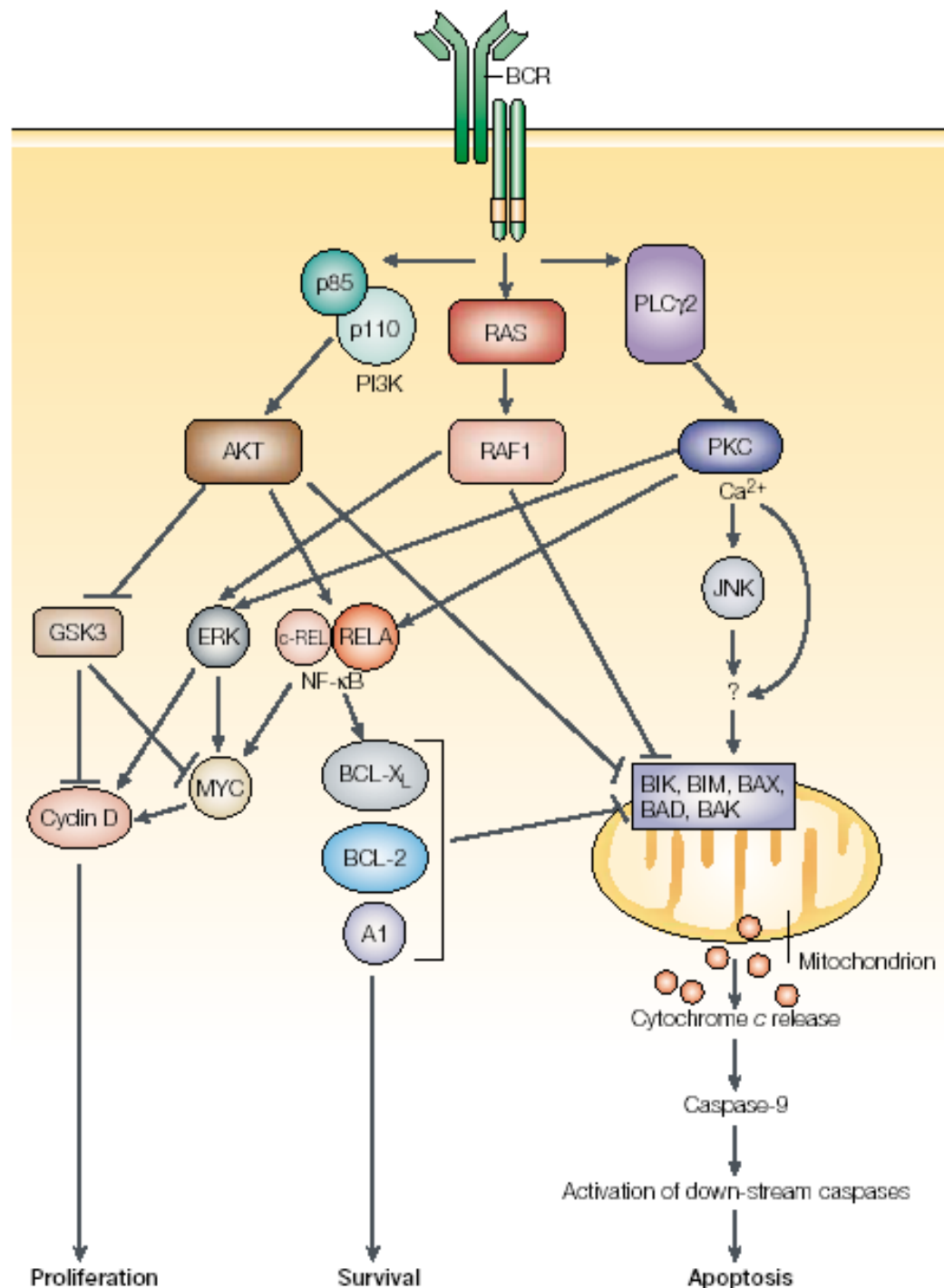
Selección positiva

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
- Sistema inmune innato
- Desarrollo fetal y perinatal

B-2

- CD5-
- Predominan en la periferia
- Respuesta adaptativa
- Desarrollo después del nacimiento

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 -.

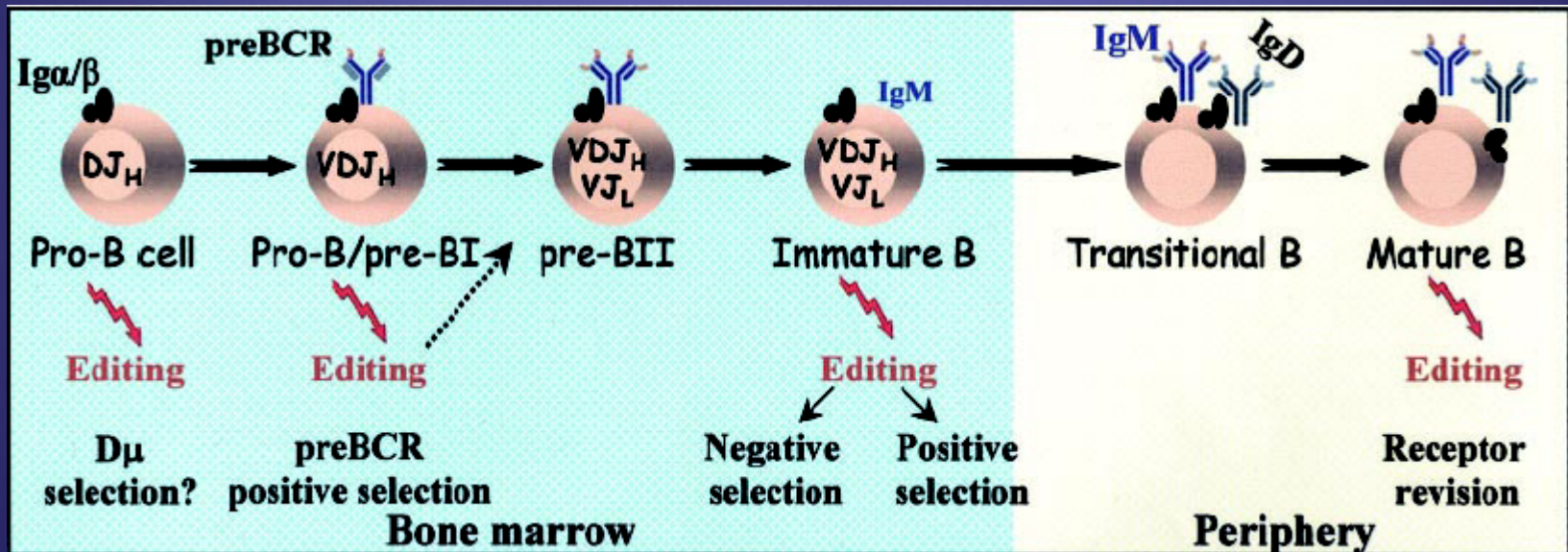
^b Only in peritoneal cavity; B-1 cells are CD11b/Mac-1⁻ in spleen.

T1, T2 = transitional (maturing) B cells.

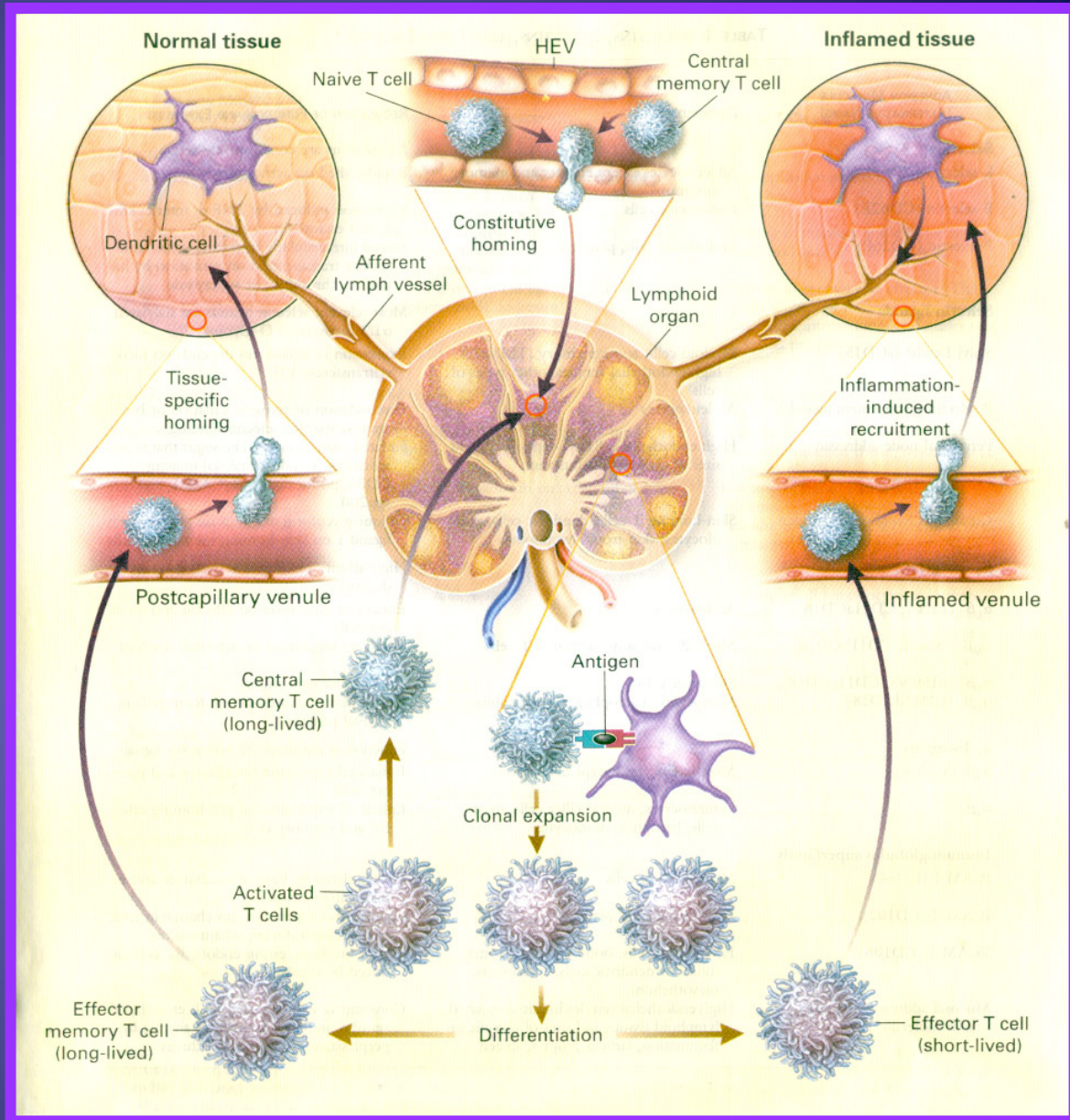
MR = mature recirculating B cells.

MZ = marginal zone B cells.

Resumen

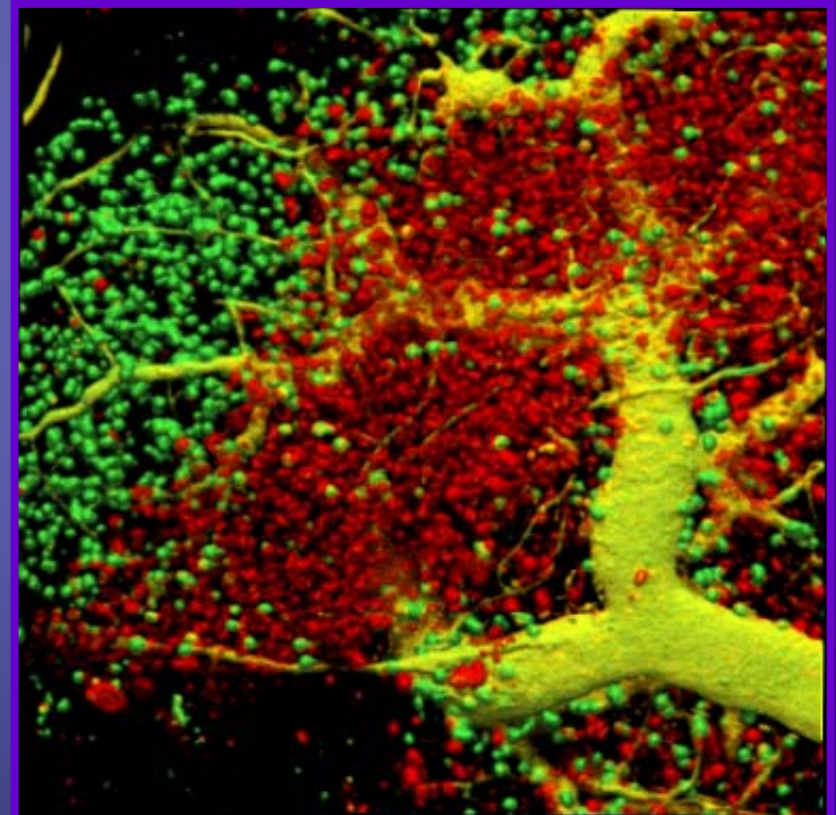


¿Que eventos regulan la migración y alojamiento dentro de un tejido o de un tejido a otro?



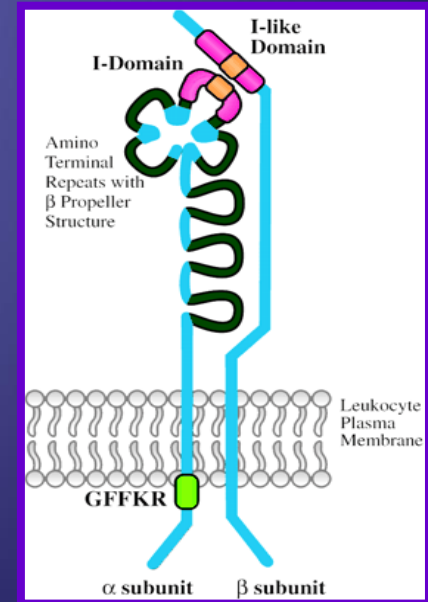
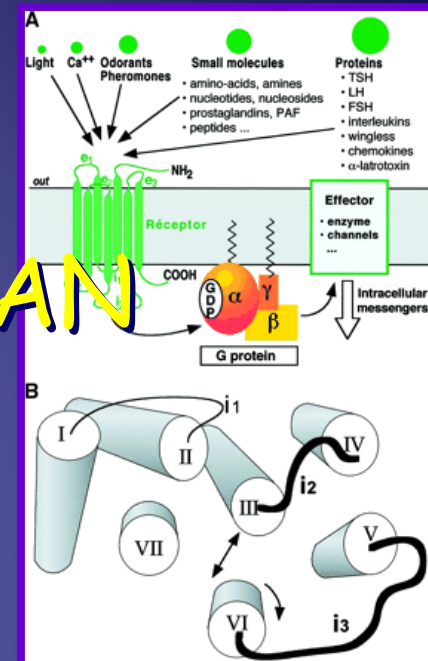
Recirculación y alojamiento de los leucocitos: ¿De qué depende?

- 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

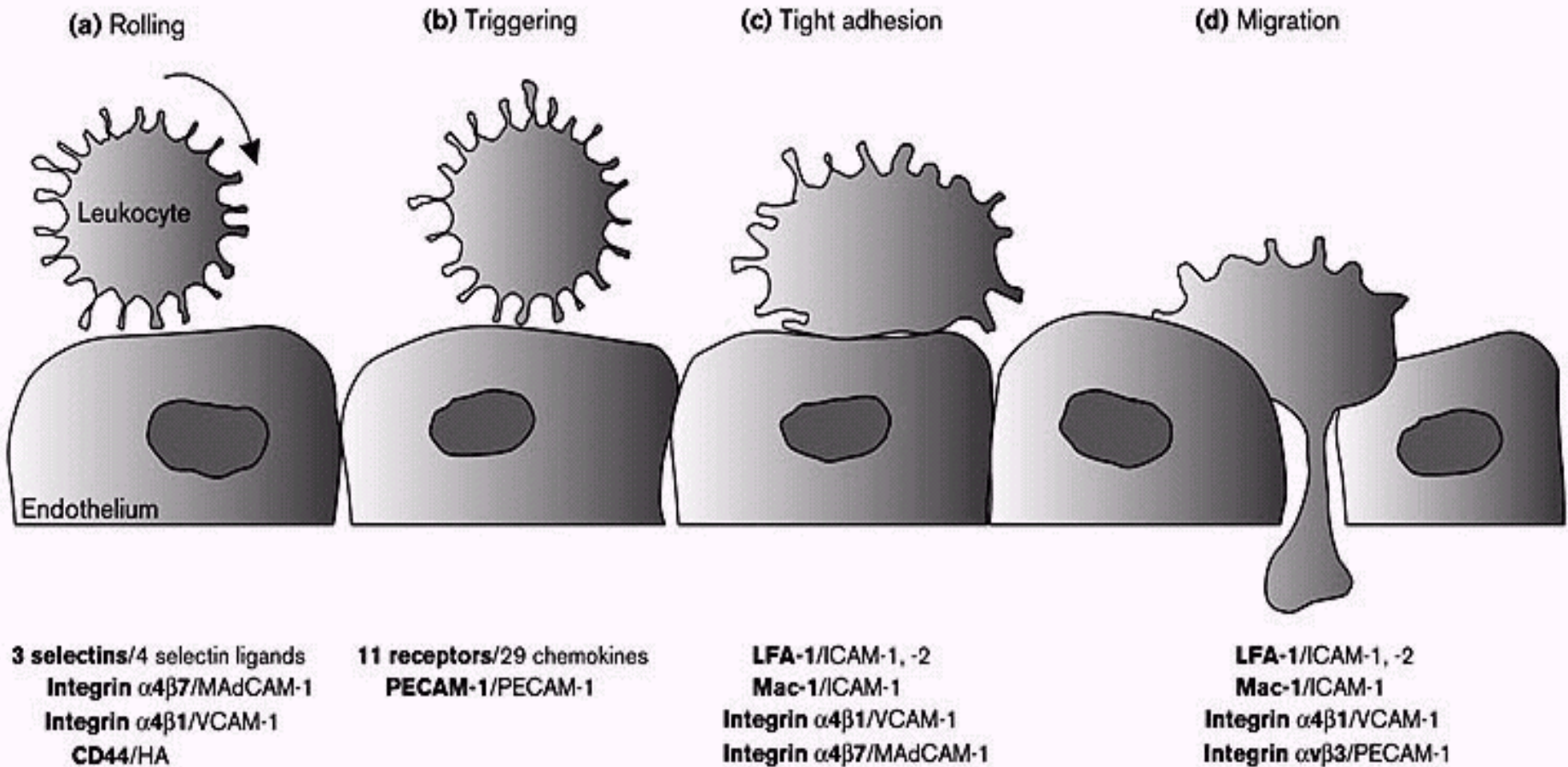


Migración de leucocitos: ELEMENTOS QUE PARTICIPAN

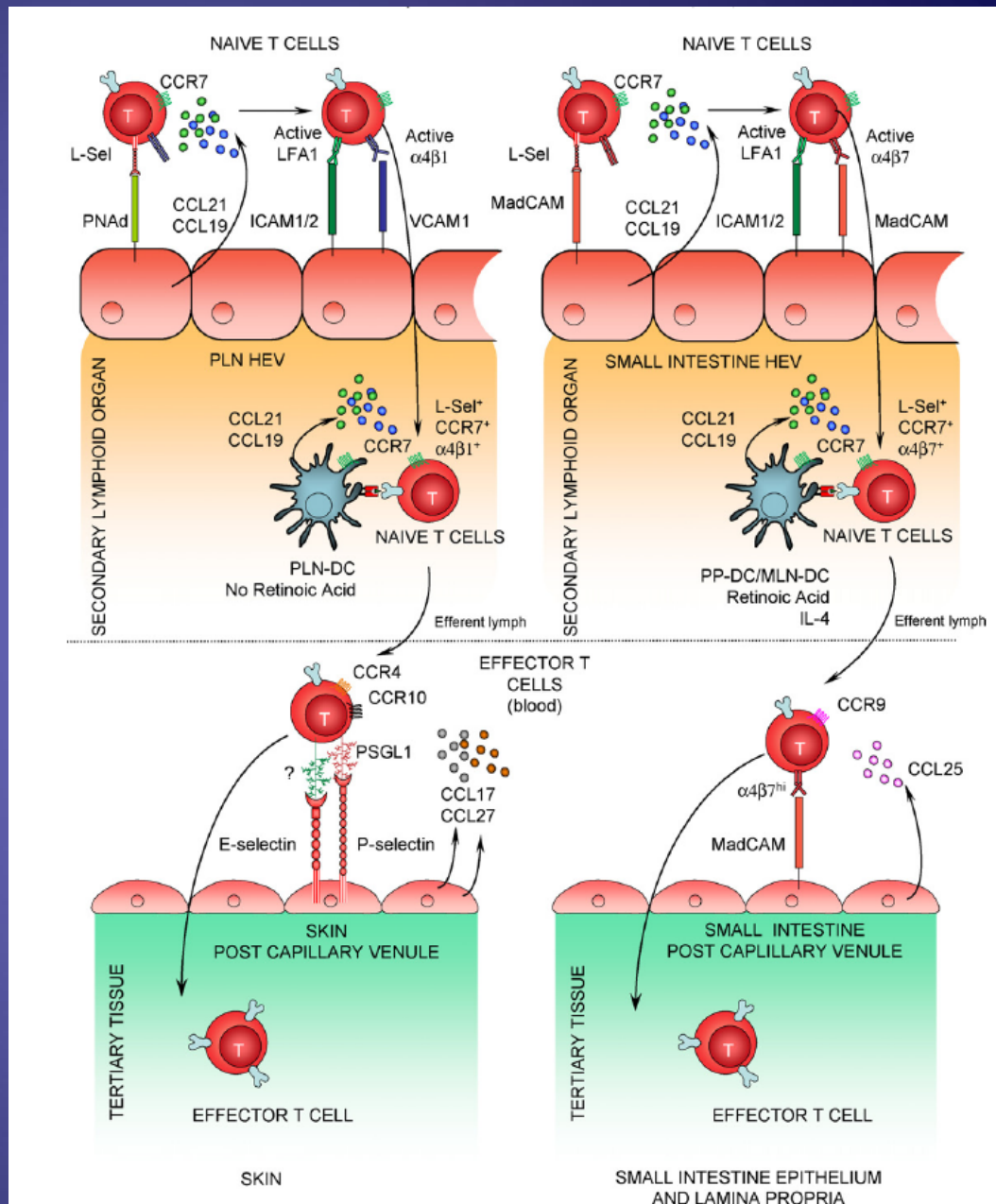
- Quemokinas y sus receptores
 - Interleukinas con capacidad quimiotáctica
- Integrinas
- Cadherinas
- Selectinas
- ICAM



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

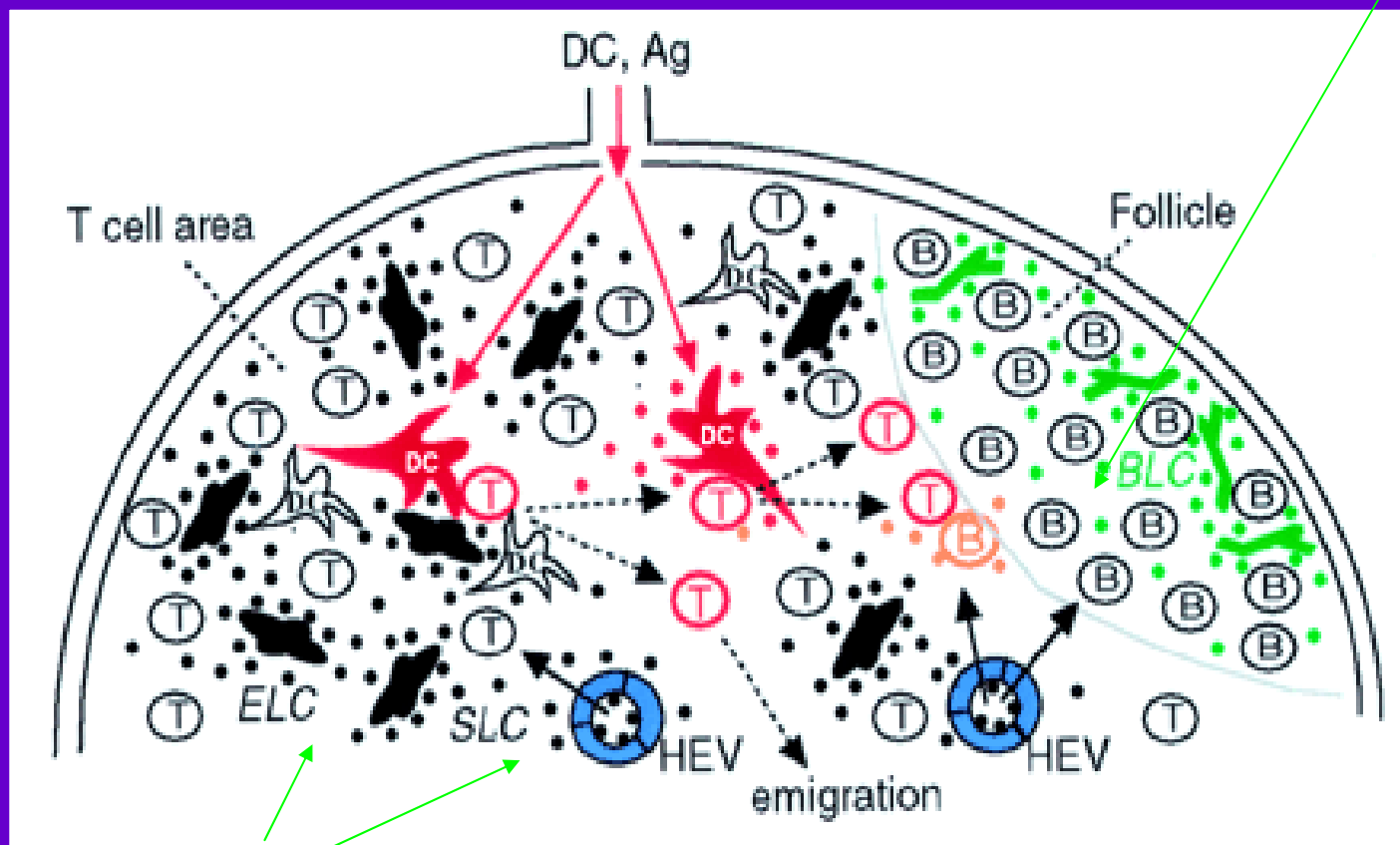


Recirculación de linfocitos



Migración celular: QUEMOKINAS

CXCR5: expresado sobre Th, permitir interacción con células B



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

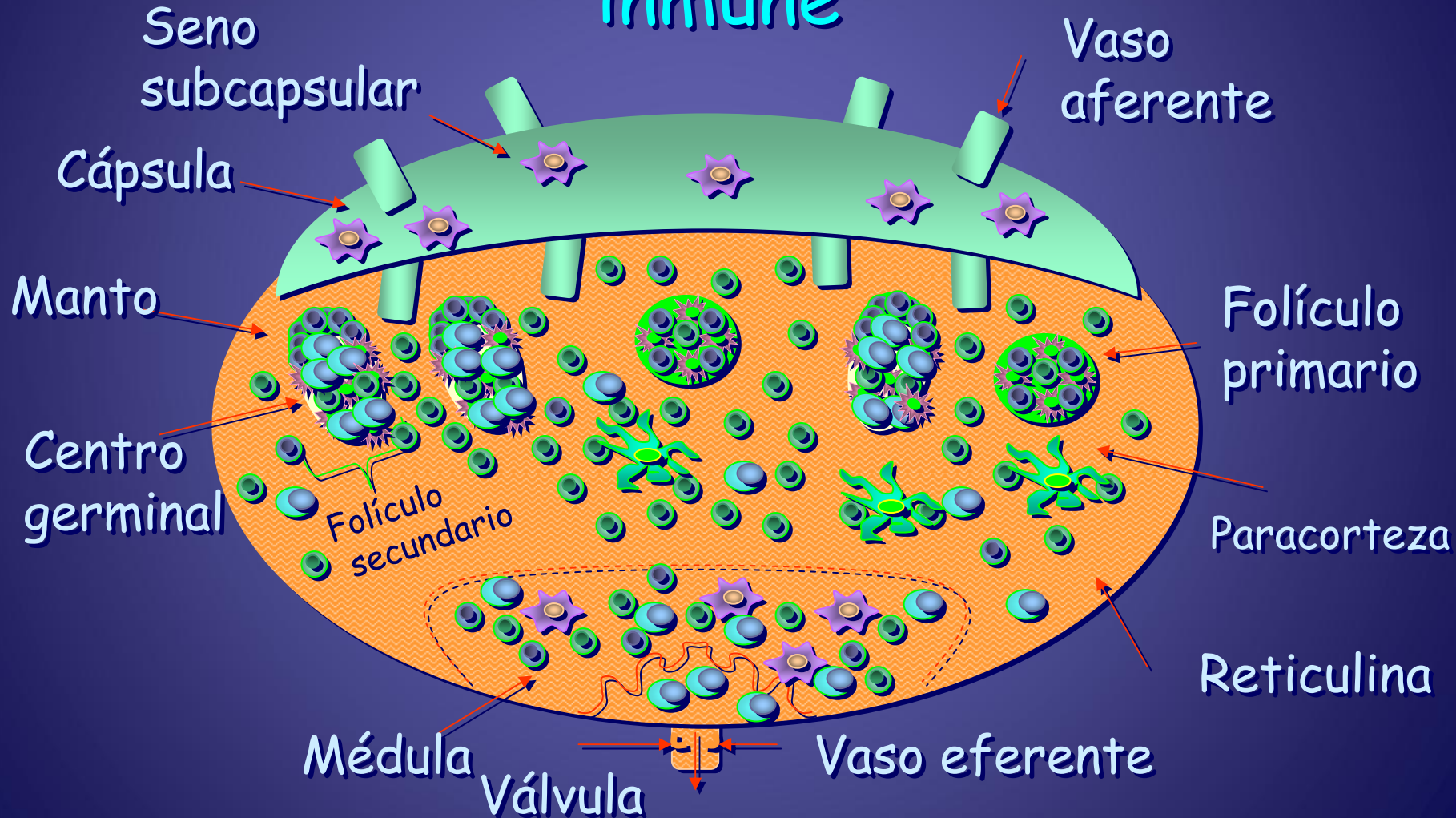
•Durante la activación inicial los linfocitos pierden el receptor CCR7 y adquieren otros, lo que le permite salir hacia los tejidos inflamados

Órganos secundarios y maduración final de los linfocitos

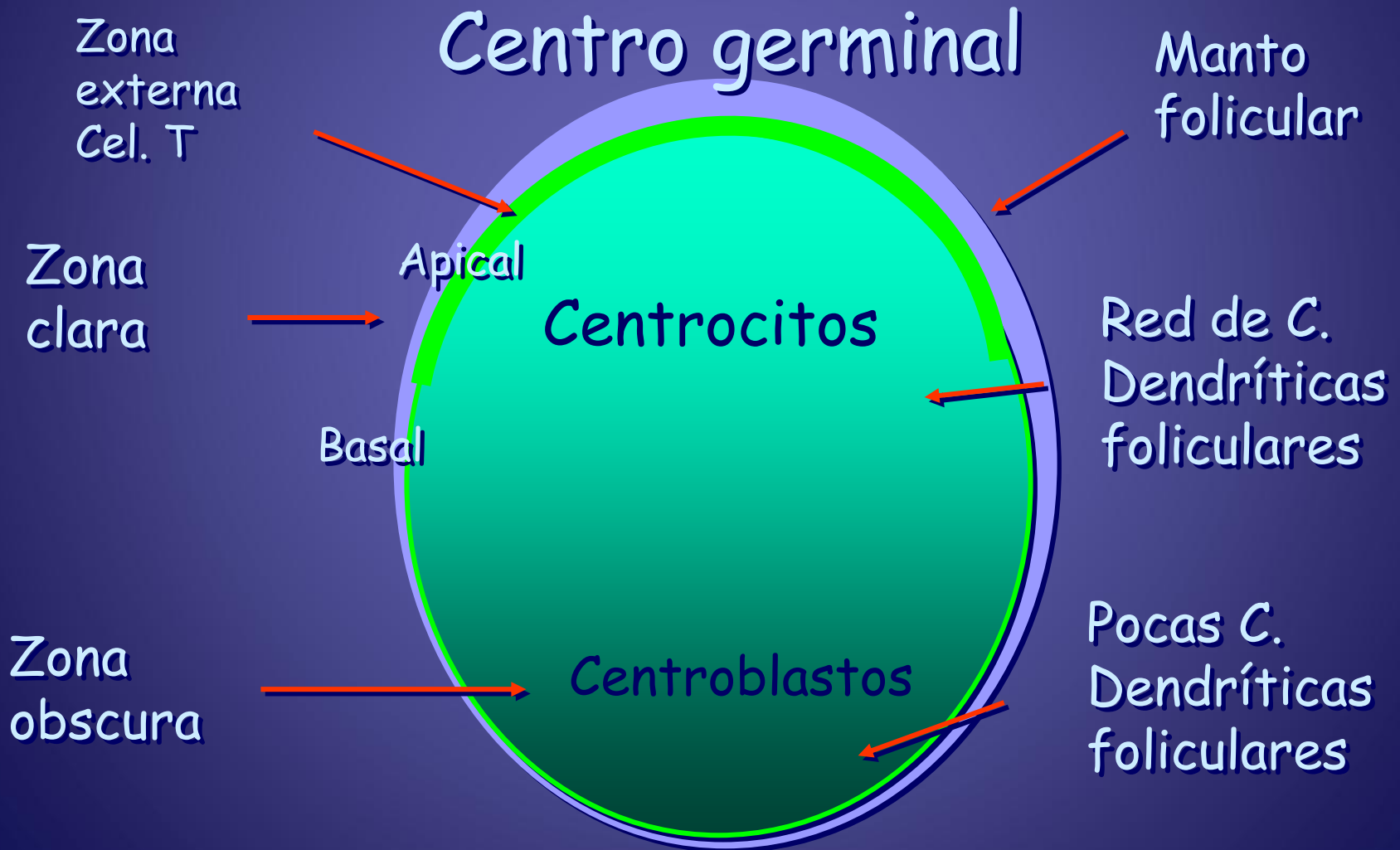
Órganos secundarios

- **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

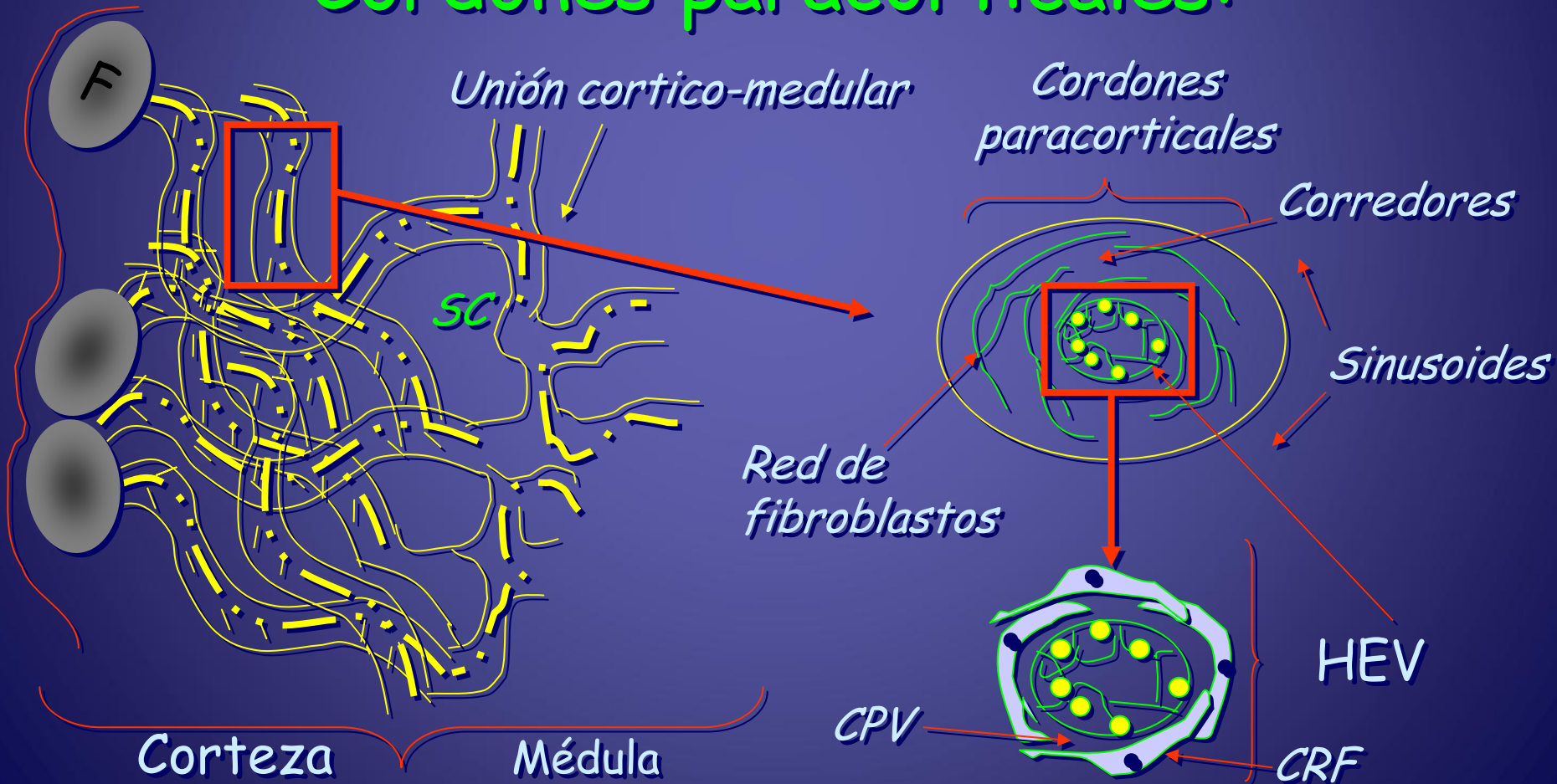


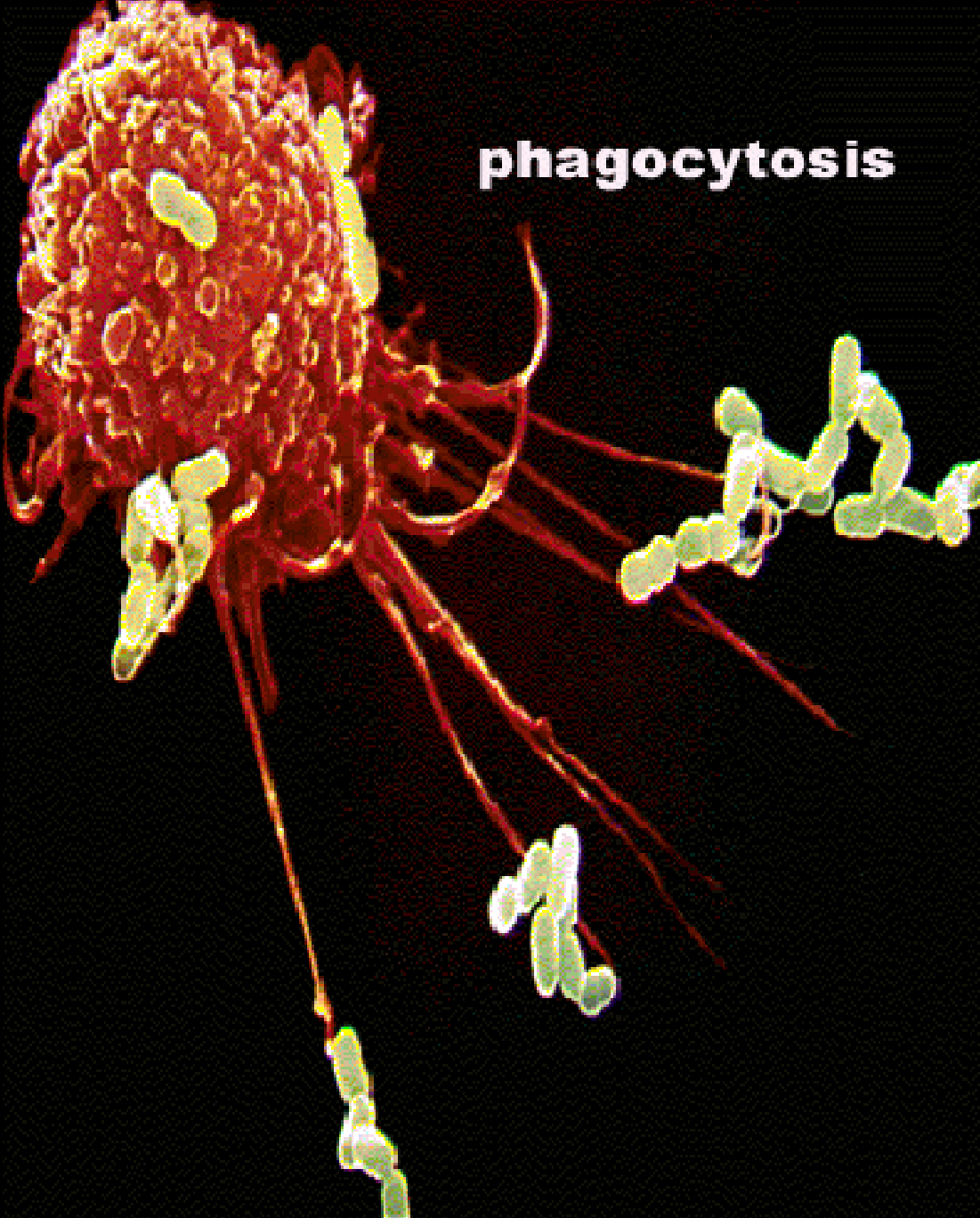
Órganos secundarios: Folículo secundario



Órganos secundarios: 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?