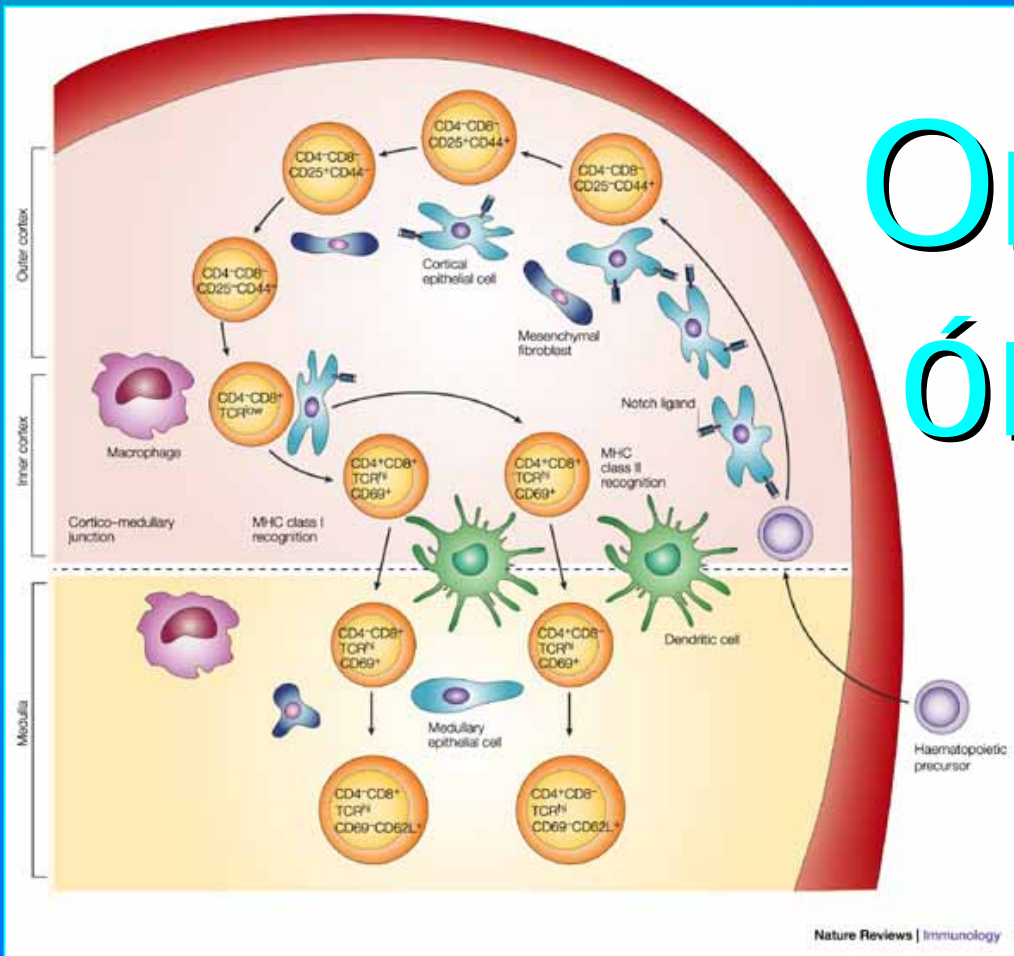


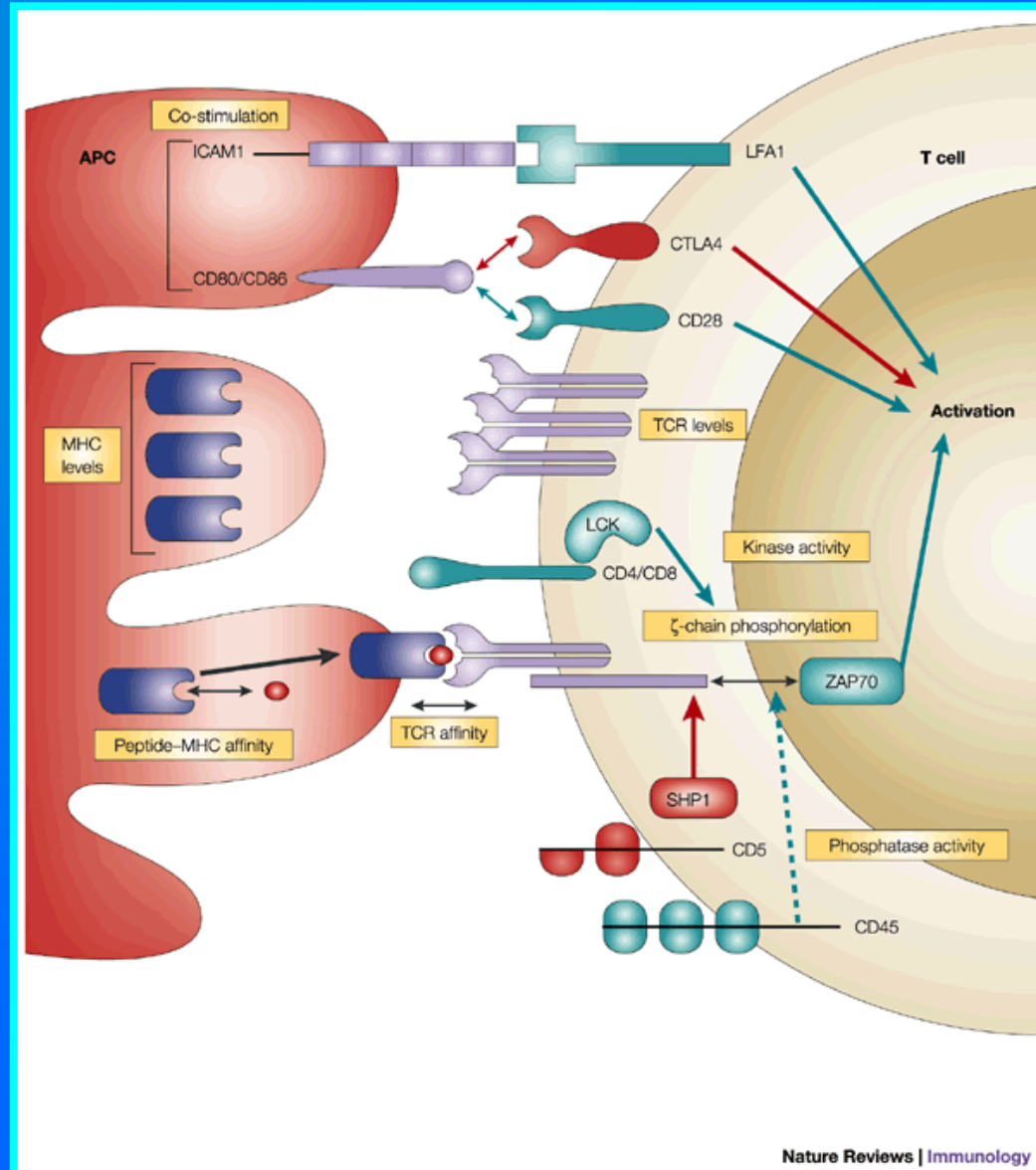
# Ontogenia y órganos del sistema inmune



Prof. Siham Salmen Halabi  
Instituto de Inmunología Clínica (I dic-ULA)  
Curso de Pre-grado 2006-2007

# 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

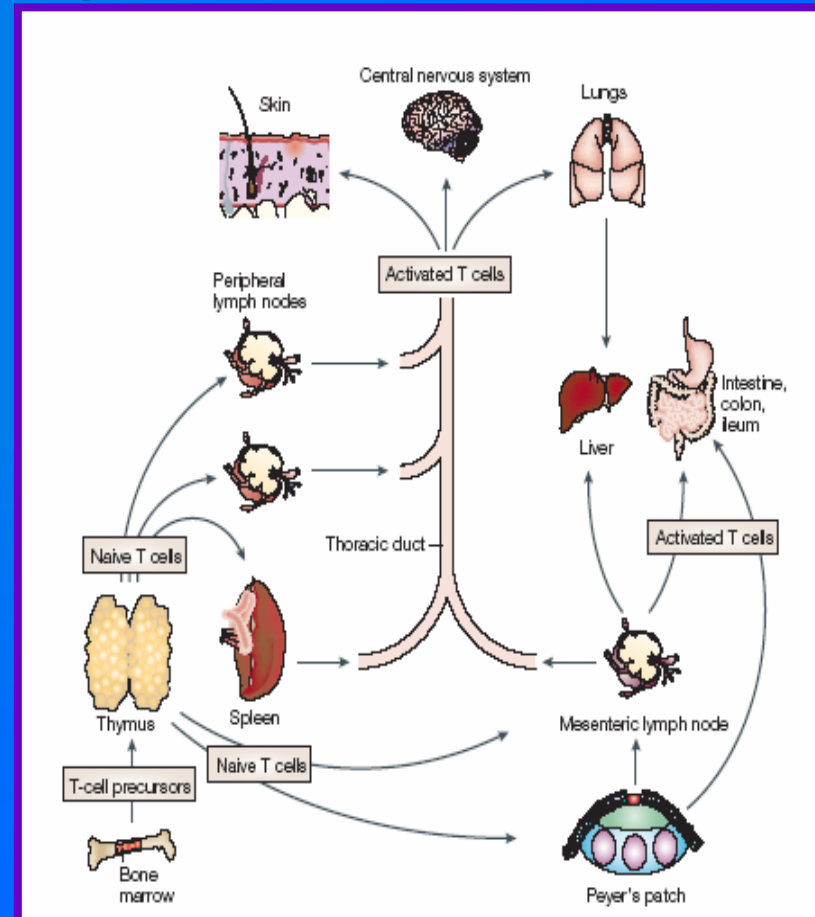
- Elementos que participan
  - Célula progenitora pluripotencial
  - Mediadores solubles
  - Interacción entre las células linfoides con elementos del microambiente

# 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

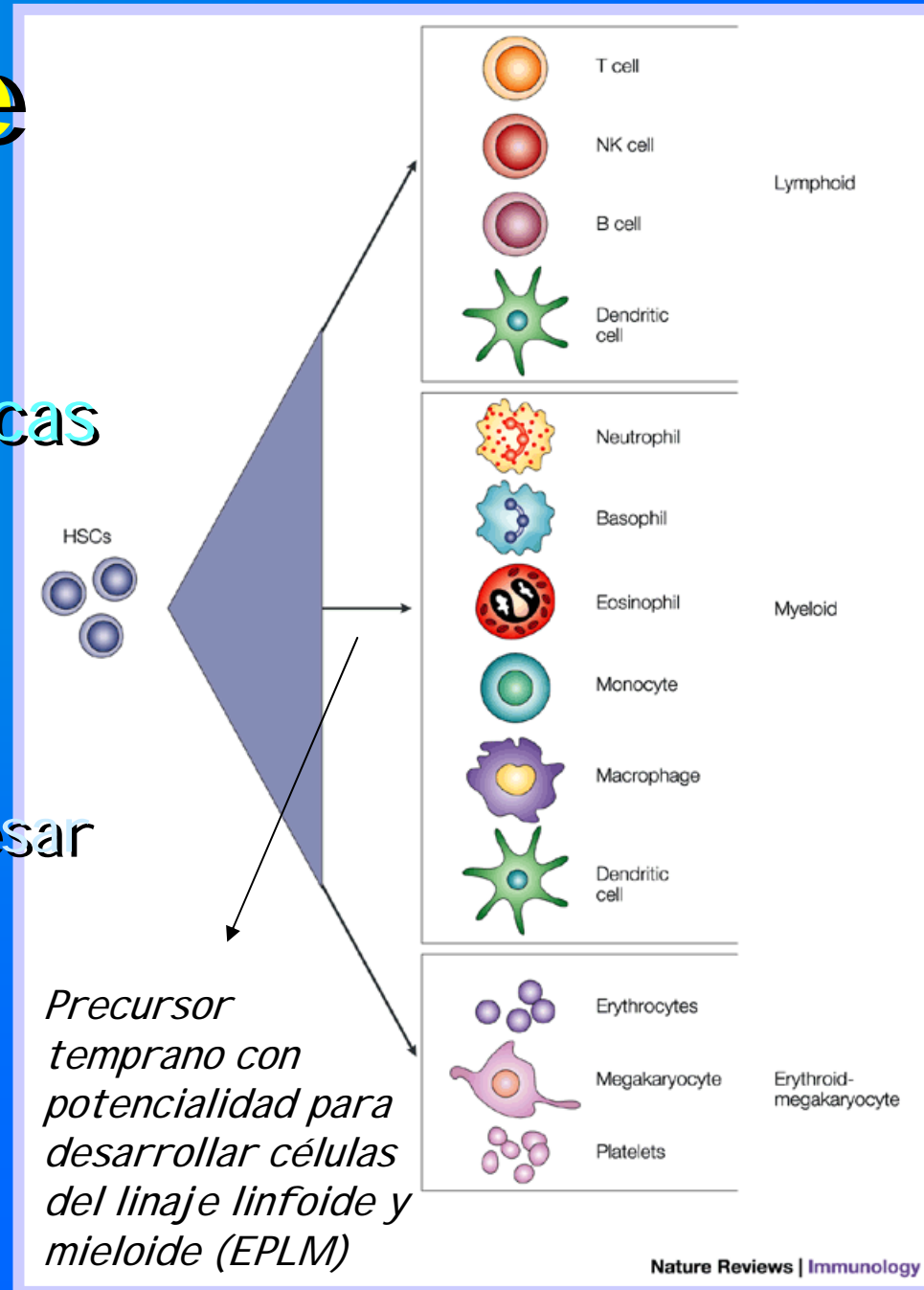




# Órganos primarios y ontogenia

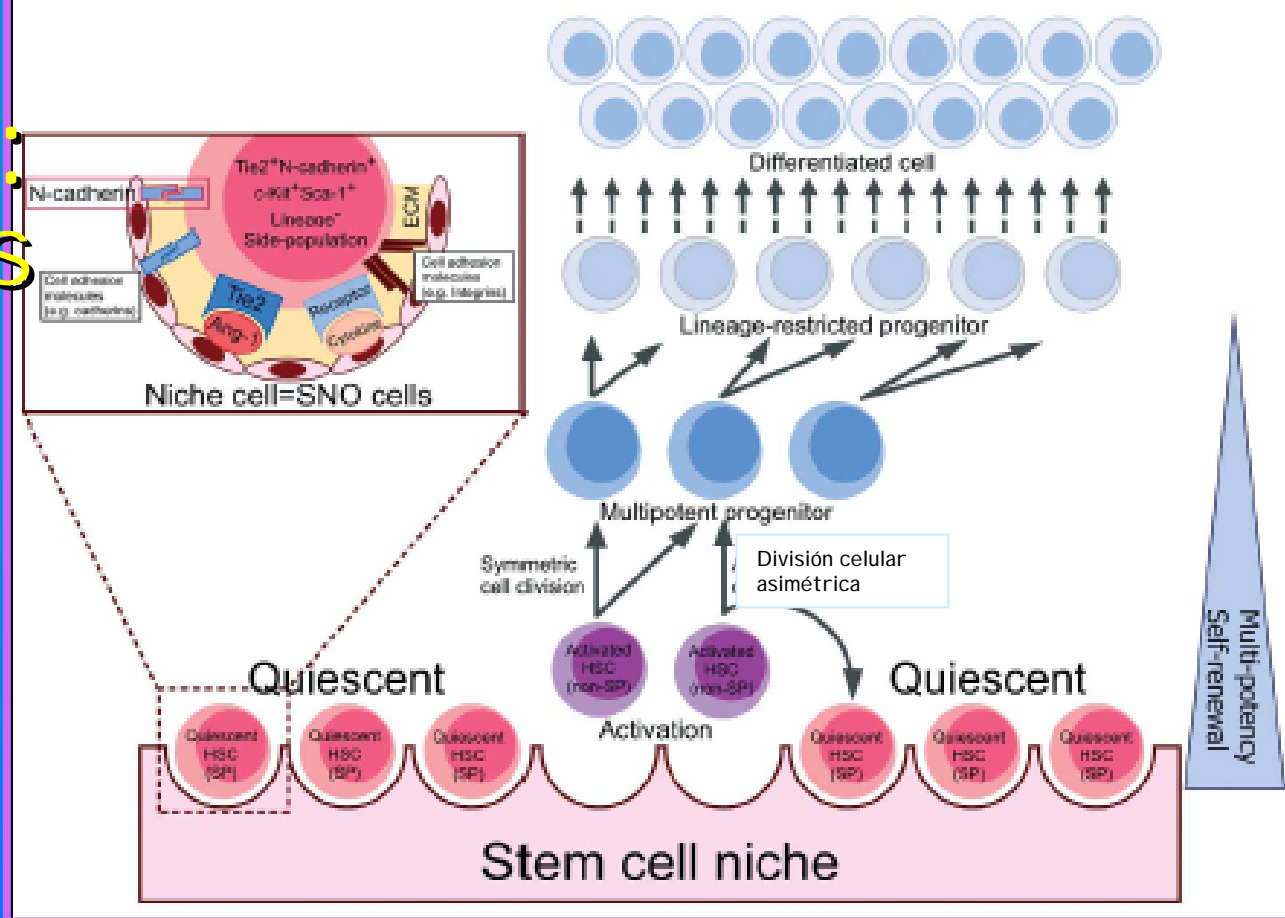
# Ontogenia de linfocitos

- 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

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

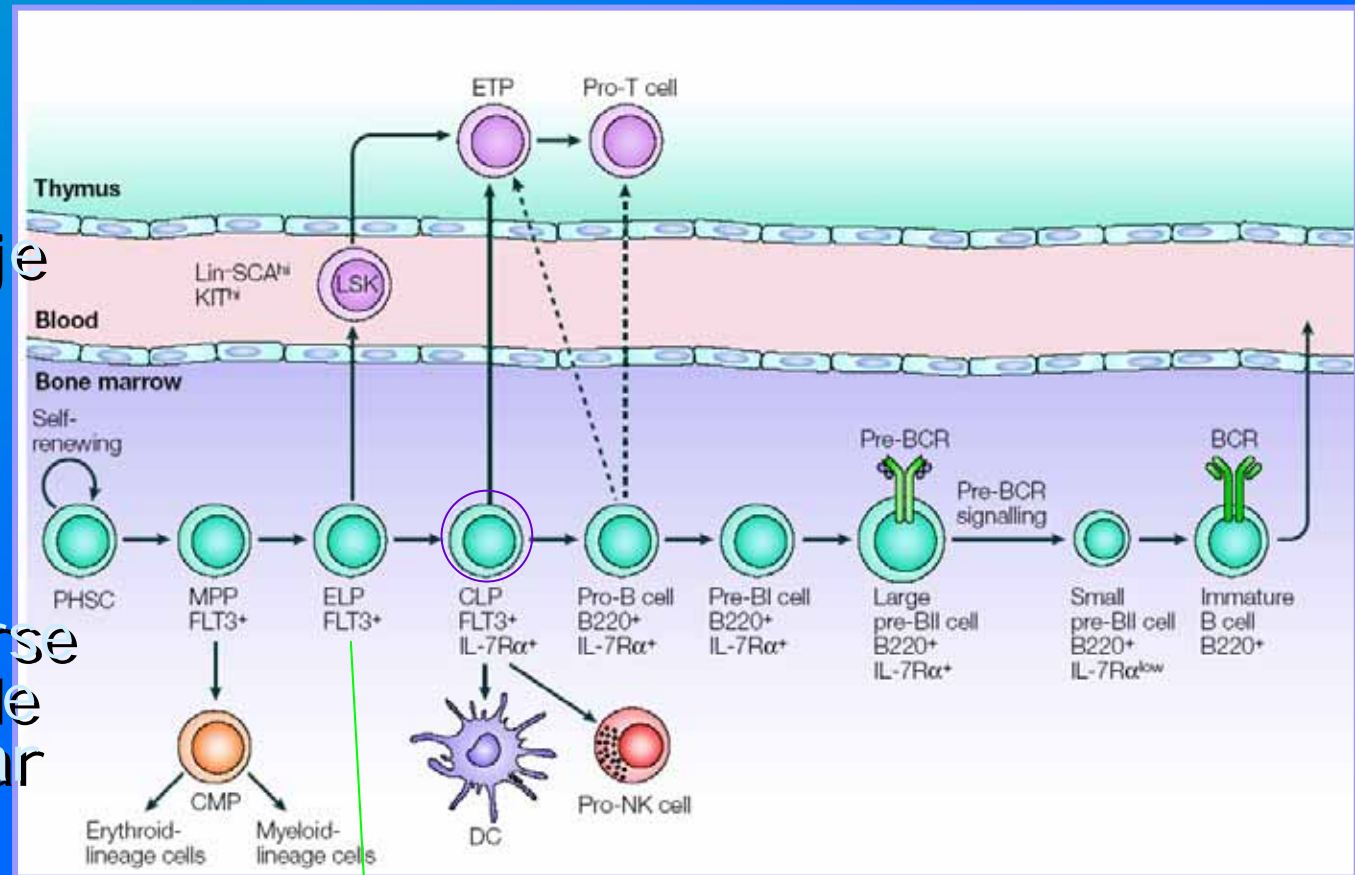
## Características de las HSCs en reposo

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 de linfocitos

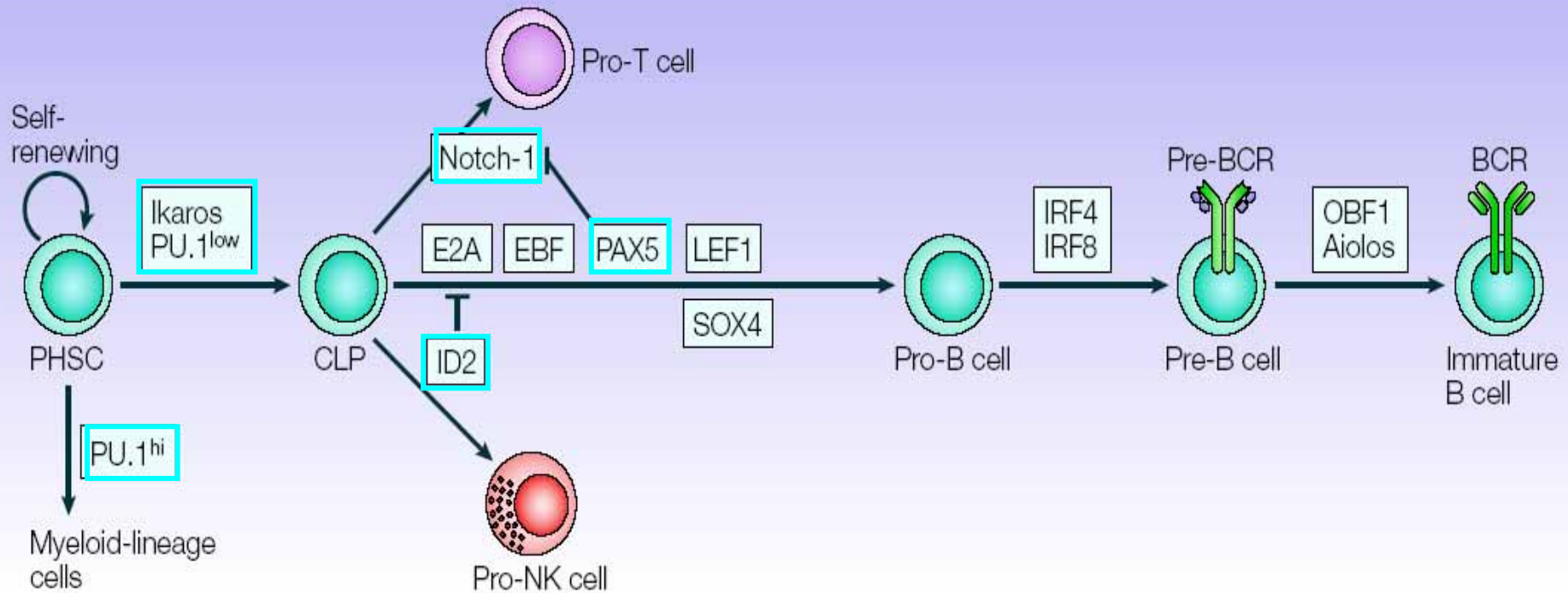
CLP: precursor linfoide común  
CMP: precursor mieloide común

- **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)

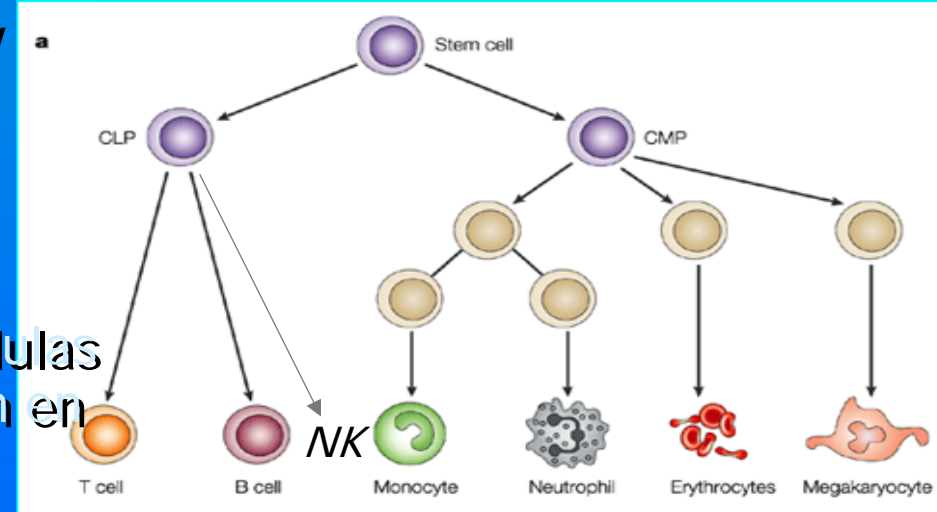
# Que elementos contribuyen con la decisión: Linaje mieloide vrs linfoide o Lin T vrs B



Factores de transcripción involucrados en el desarrollo

# Ontogenia: SERIE LINFOIDE

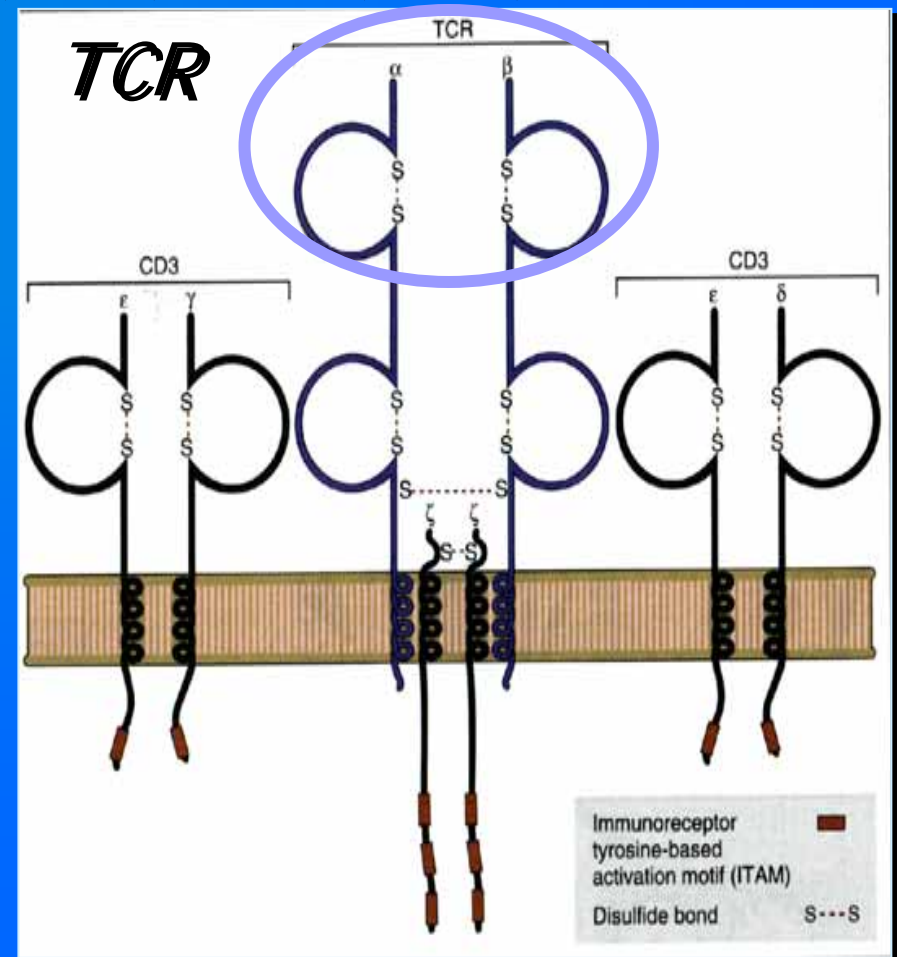
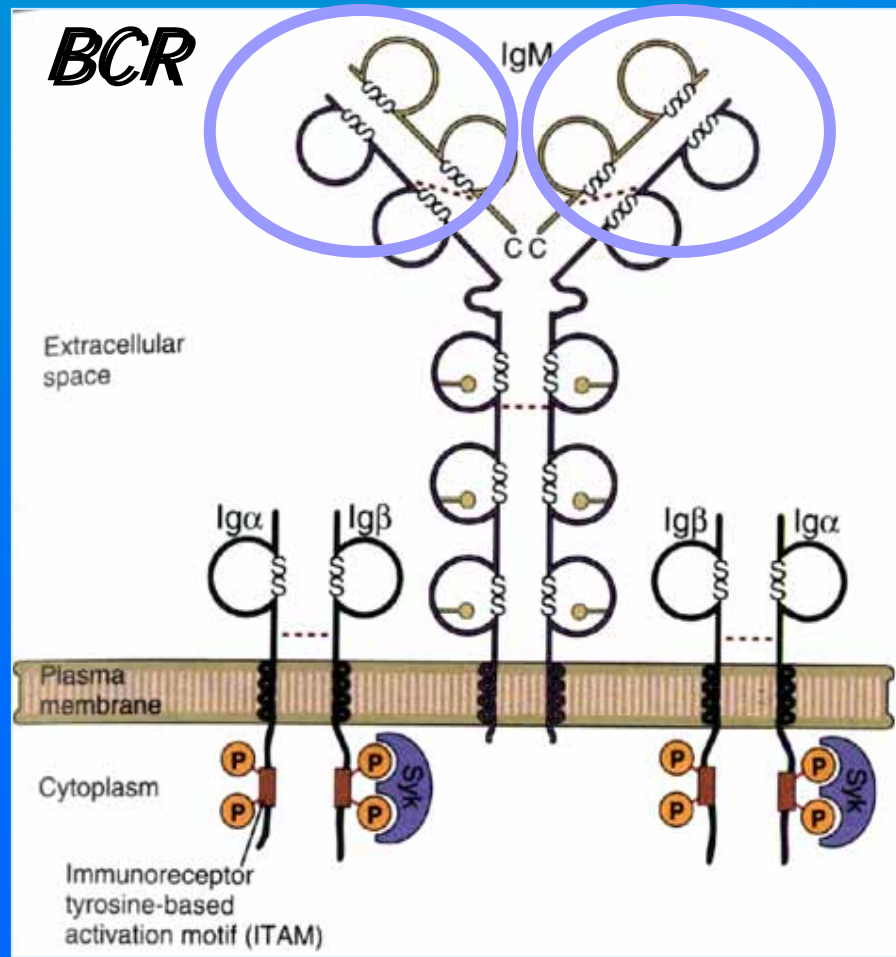
- Los linfocitos T, B y NK se originan de un precursor
  - El primer evento es ubicarse en estadio *precursor linfoide común* (CLP), dará origen a: T, B, NK y células dendríticas de origen linfoide (plasmocitoides)
  - Destinados a originar células B permanecen en la MO
  - Destinados a madurar como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



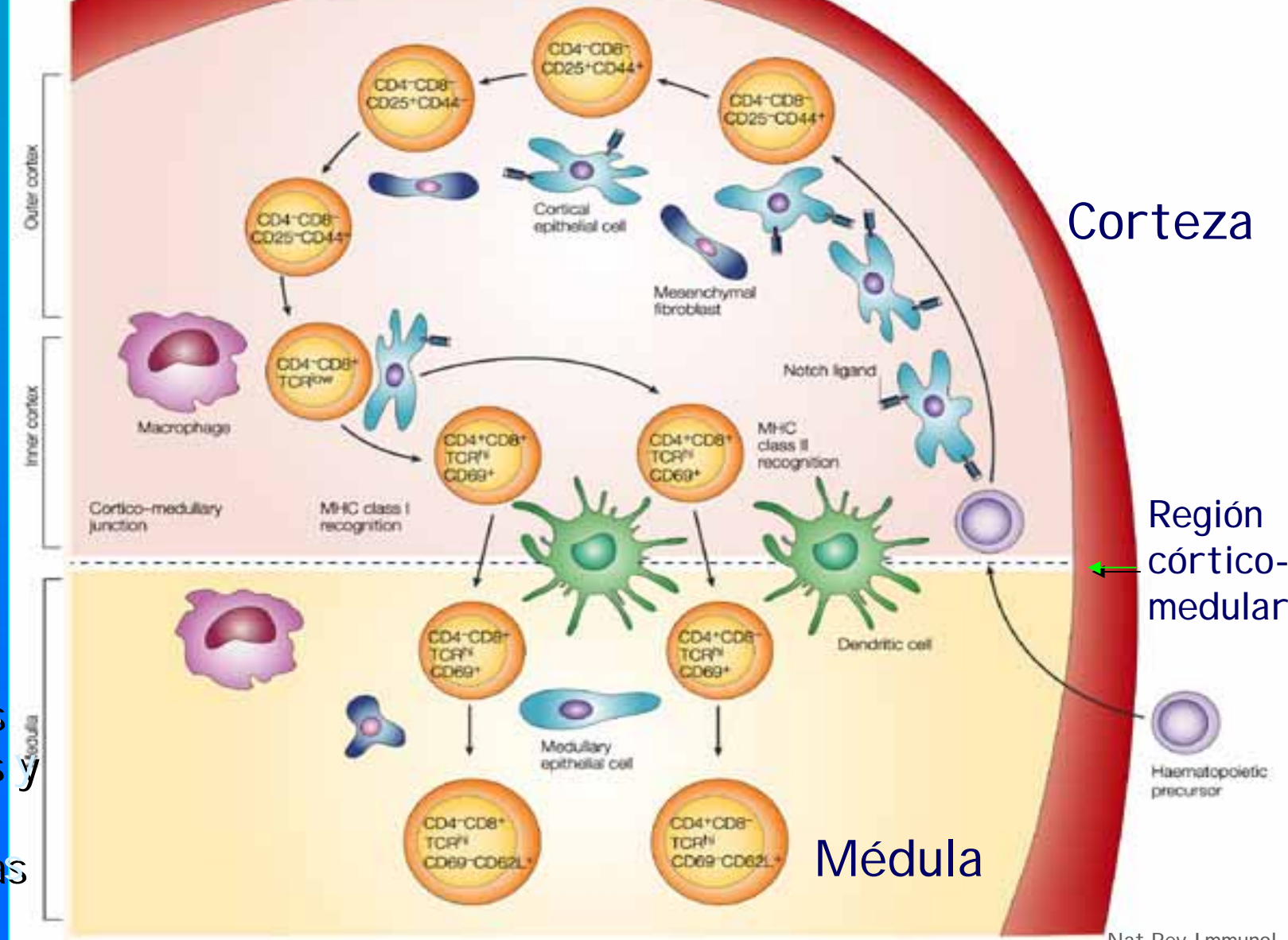
*CD4 o CD8*

TCR: cadenas  $\alpha$  y  $\beta$   
( $\gamma$  y  $\delta$ ) asociados  
con CD3 ( $\gamma, \delta, \epsilon$ , y  $\zeta$ )  
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



Células  
epiteliales  
corticales

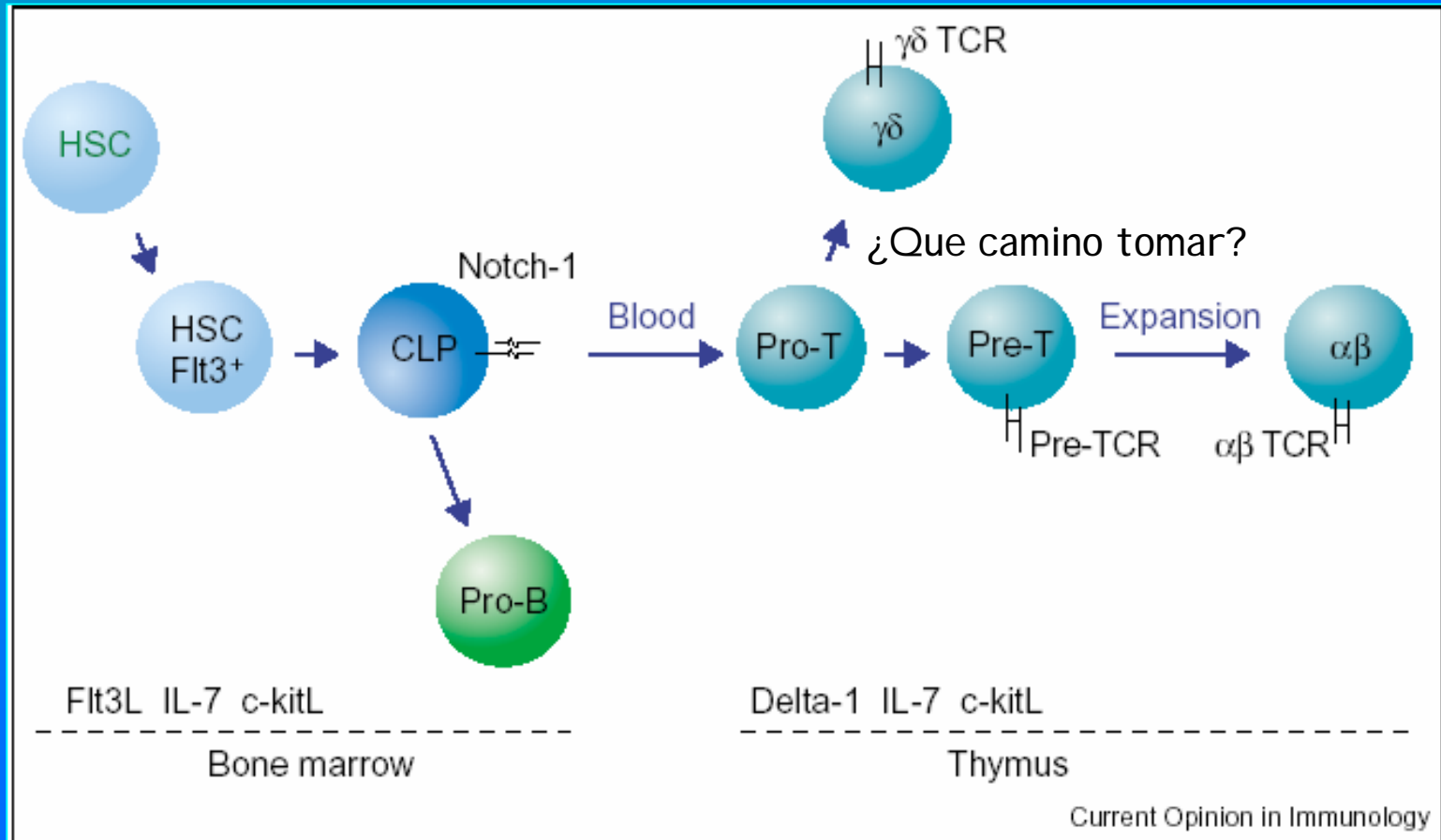
Células  
epiteliales  
medulares y  
células  
dendríticas

Corteza

Región  
cortico-  
medular

Médula

# 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

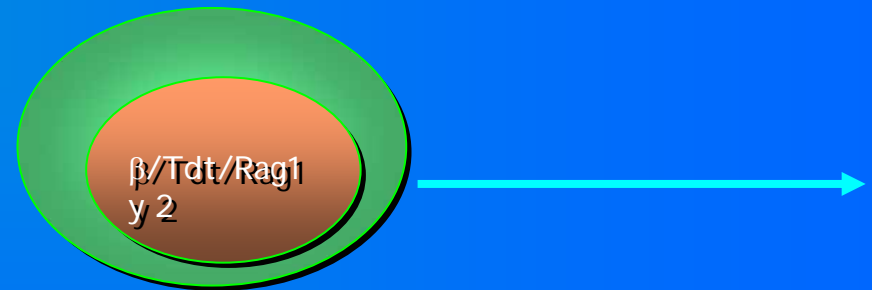
# Ontogenia de Linfocitos T

Timocito temprano:

Pro-T:

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

Doble negativo (DN=CD4- /CD8-)



Mediado por Recombinasas 1 y 2 (Rag1 y 2)

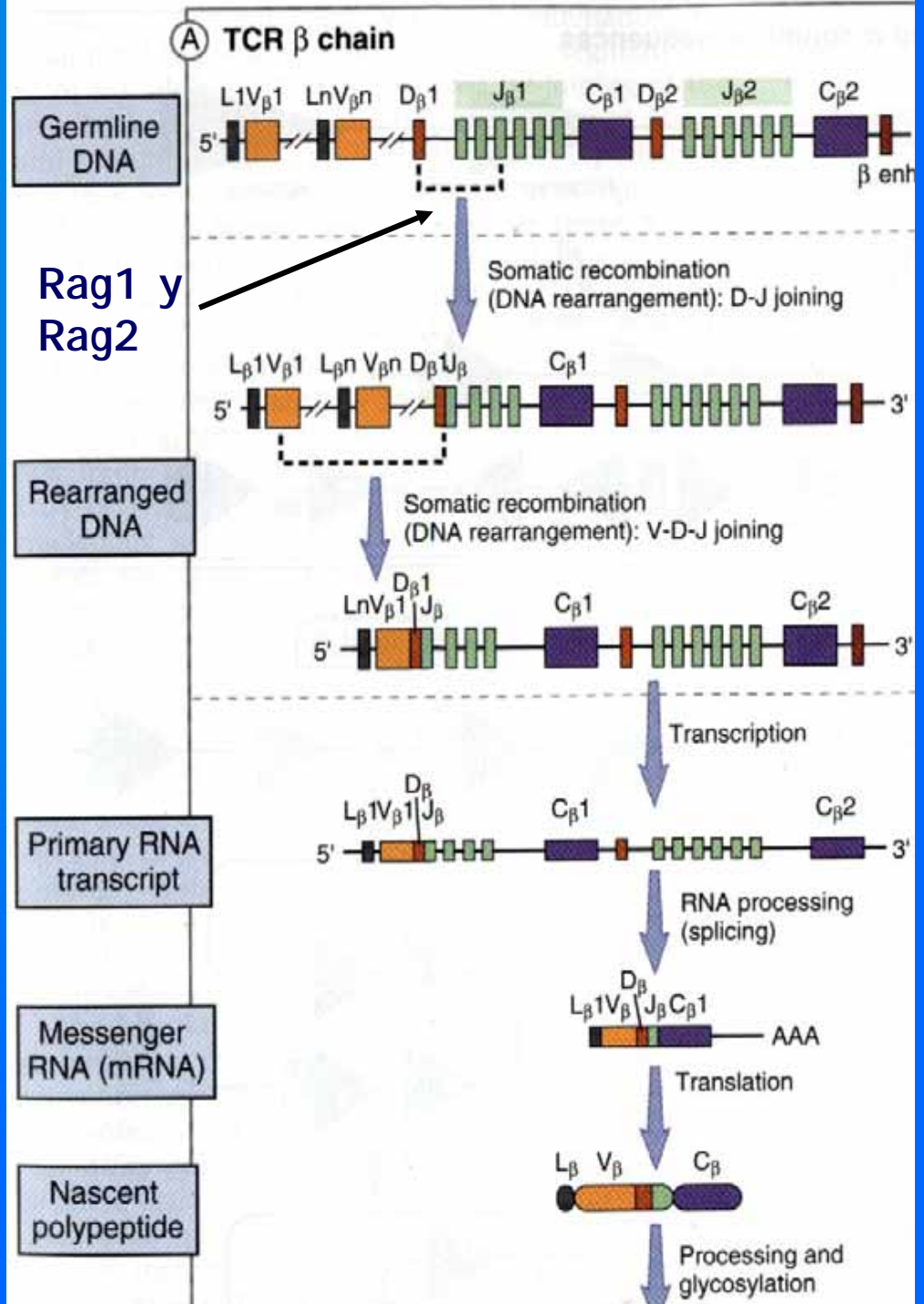


*Familia de genes de la región variable, diversidad y unión*

Región constante

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

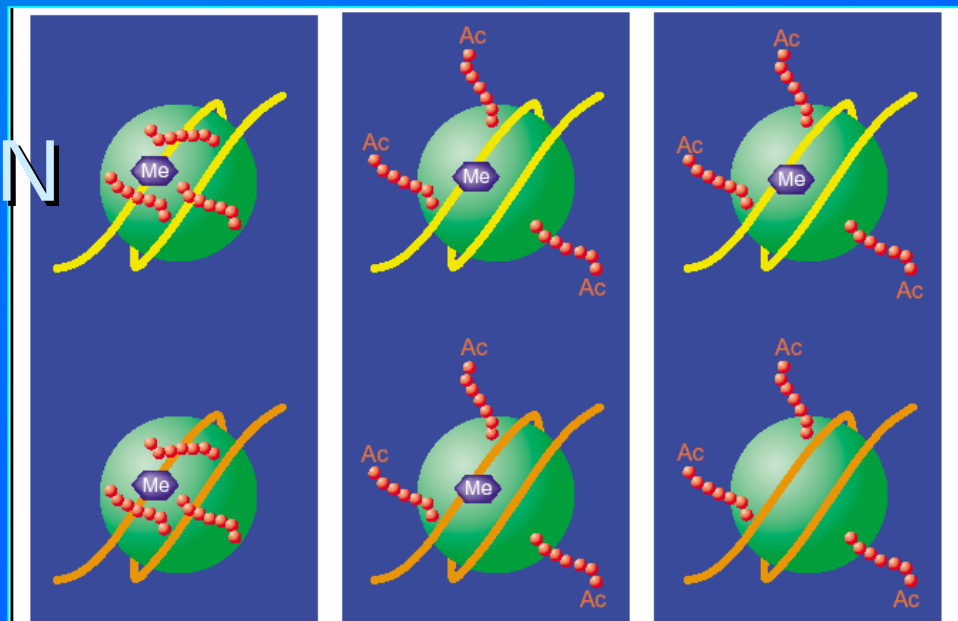
Dos alelos:  
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: **EXCLUSIÓN ALÉLICA**



# Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

Modificaciones de las histonas

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

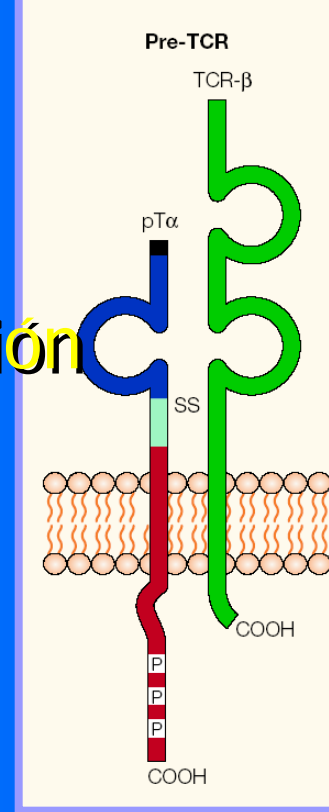




# Ontogenia de Linfocitos T

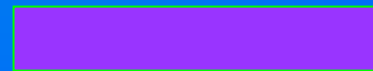
Pre-T: expresión de la cadena  $\beta$  y formación de pre-TCR

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-)



1 2 3 4 5 6 n

1 2 3 4 n

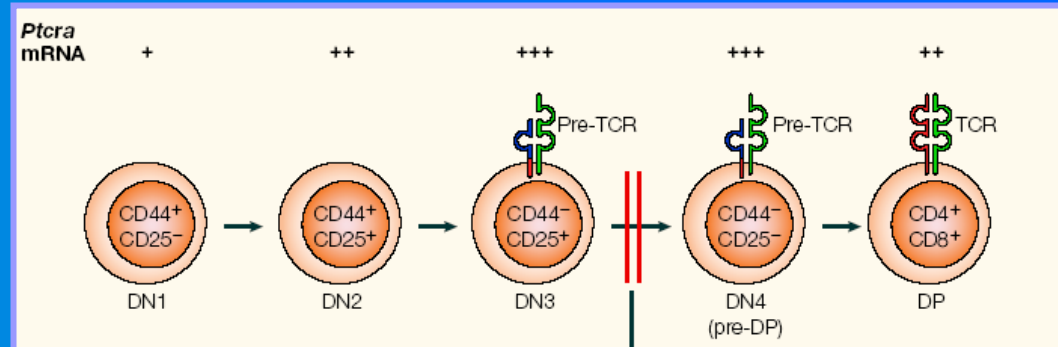


*1er alelo*

*Región variable, diversidad y unión*

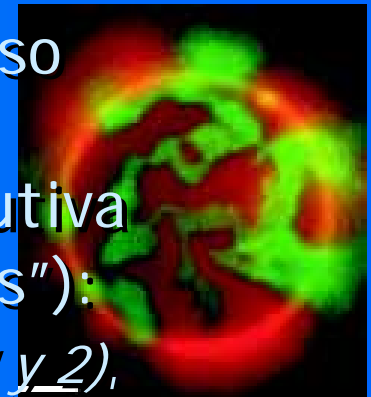
Región constante

# Ontogenia: LINFOCITOS T



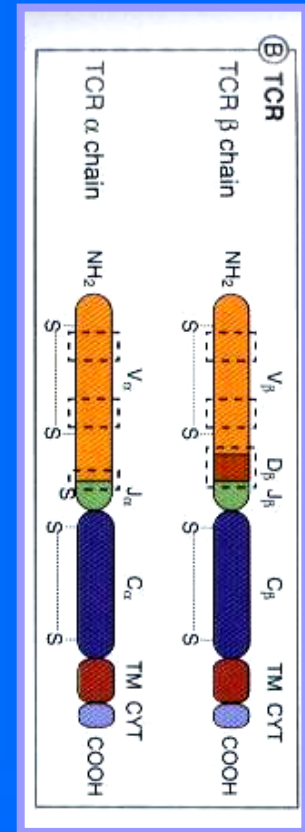
## preTCR:

- Es expresado seguido al reordenamiento exitoso de TCR $\beta$ .
- 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 mas 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**)



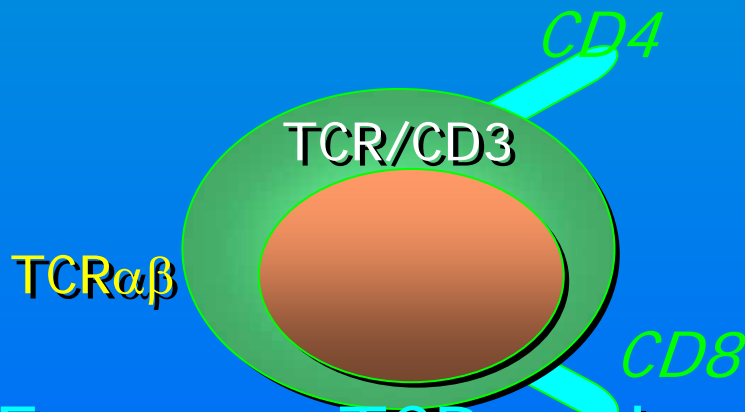
# Ontogenia de linfocitos

- 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  $\beta$  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**

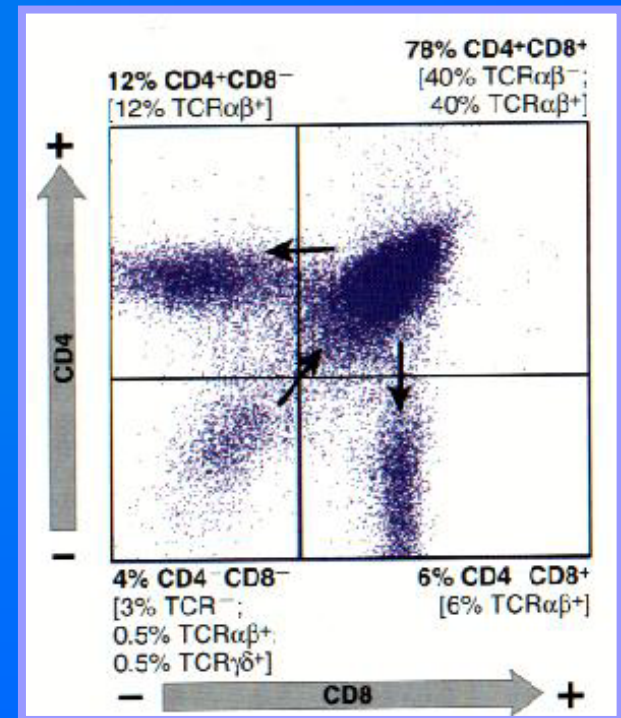


# Ontogenia de Linfocitos T

## Timocito doble positivo (DP):

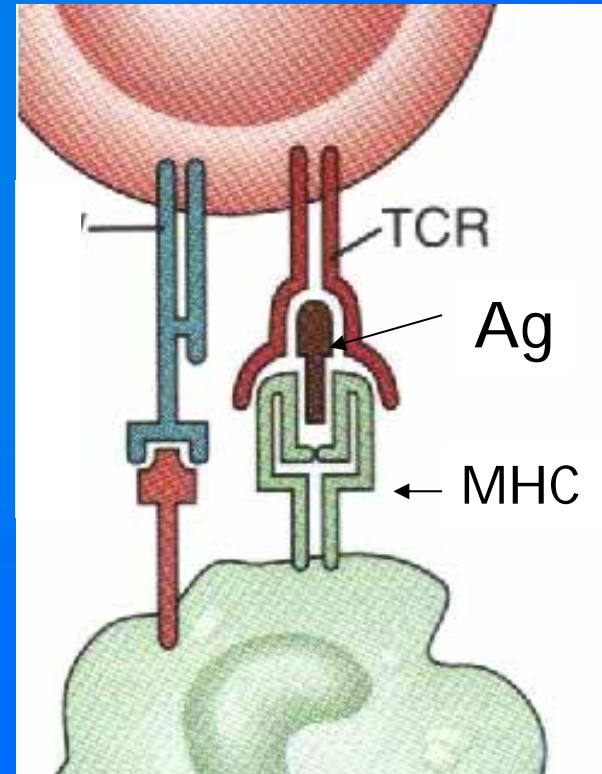


Expresan TCR y además CD4 y CD8 (Doble Positivas) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo

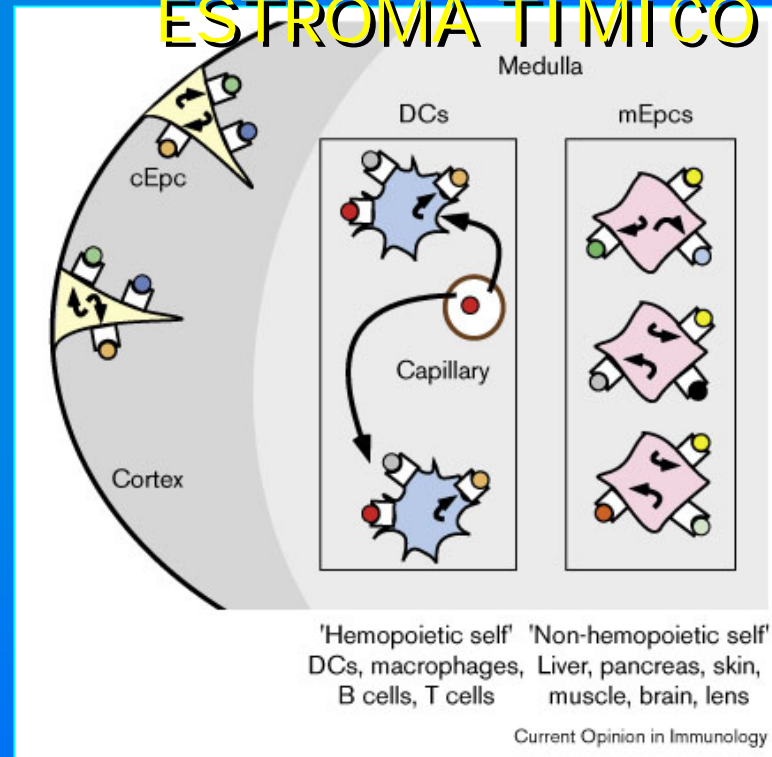
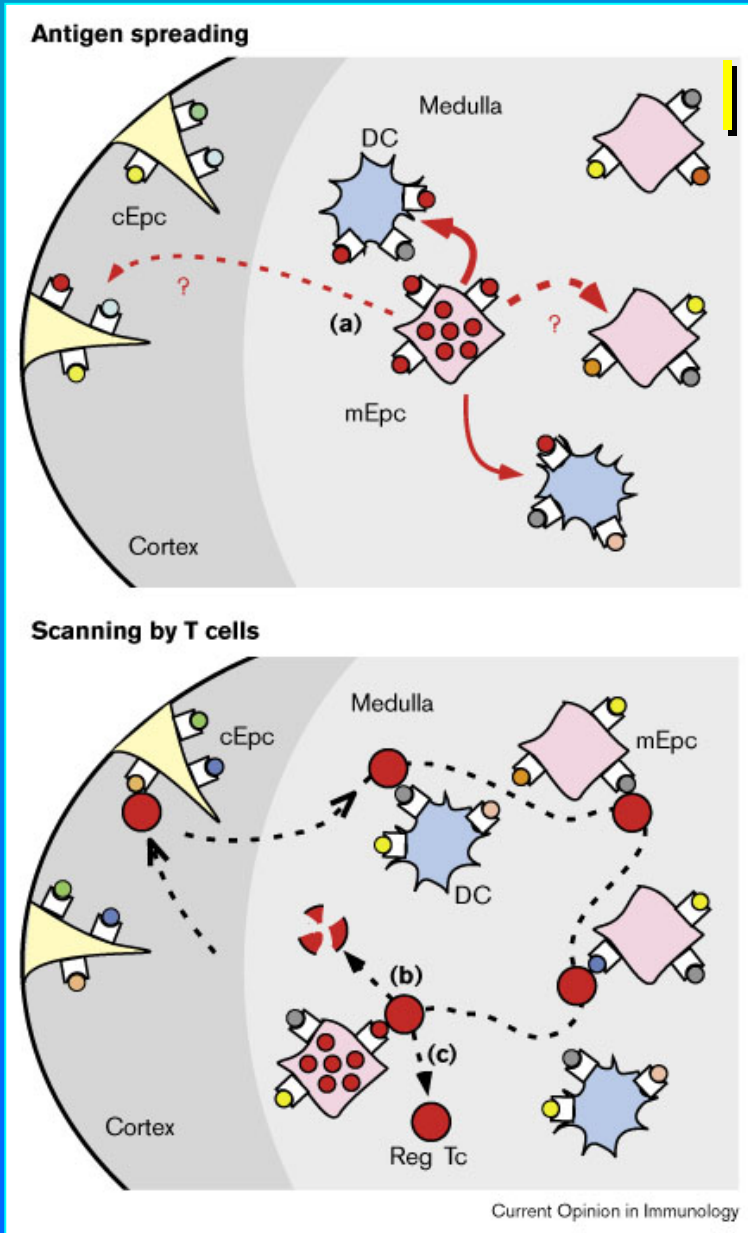


# Ontogenia de Linfocitos T

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

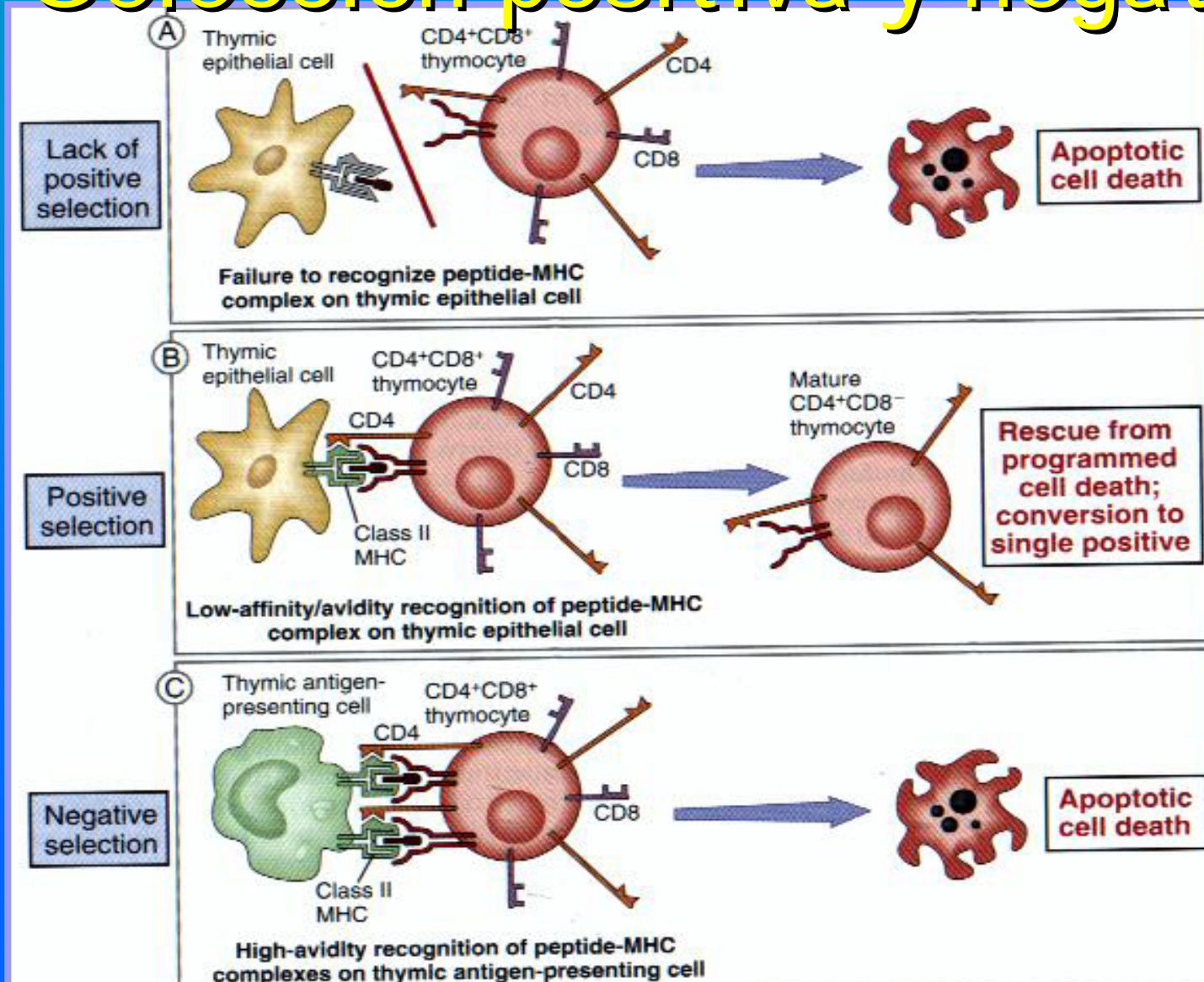


# Ontogenia de linfocitos T: CÉLULAS DEL ESTROMA TÍMICO



- 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)

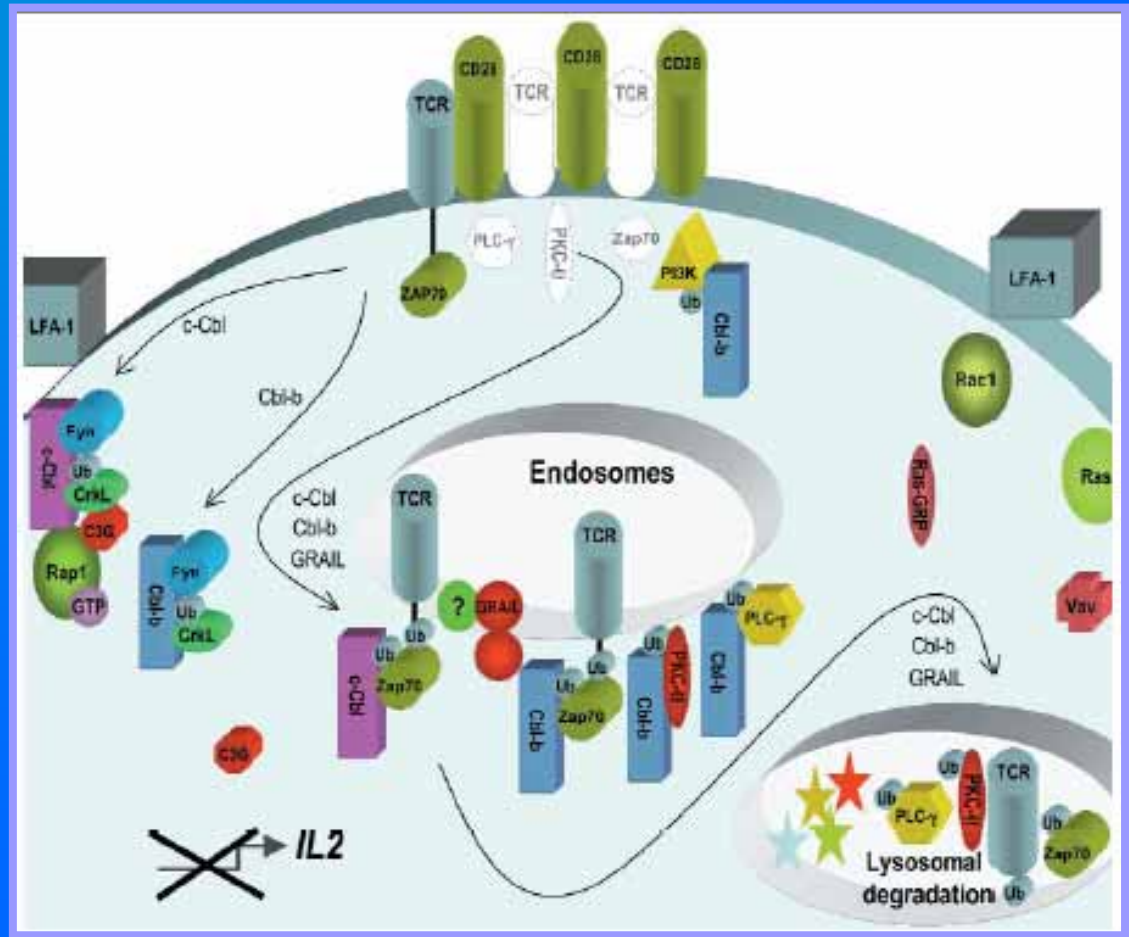
# Ontogenia de Linfocitos T: Selección positiva y negativa



Muerte o  
anergia

# Ontogenia: MECANISMOS DE SELECCIÓN

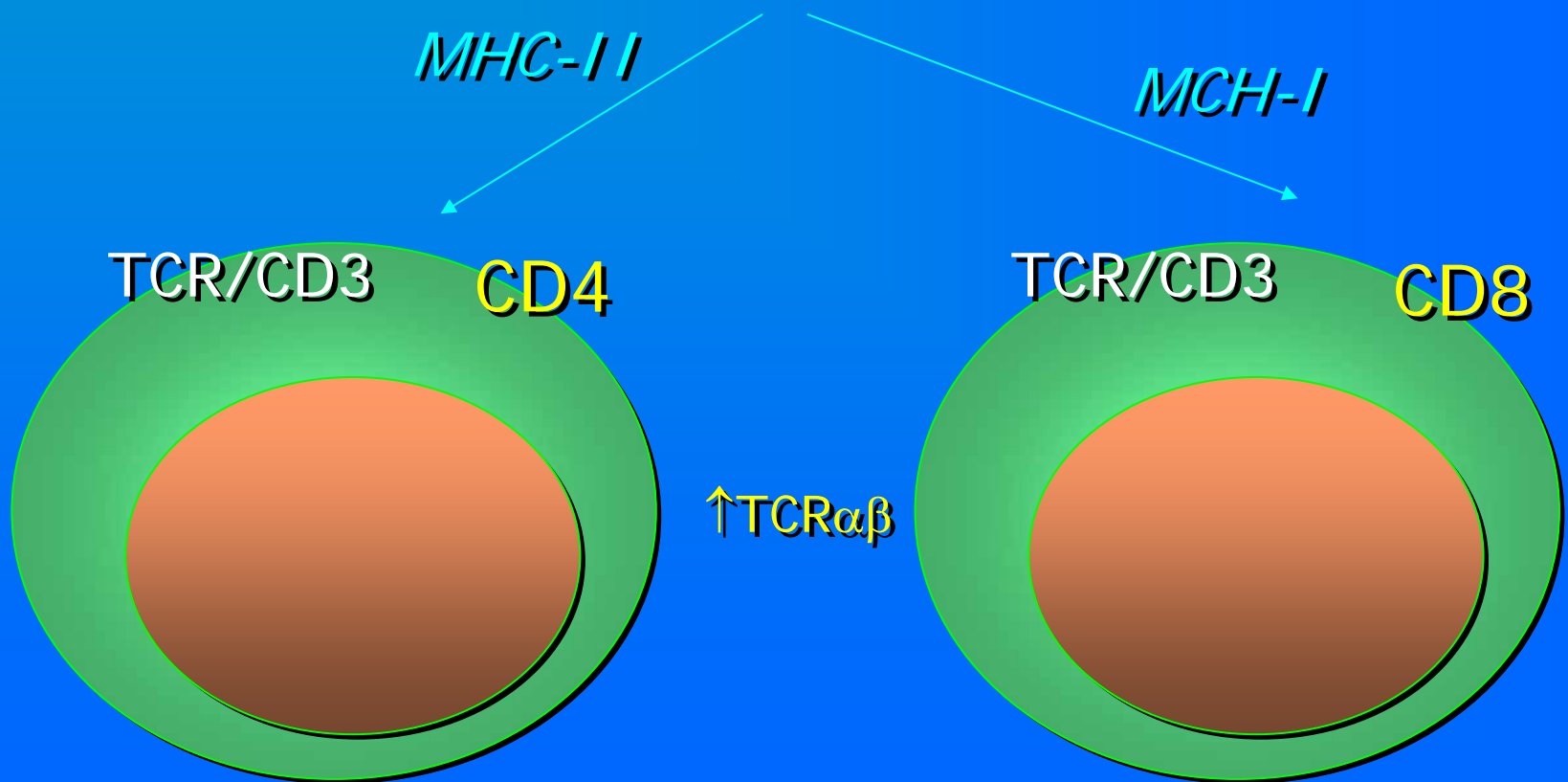
- Mecanismos involucrados en la anergia
  - Reciclaje acelerado del TCR, por ubiquitinación mediado por la fosforilación constitutiva de Cbl (ligasa de ubiquitina)
  - Proceso reversible





# Ontogenia de Linfocitos T

Linfocito T maduro:

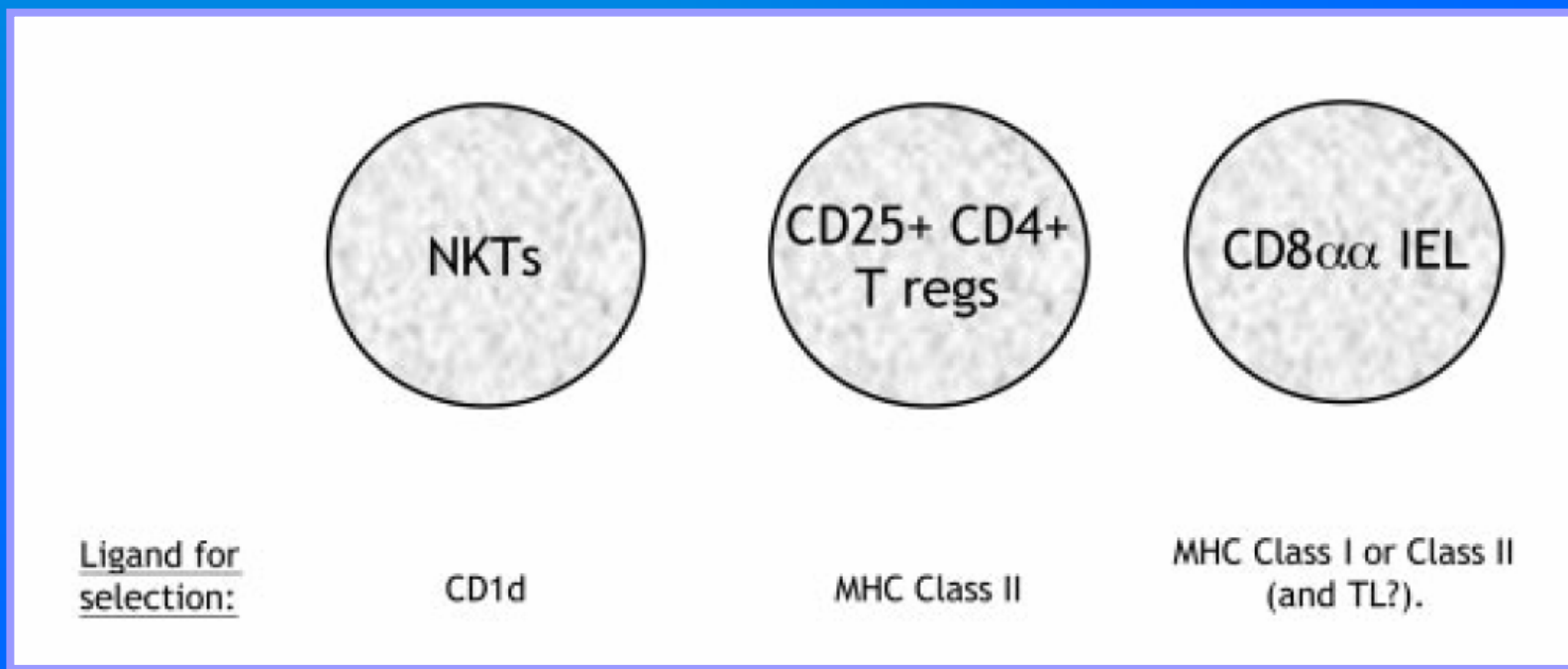


# Ontogenia de linfocitos T

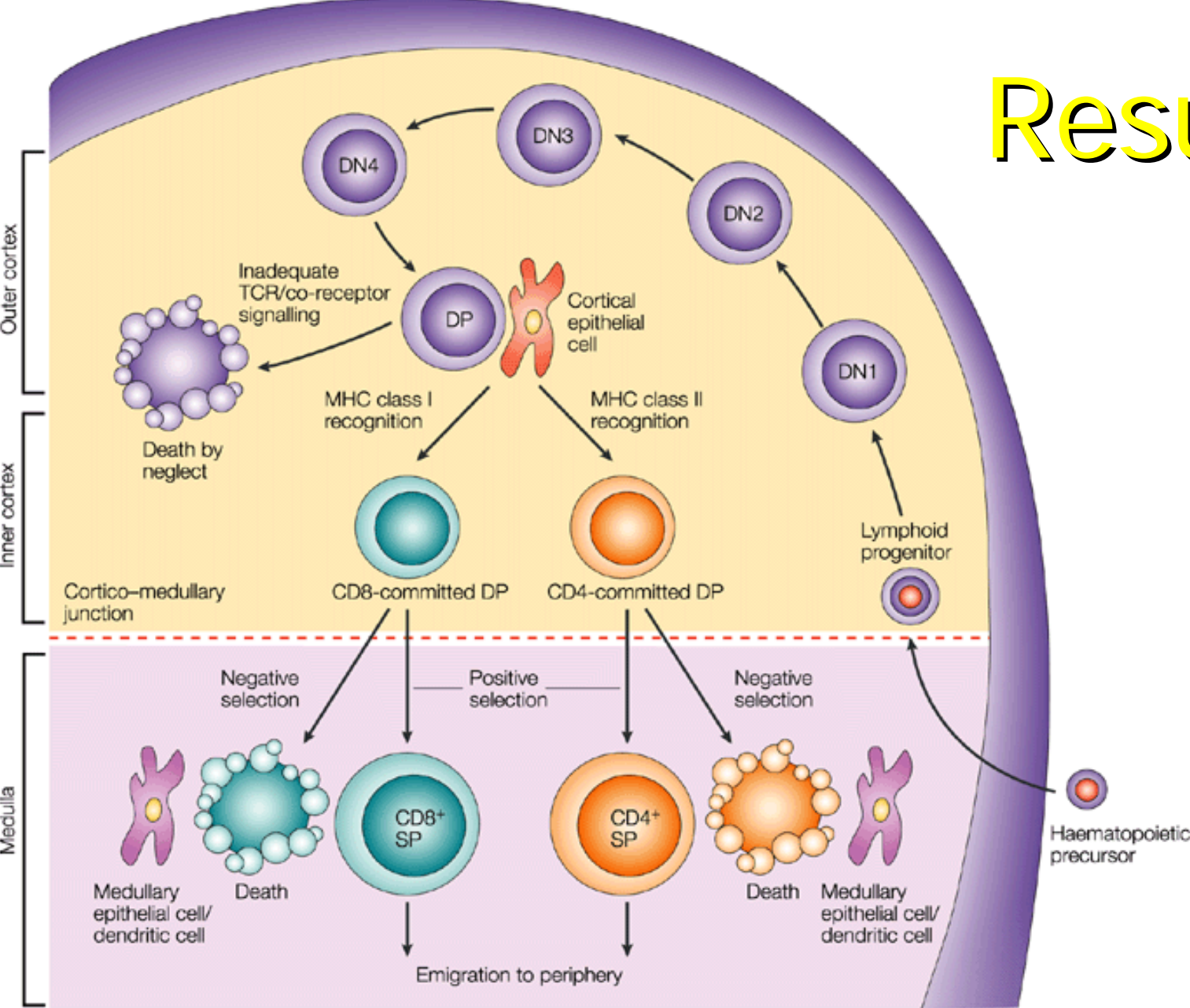
- **Selección positiva** (rescate de la apoptosis):
  - TCR tenga baja afinidad por los Ag propios
  - Células epiteliales tímicas
- **Selección negativa:**
  - TCR con alta afinidad por el Ag propio o incapaz de interactuar con MHC (I y II)
  - Corteza profunda, unión córtico-medular y médula
  - Células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

# Ontogenia de linfocitos: DESARROLLO DE CÉLULAS T REGULADORAS

- Selección positiva por agonista



# Resumen



# Ontogenia de los linfocitos B

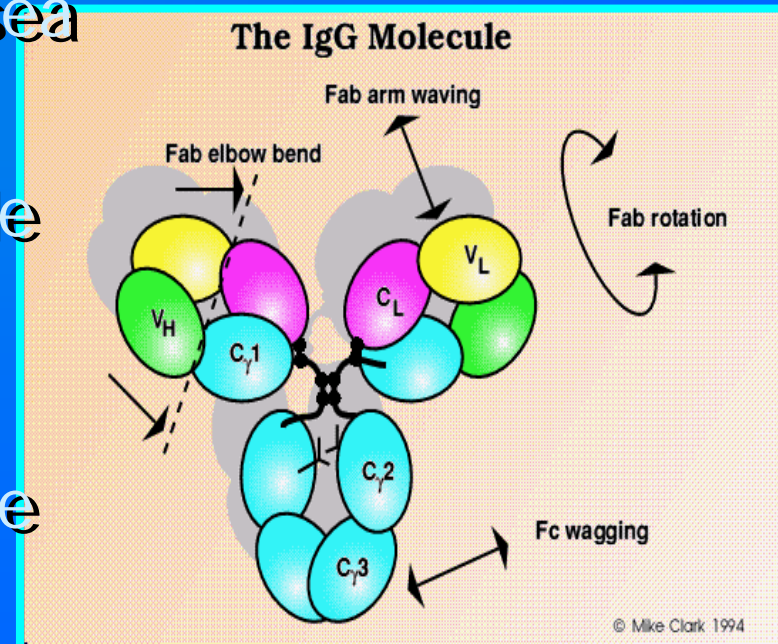
**BCR:**

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

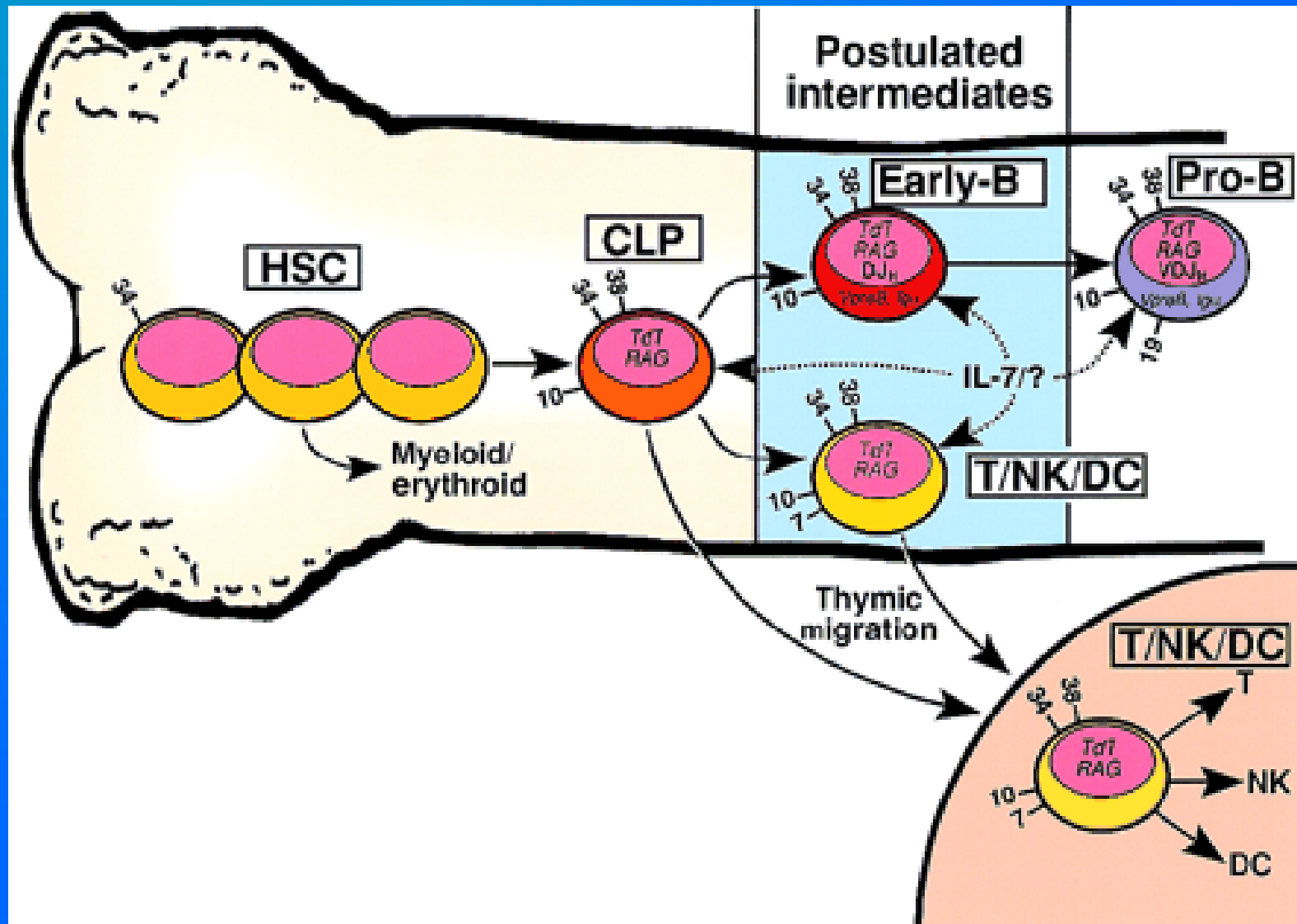


# Ontogenia de linfocitos B

- 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



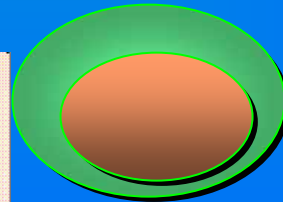
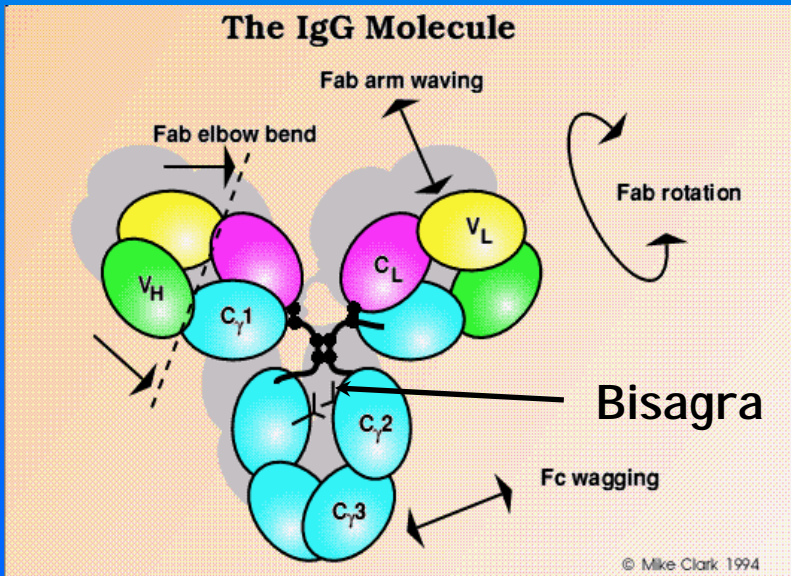
# Ontogenia: LINFOCITOS B



# Ontogenia de Linfocitos B

pro-B:

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



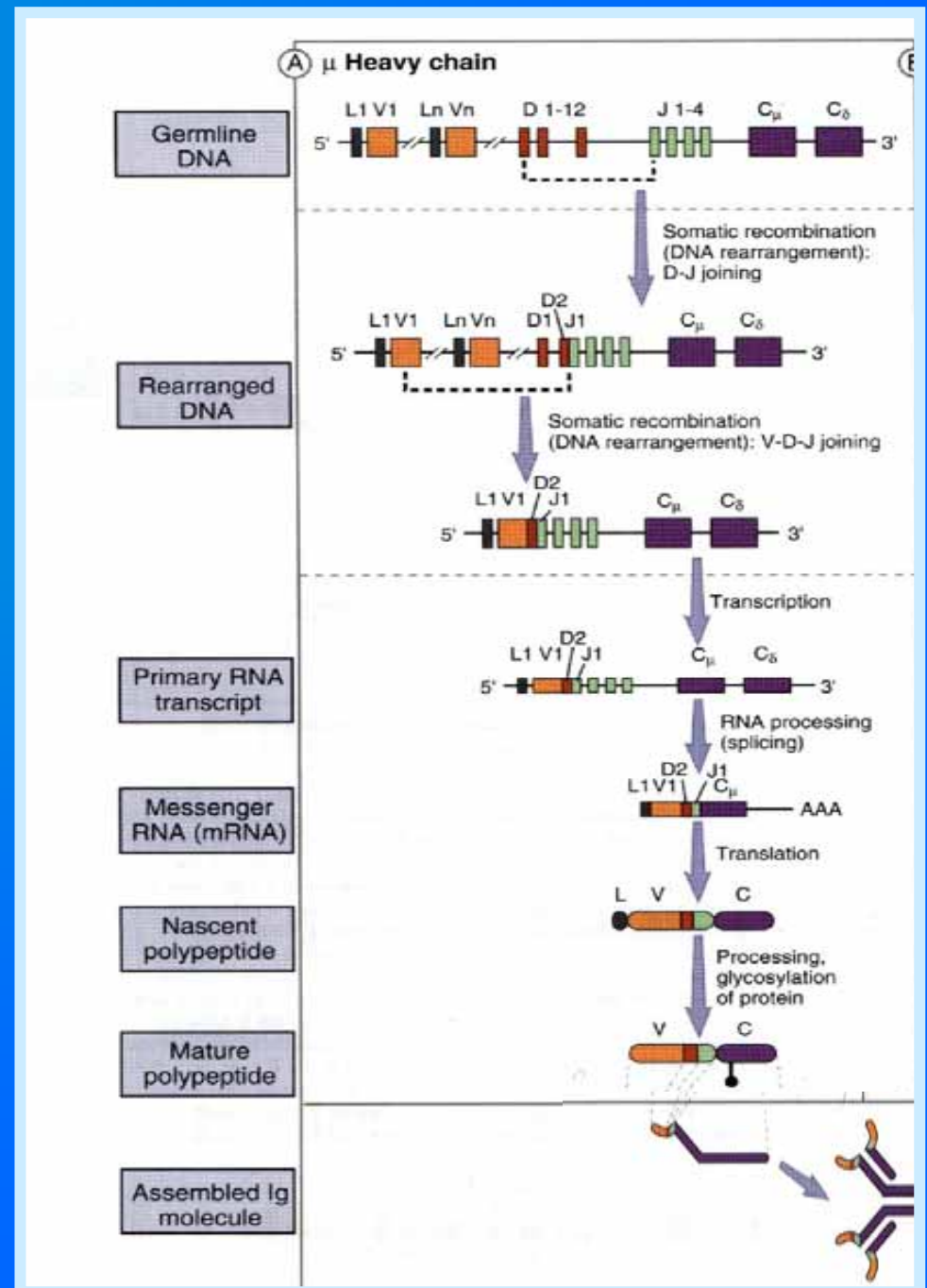
IL-7R  
IL-3R



# 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

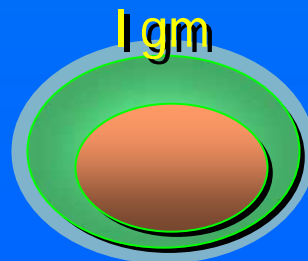
## pre-B:

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

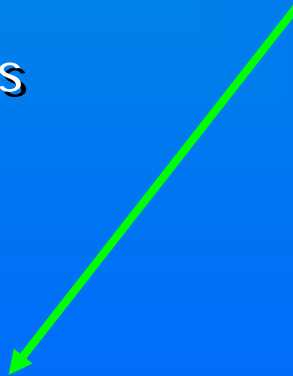
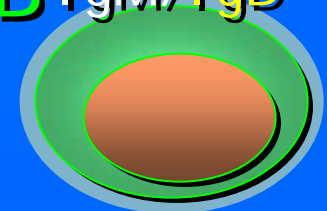


Las señales del pre-BCR median la exclusión alélica del locus de la cadena pesada  
-Reordenamiento genético de las cadenas livianas Ig

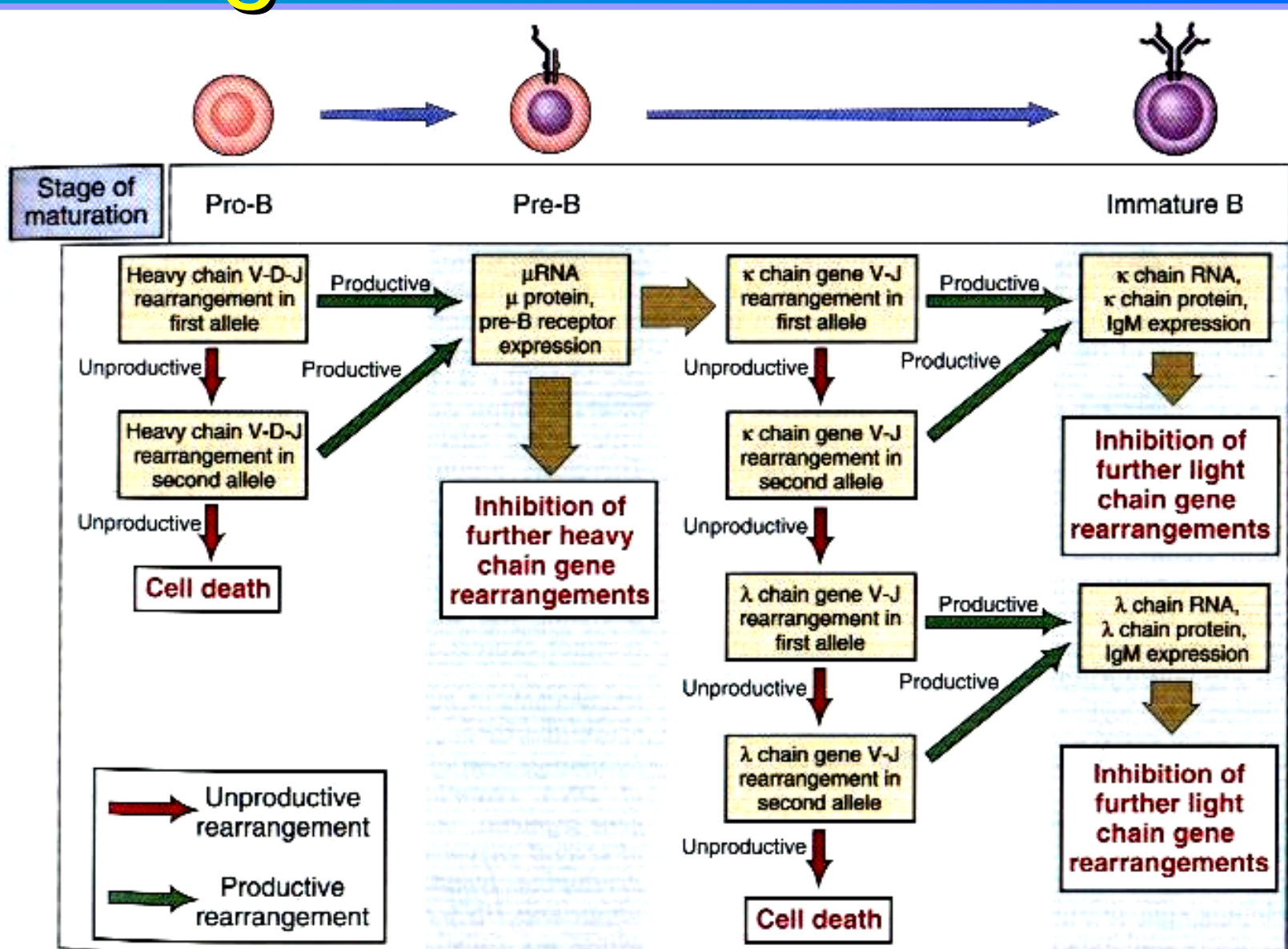
Linfocito B inmaduro:



Linfocito B IgM/IgD maduro:



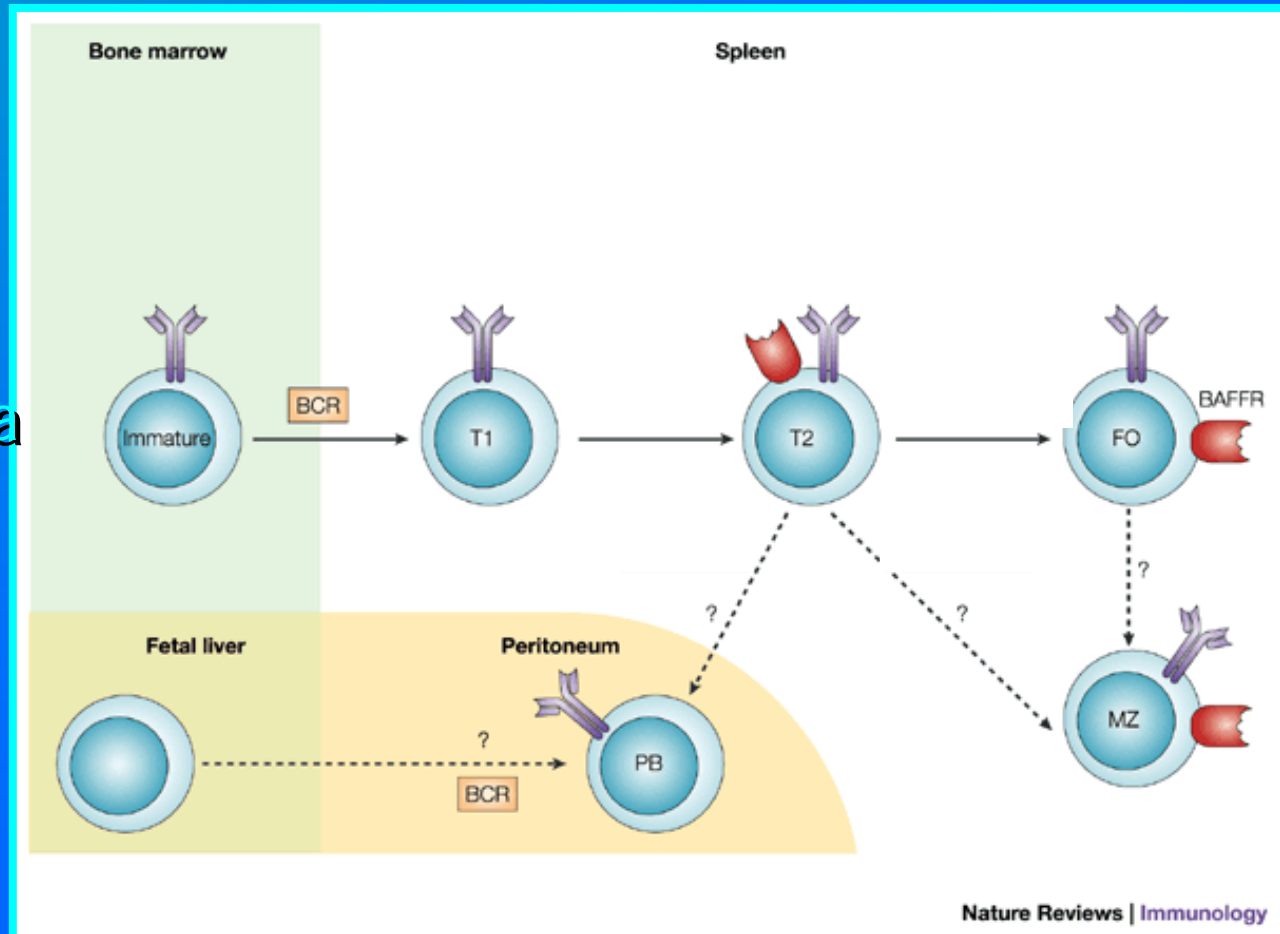
# Ontogenia de Linfocitos B



# Ontogenia: LINFOCITO B

- Emigran de la MO

Tres poblaciones:  
Foliculares, Zona marginal y peritoneales



# Ontogenia: LINFOCITOS, mecanismos de selección

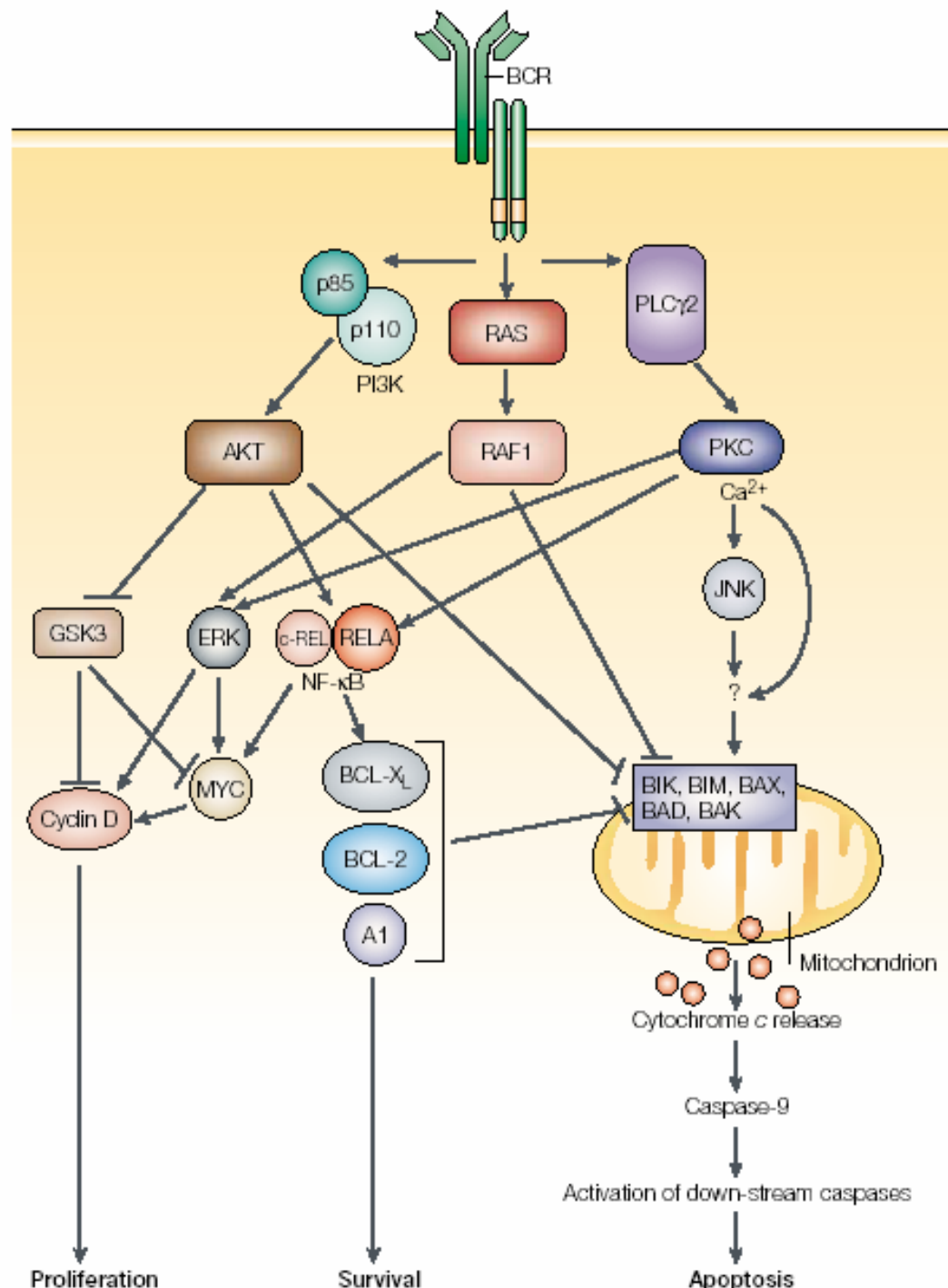
Selección positiva

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	-	+	++	++/- <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 -.

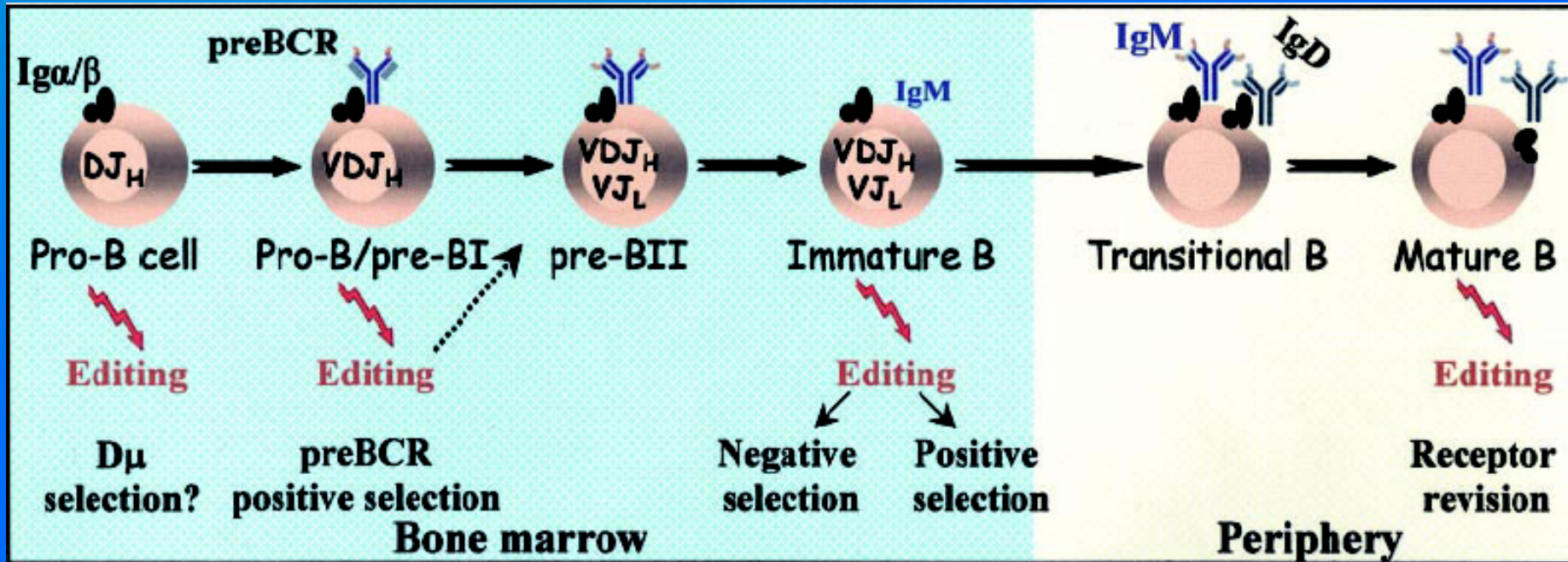
<sup>b</sup> Only in peritoneal cavity; B-1 cells are CD11b/Mac-1<sup>-</sup> in spleen.

T1, T2 = transitional (maturing) B cells.

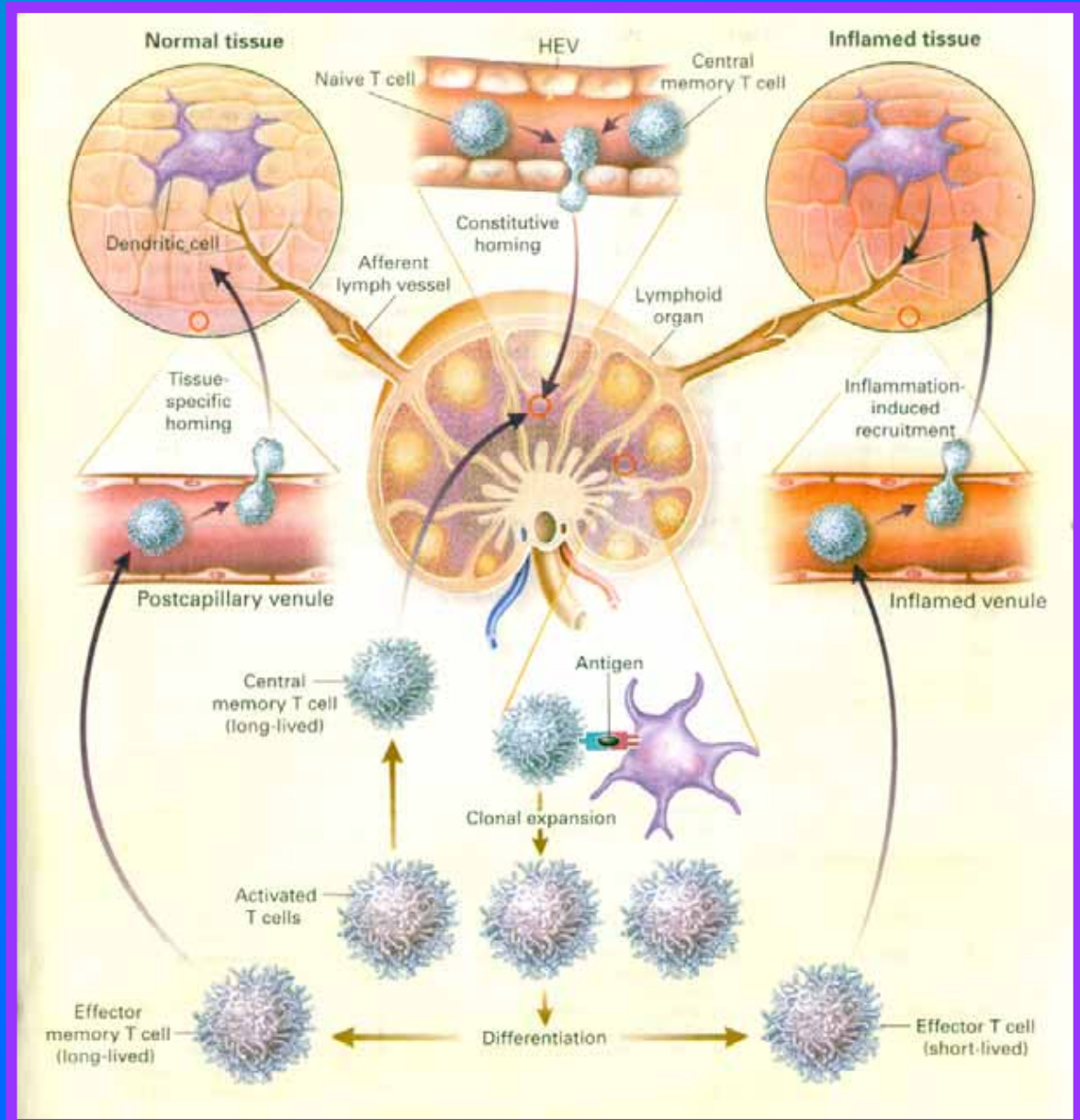
MR = mature recirculating B cells.

MZ = marginal zone B cells.

# Resumen



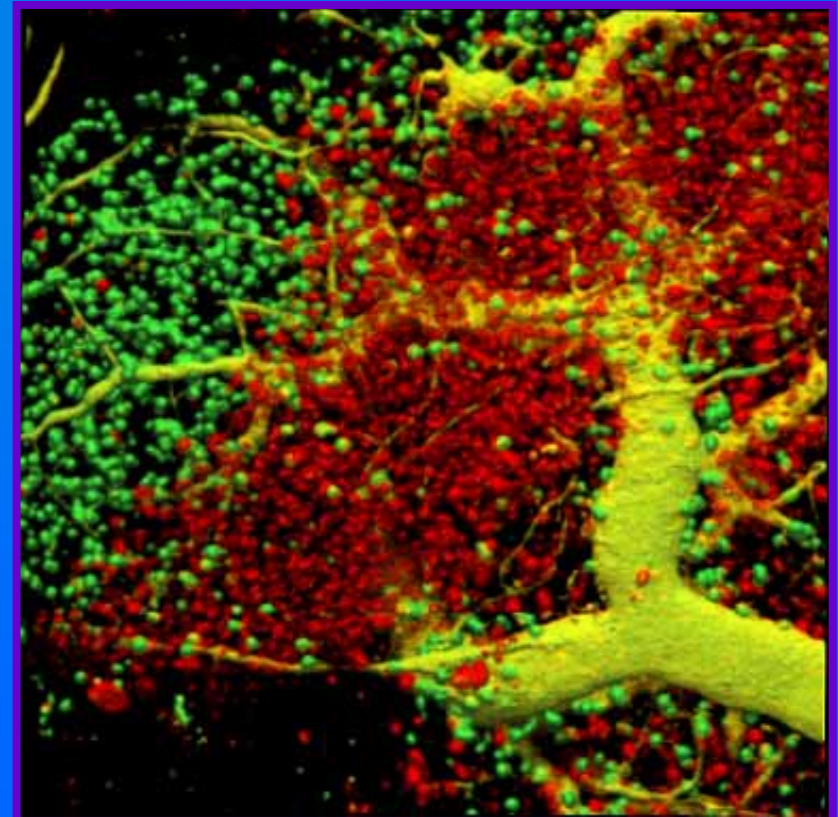
*¿Que eventos regulan la migración y alojamiento dentro de un tejido o de un tejido a otro?*





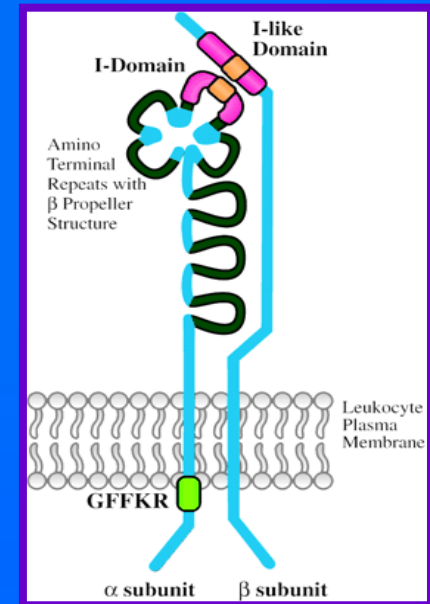
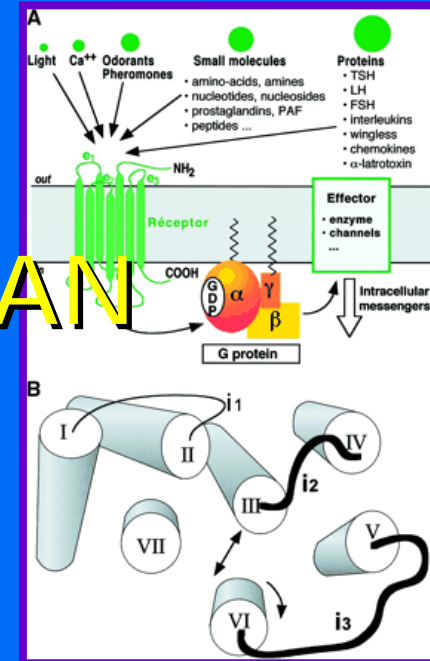
# Recirculación y alojamiento de los leucocitos: ¿De qué depende?

- 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, quimocinas y las moléculas de adhesión

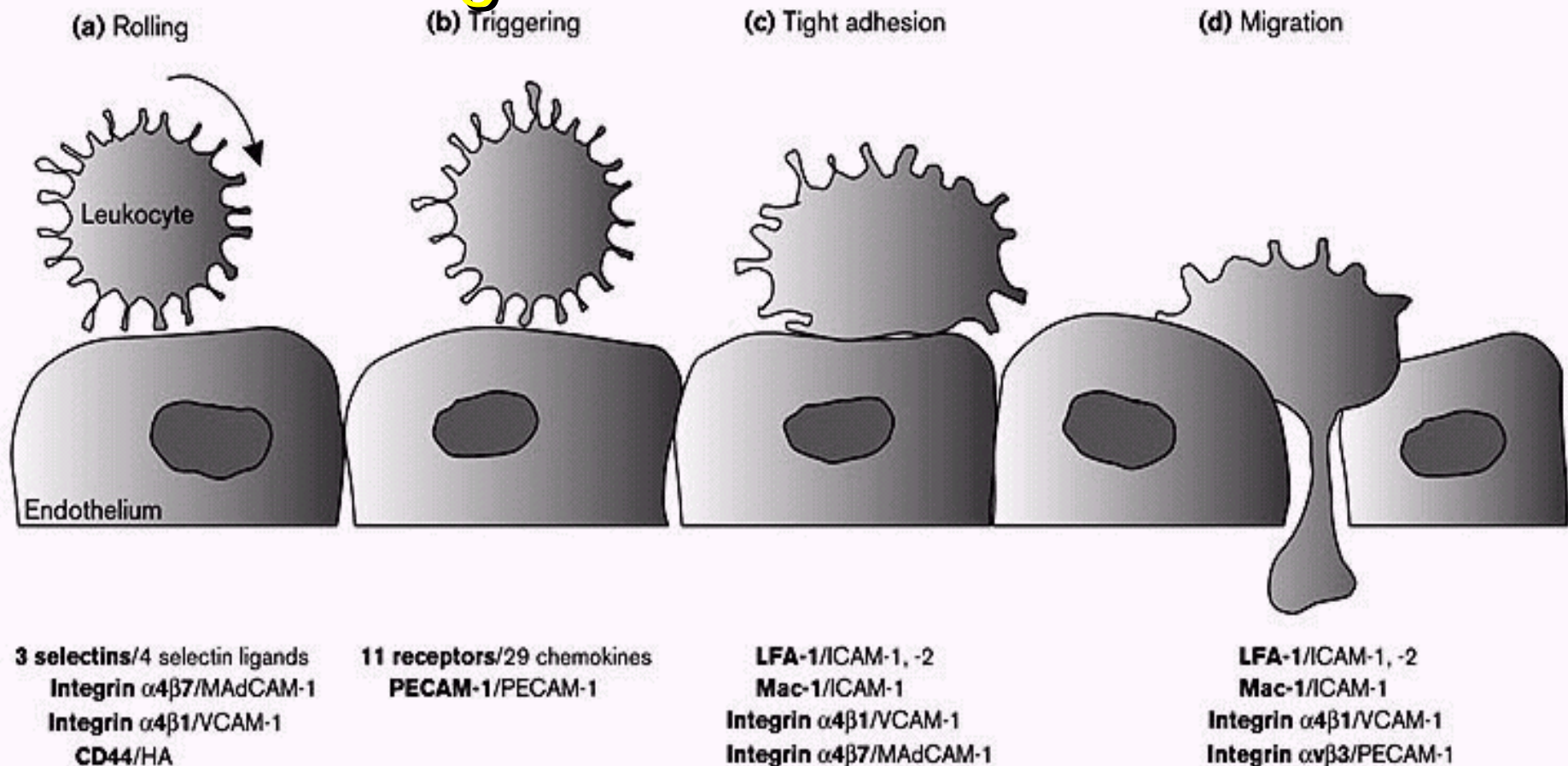


# Migración de leucocitos: ELEMENTOS QUE PARTICIPAN

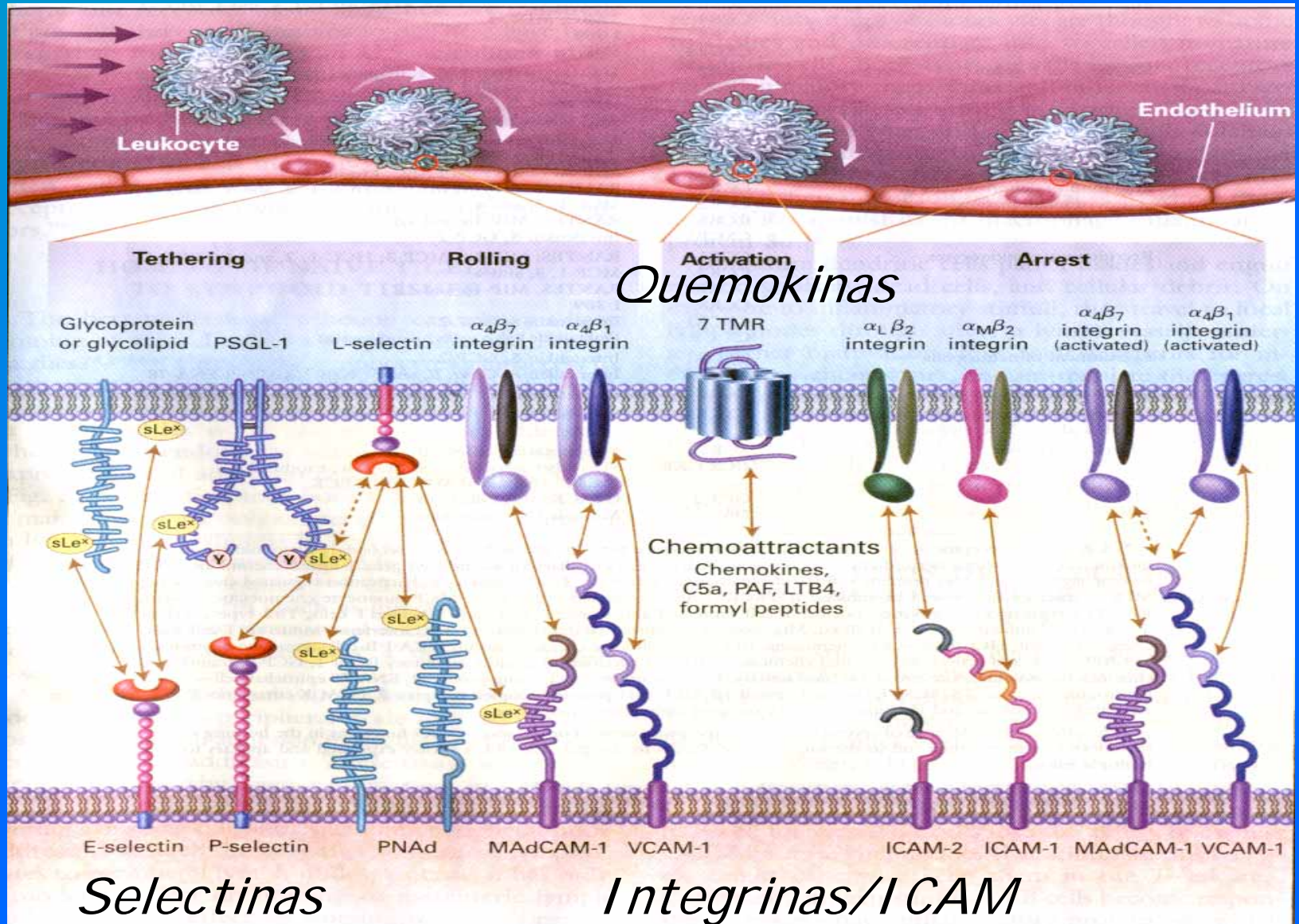
- Quemokinas y sus receptores
  - Interleukinas con capacidad quimiotáctica
- Integrinas
- Cadherinas
- Selectinas
- ICAM



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

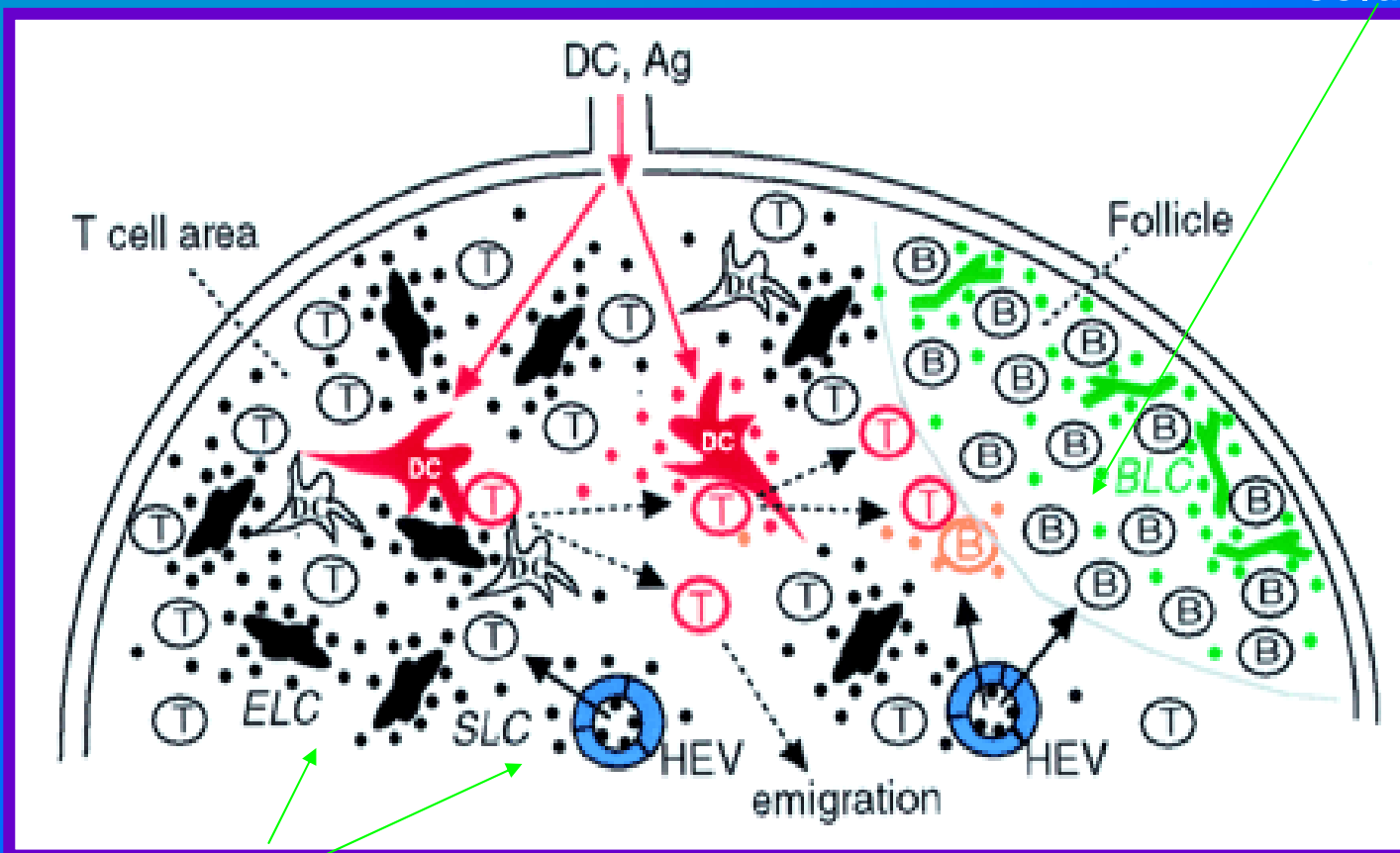


# Recirculación de linfocitos



# 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

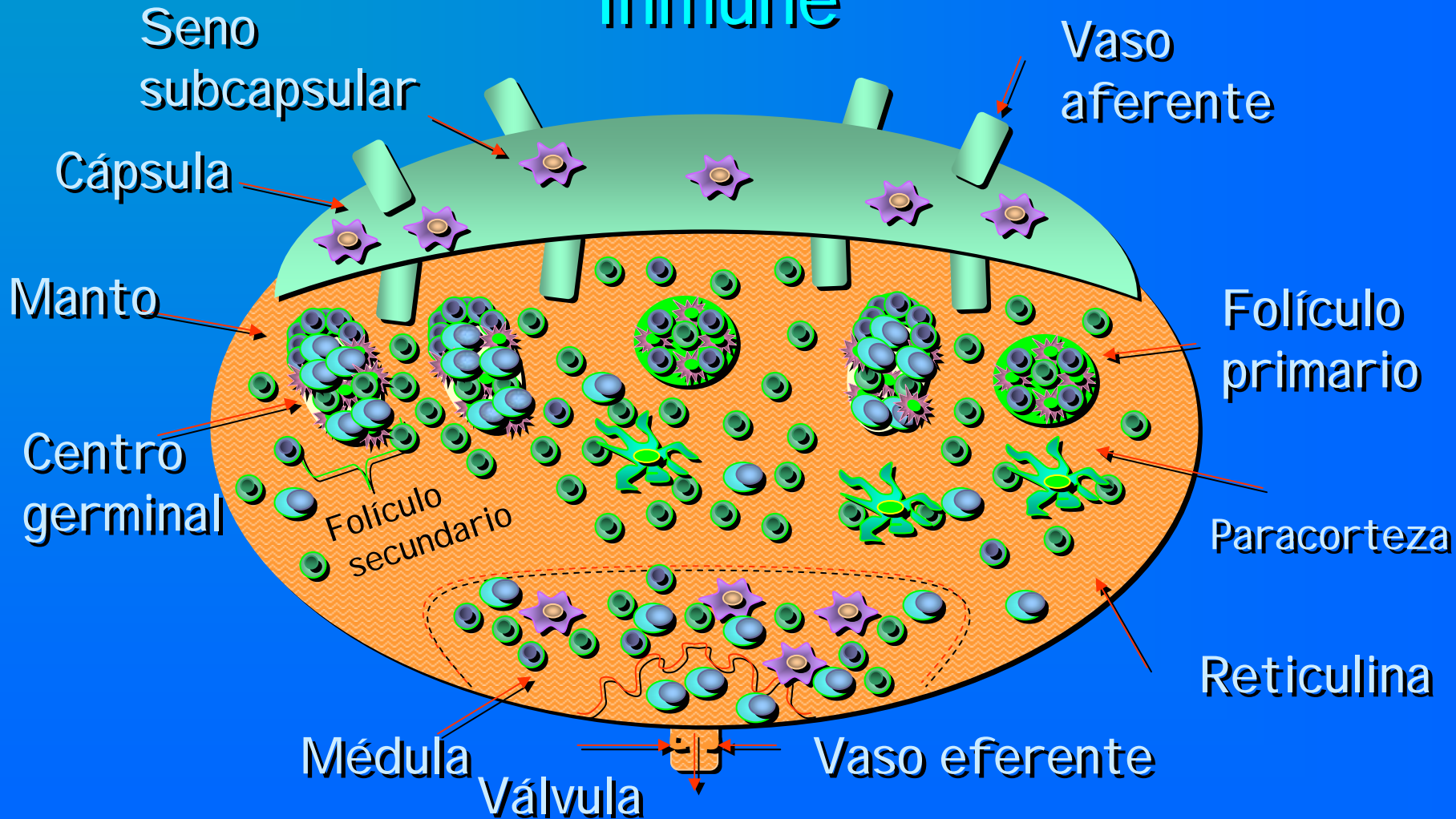
CCR7:  
Expresado sobre los linfocitos T "naive" y DC maduras

# Órganos secundarios y maduración final de los linfocitos

# Órganos secundarios

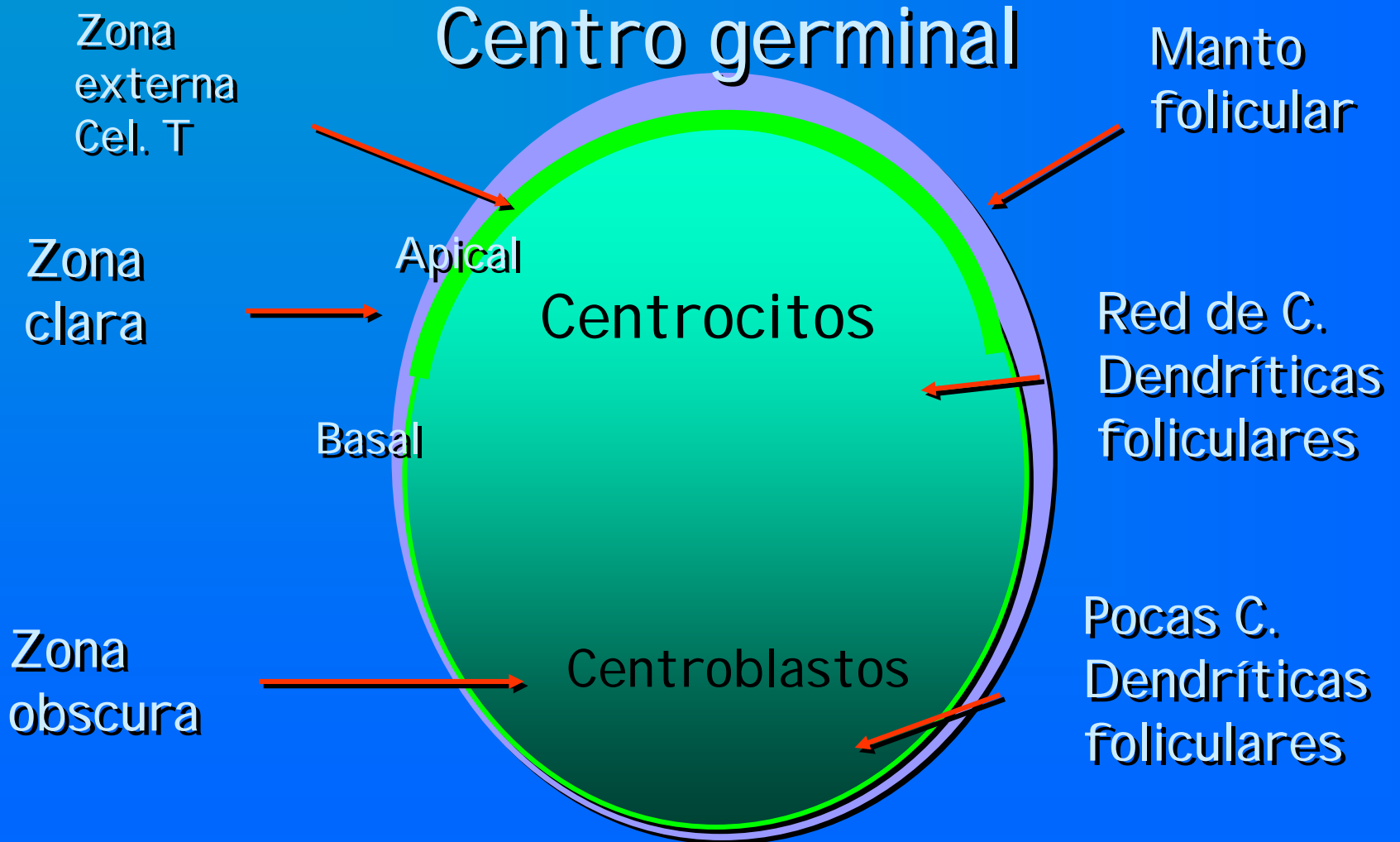
- **Función:**
  - Facilitan el trabajo de los linfocitos
  - Sitios de encuentro entre células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos
  - Proveen el microambiente adecuado para la expansión de linfocitos T
  - Optimizan la activación de linfocitos B "naive"

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



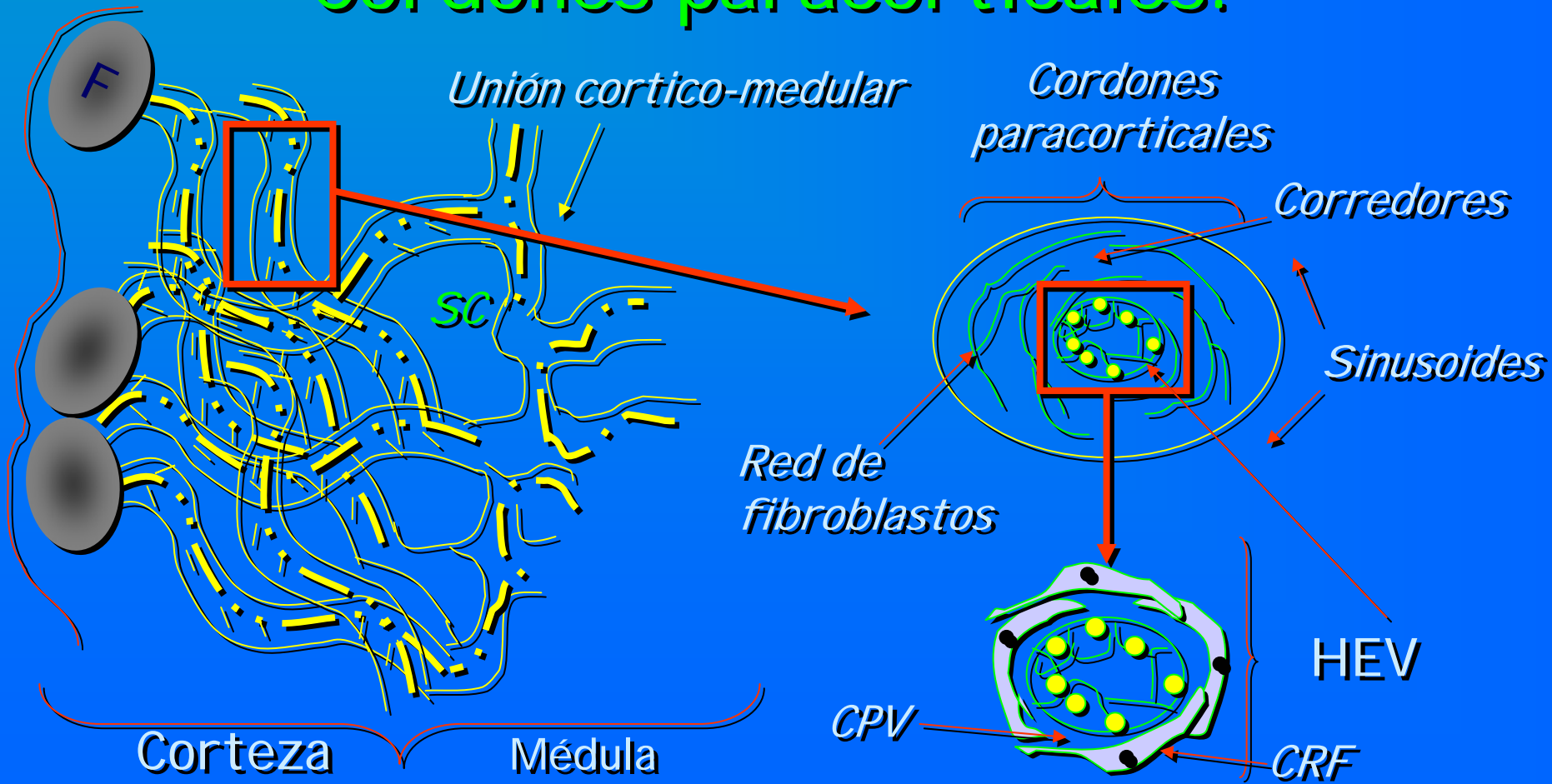


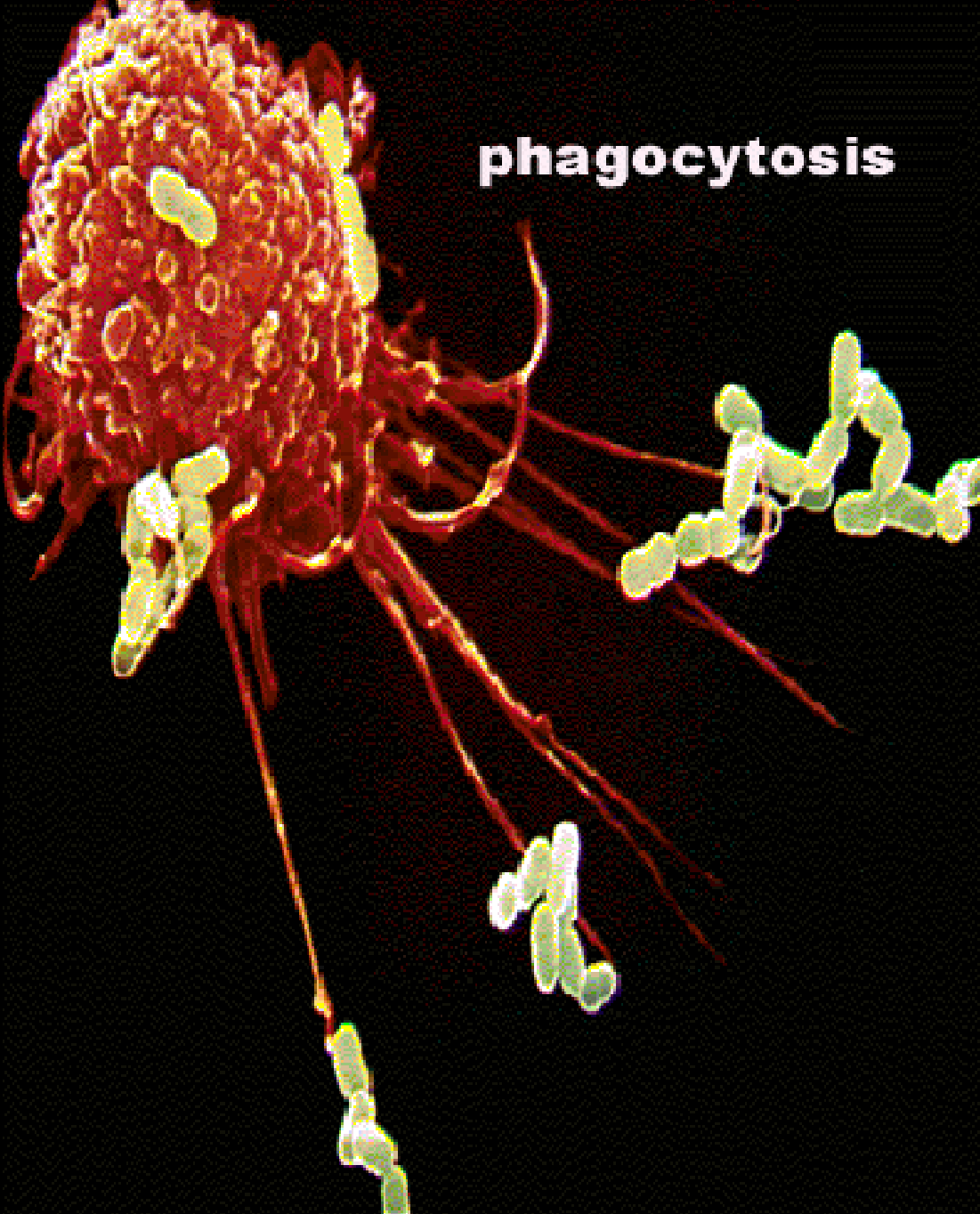
# Órganos secundarios: Folículo secundario



# Órganos secundarios: nódulos linfáticos

## Cordones paracorticales:





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?