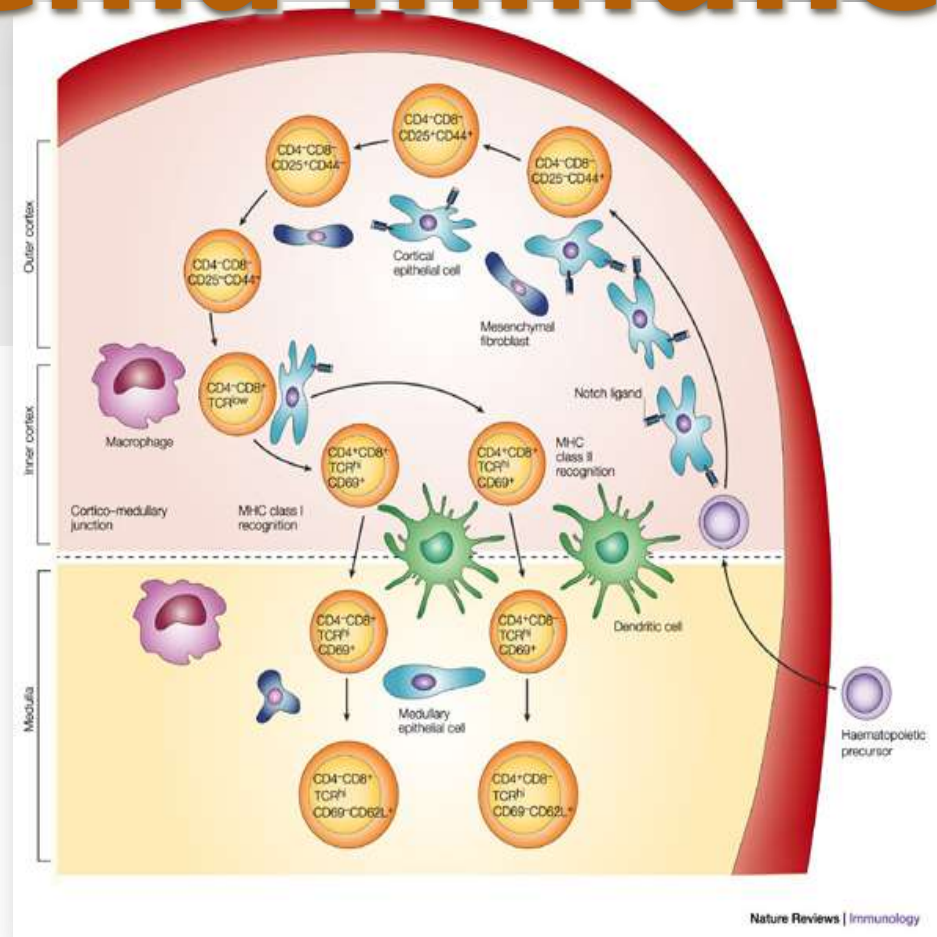
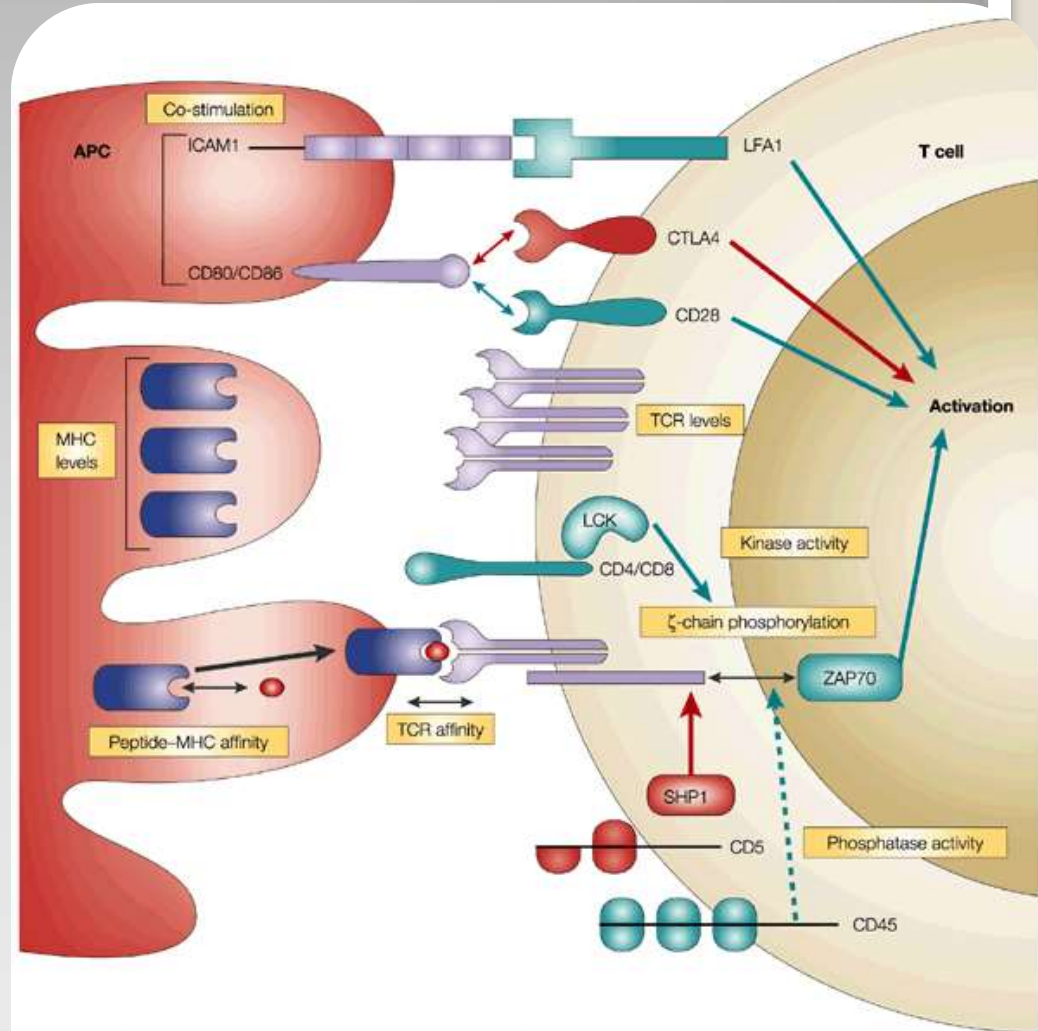


Ontogenia y órganos del sistema inmune

Siham Salmen Halabi
Instituto de Inmunología
Clínica
Curso de Post-grado 2016



- Responder frente a los agentes extraños, con alta especificidad (respetando la integridad de los tejidos propios) y preservando la tolerancia



Funciones del sistema inmune

- 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?

“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 de mecanismos complejos 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 salgan a la periferia con las herramientas básicas para enfrentarse a los Ag extraños**

Ontogenia de linfocitos

Ontogenias de linfocitos

- Elementos que participan
 - **Célula progenitora pluripotencial**
 - **Microambientes adecuados**
 - **Mediadores solubles**
 - **Interacción entre las células linfoides y elementos del microambiente**

Organos 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 B1

Inmunidad adaptativa

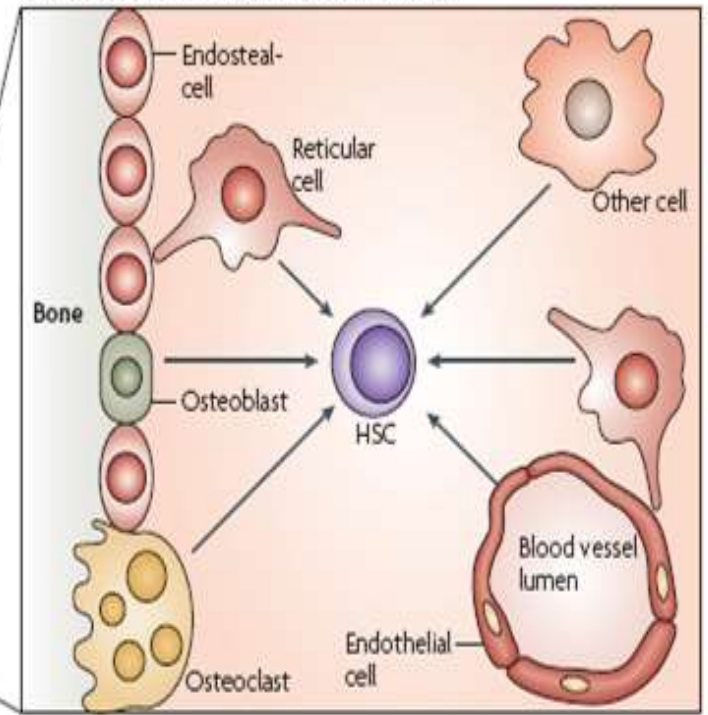
Linfocitos T (CD4, CD8, Treg, NKT) y B (B2)

Órganos primarios y ontogenia

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)

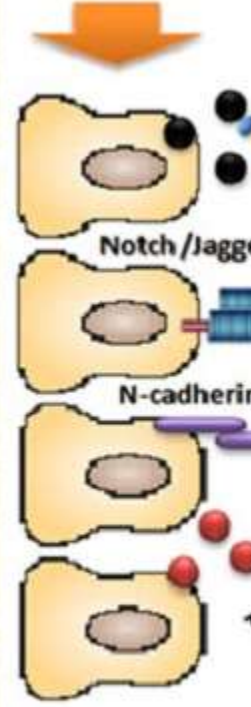
a Contribution of cells near the endosteum



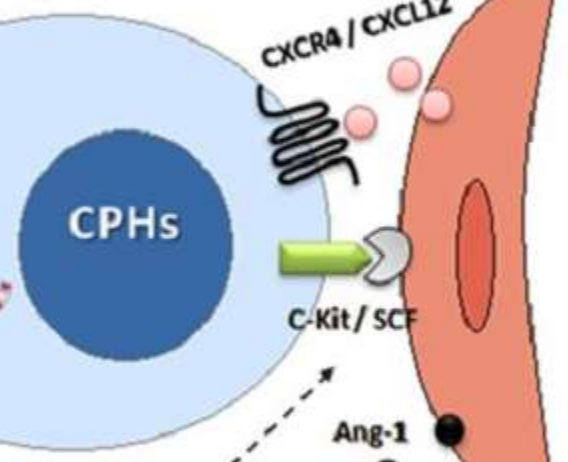
Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs



Osteoblastos



Proteína ATG7, activa la mitofagia para mantener la función y cantidad de mitocondrias a un nivel mínimo



Receptores expresados por las CPHs.
CXCR4, c-Kit, Car, Tie-2, CD44, anexina II.

Ligandos para "Homing".
Selectinas e y P, VCAM1, anexina II, CXCL12, Kit-L.

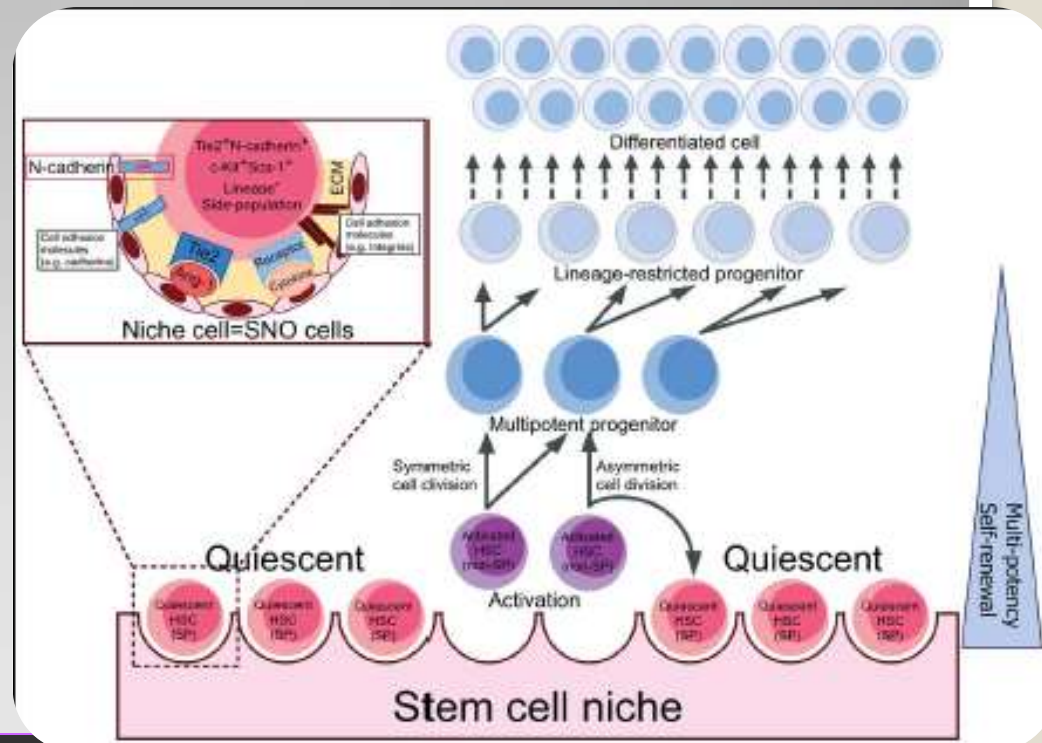
Ligandos nicho endosteal.
Jagged 1 y 2, Delta 1 y 4, N-cadherina, anexina II, Osteopontin, Kit-L, CXCL12, Ang-1, Trombopoyetina.

Sobrevida
Autorenovación
Proliferación

MSCs
Nestin+

Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

Arresto en el ciclo celular y adhesión a los osteoblastos



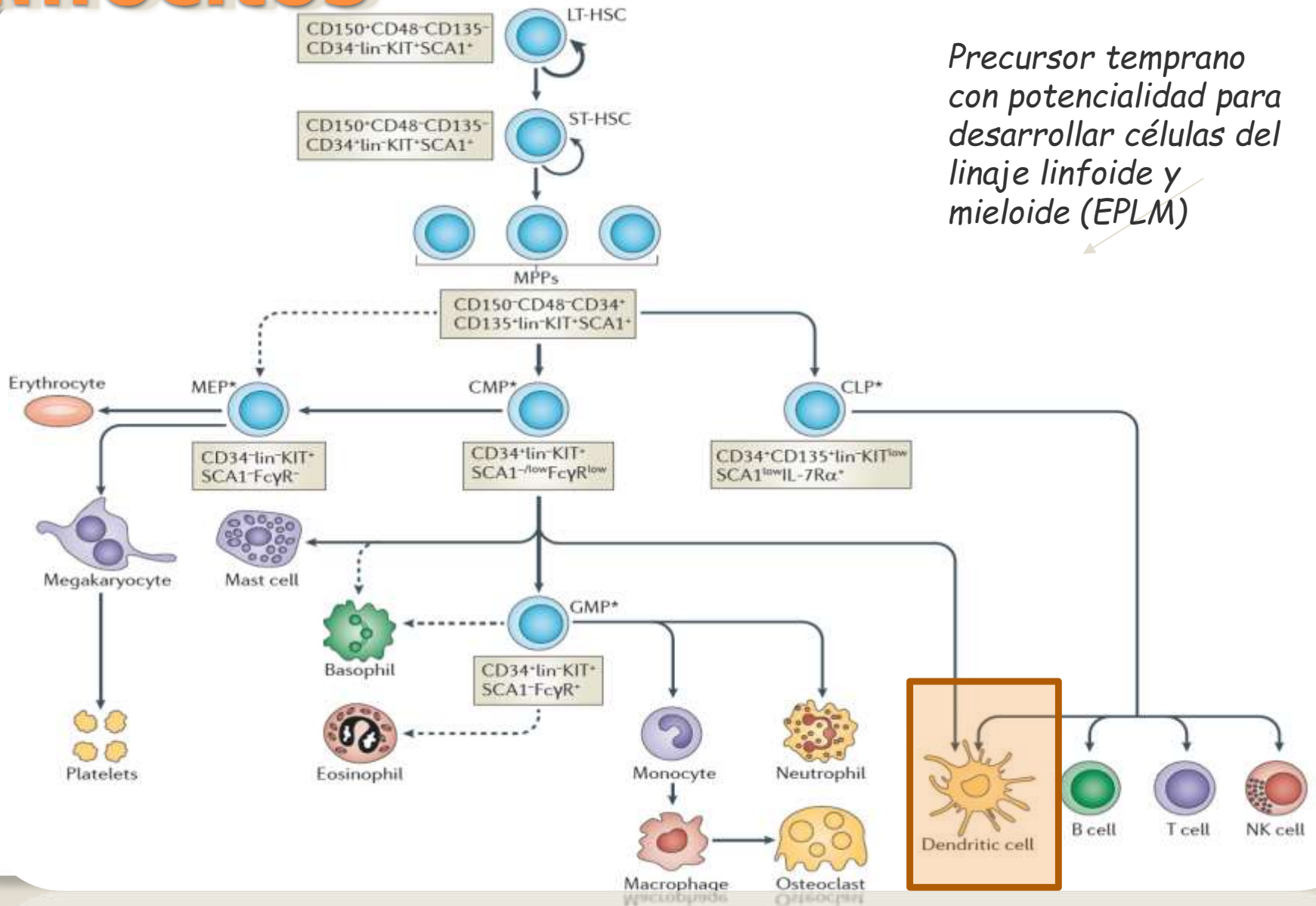
Características de las HSCs en reposo

1. *Protección contra el estrés*
 1. *Regulación de radicales libre, actividad de aldehído deshidrogenasa*
2. *Adhesión a los nichos*
 1. *Bajo requerimiento de factores de crecimiento, inhibición de la apoptosis, enlentecimiento del ciclo celular (tie, y p21) y unión por N-cadherin a osteoblastos*
3. *Hipoxia en los nichos (1-6%)*

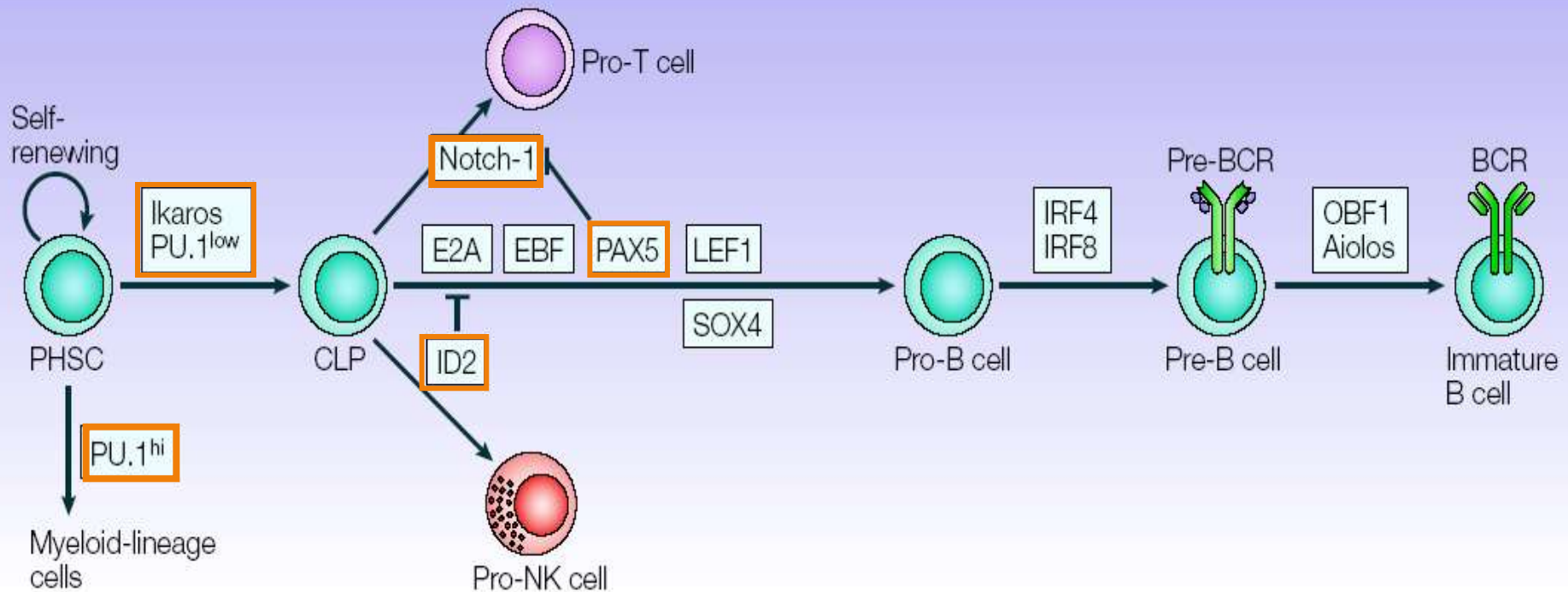


Ontogenia de linfocitos

Nat Rev CB 12, 2011: 643

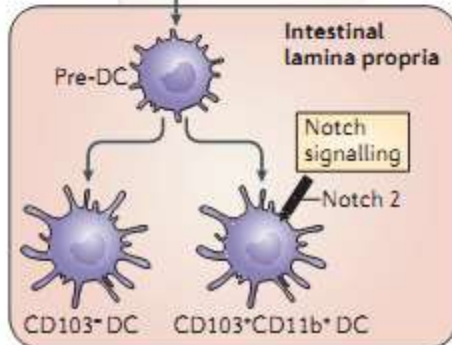
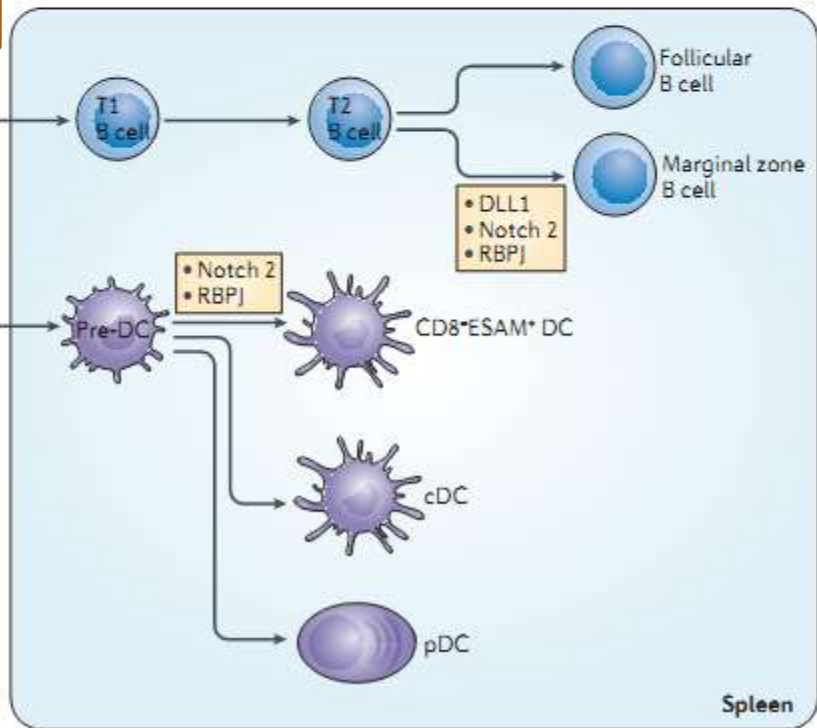
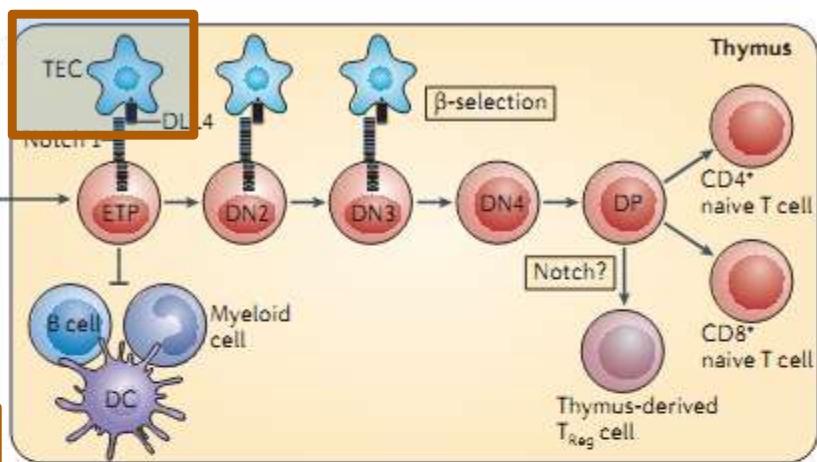
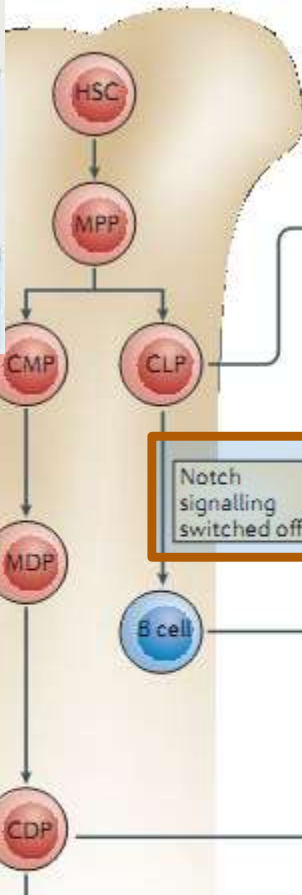
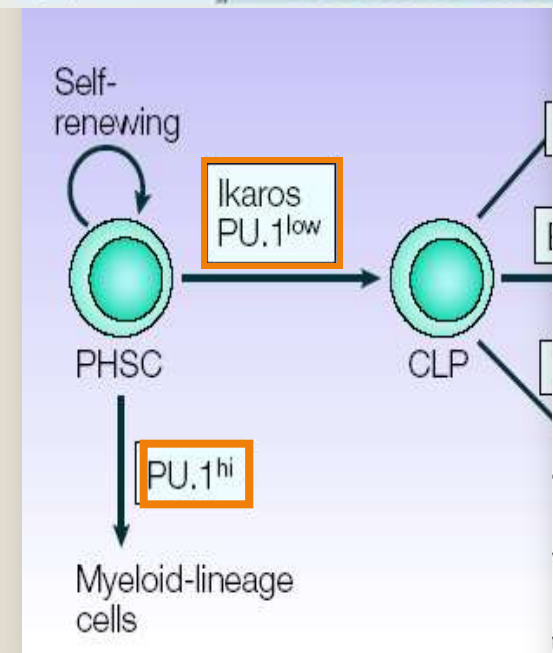
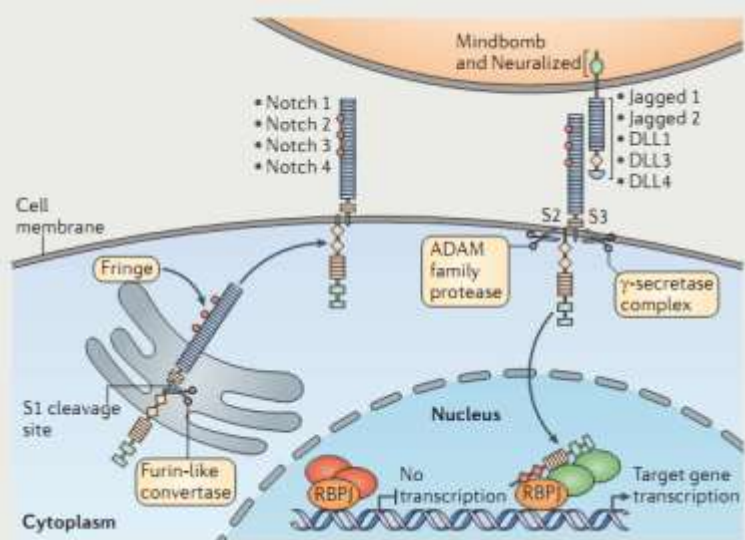


Que elementos contribuyen con la decisión: Linaje mieloide vs. linfoide o Linfocito T vs. B



Factores de transcripción involucrados en el desarrollo

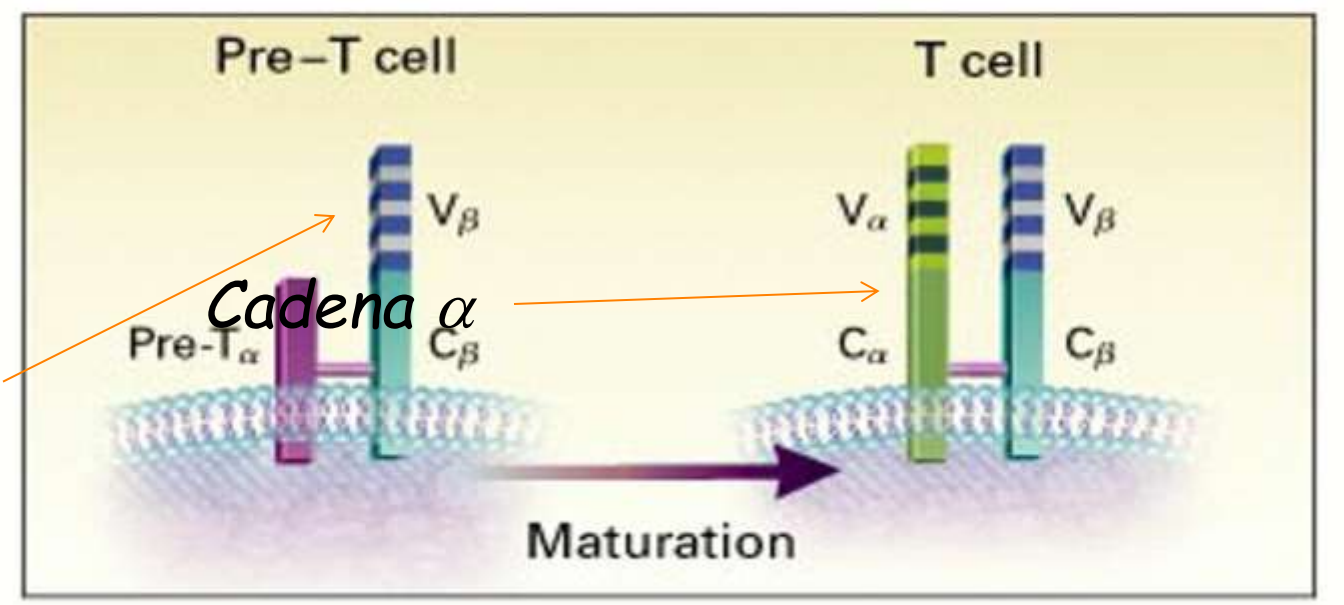
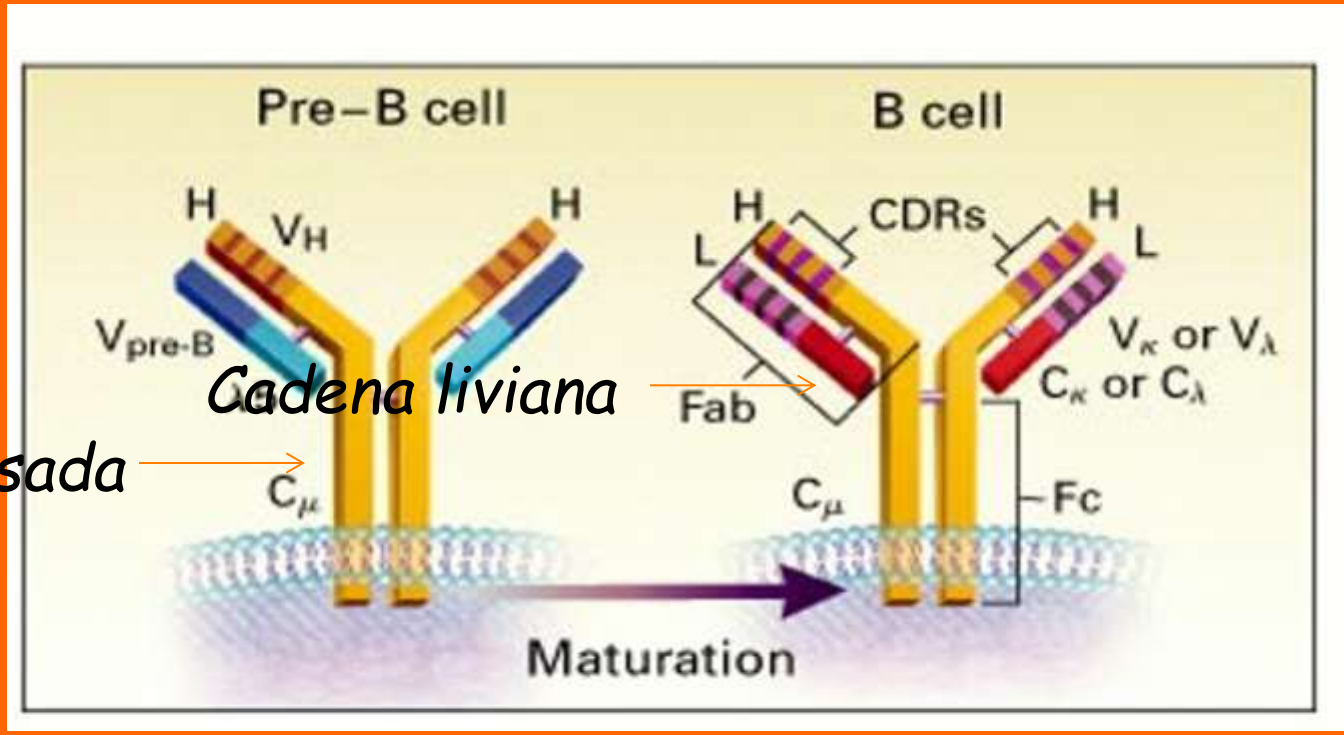
Contribuyen con la



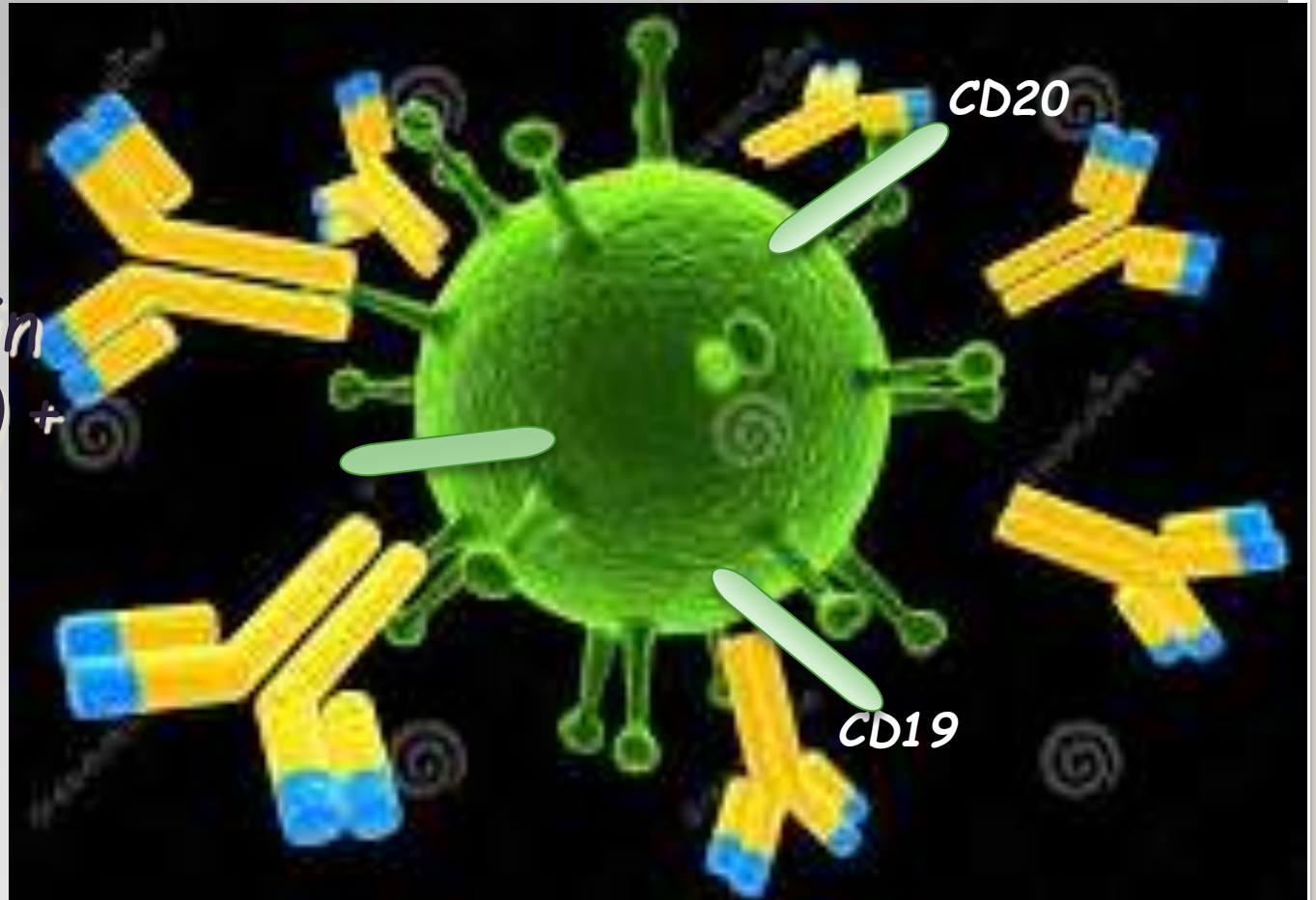
Factores de trans involucrados en el desarrollo

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

Ontogenia de los linfocitos



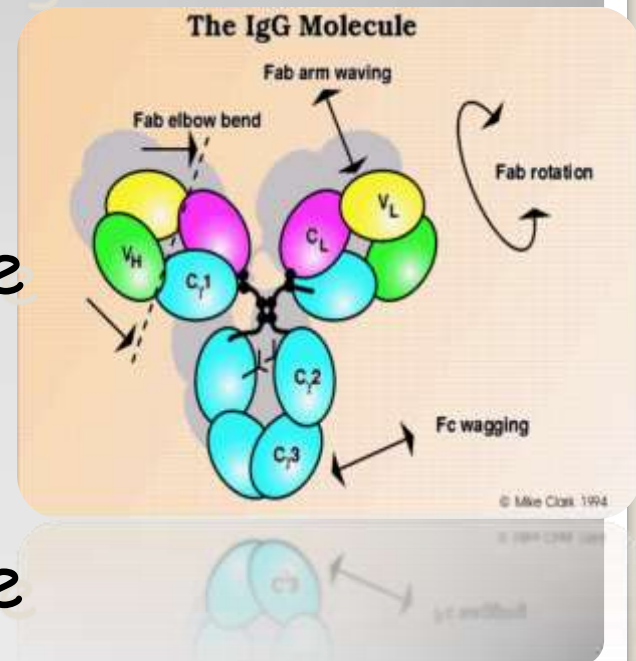
*BCR: Co-
expresión de
Inmunoglobulina
a (IgM e IgD) +
cadenas α y β
(comunicación
intracelular)*

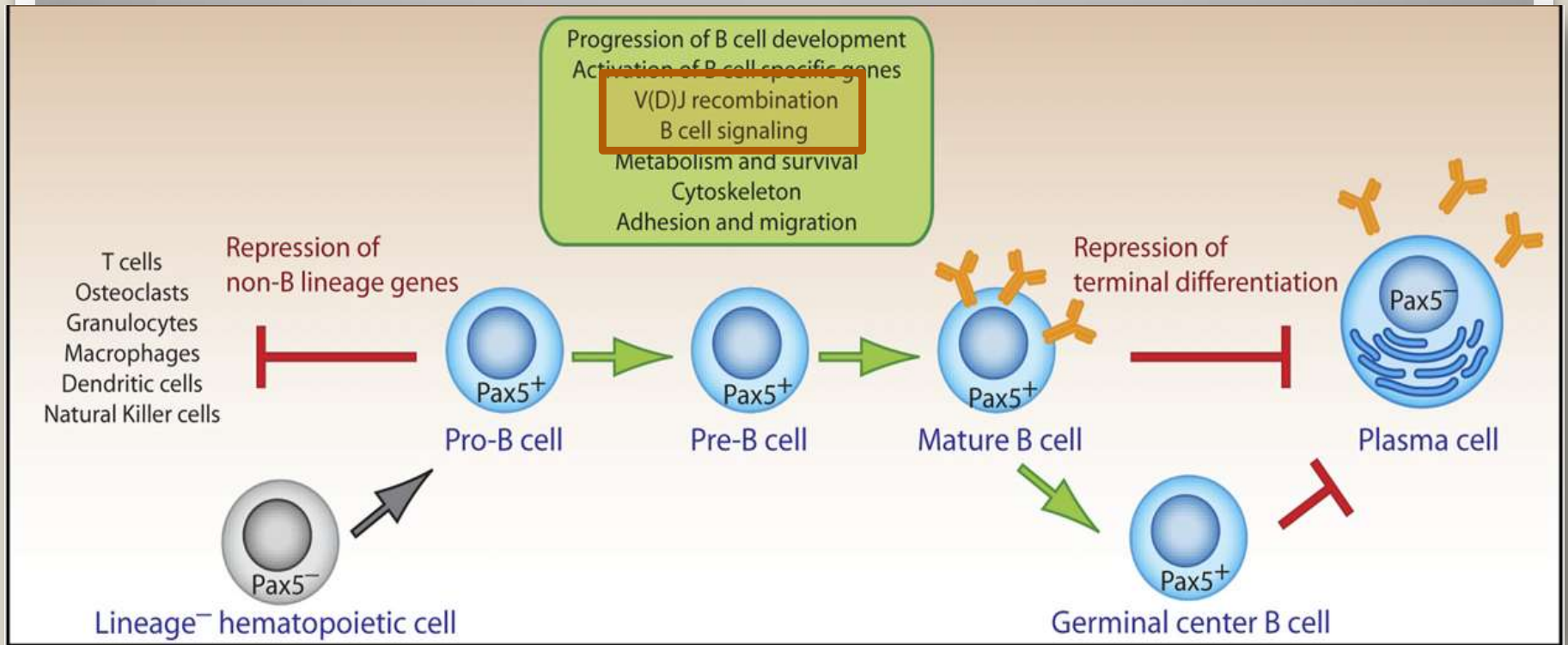


Ontogenia de los linfocitos B

Ontogenia de linfocitos B

- Su desarrollo se inicia en el hígado fetal 8-9 semanas 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



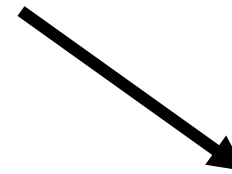
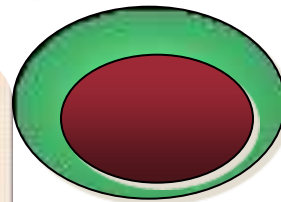
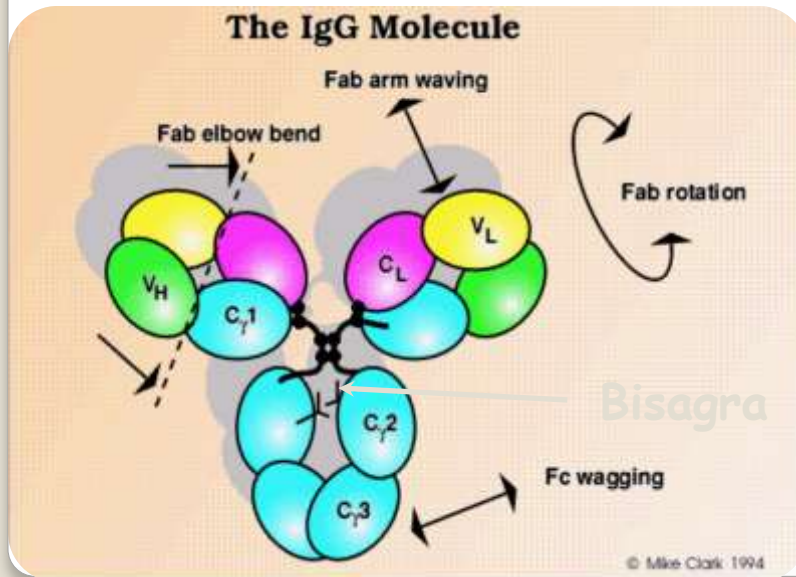


Ontogenia de linfocitos B

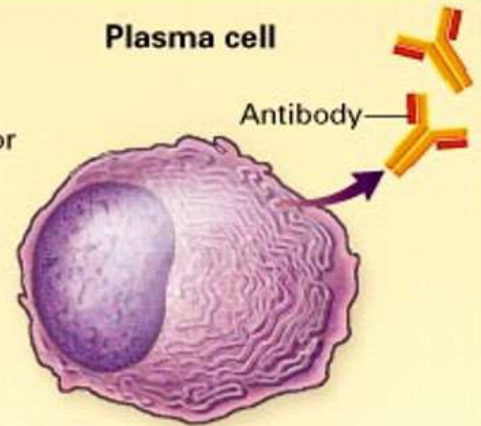
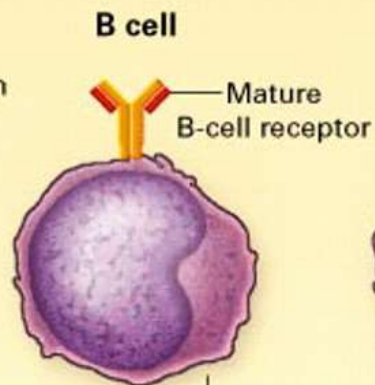
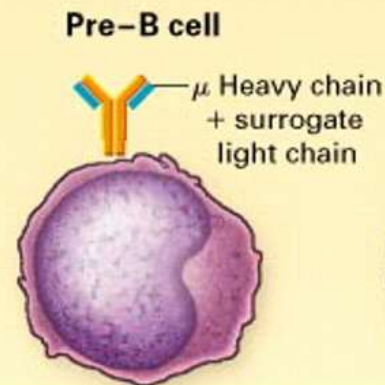
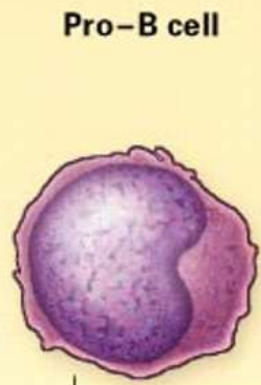
Ontogenia de Linfocitos B

Estadío I (pro-B):

Reordenamiento genético de las cadenas pesadas las inmunoglobulinas $Ig\mu$

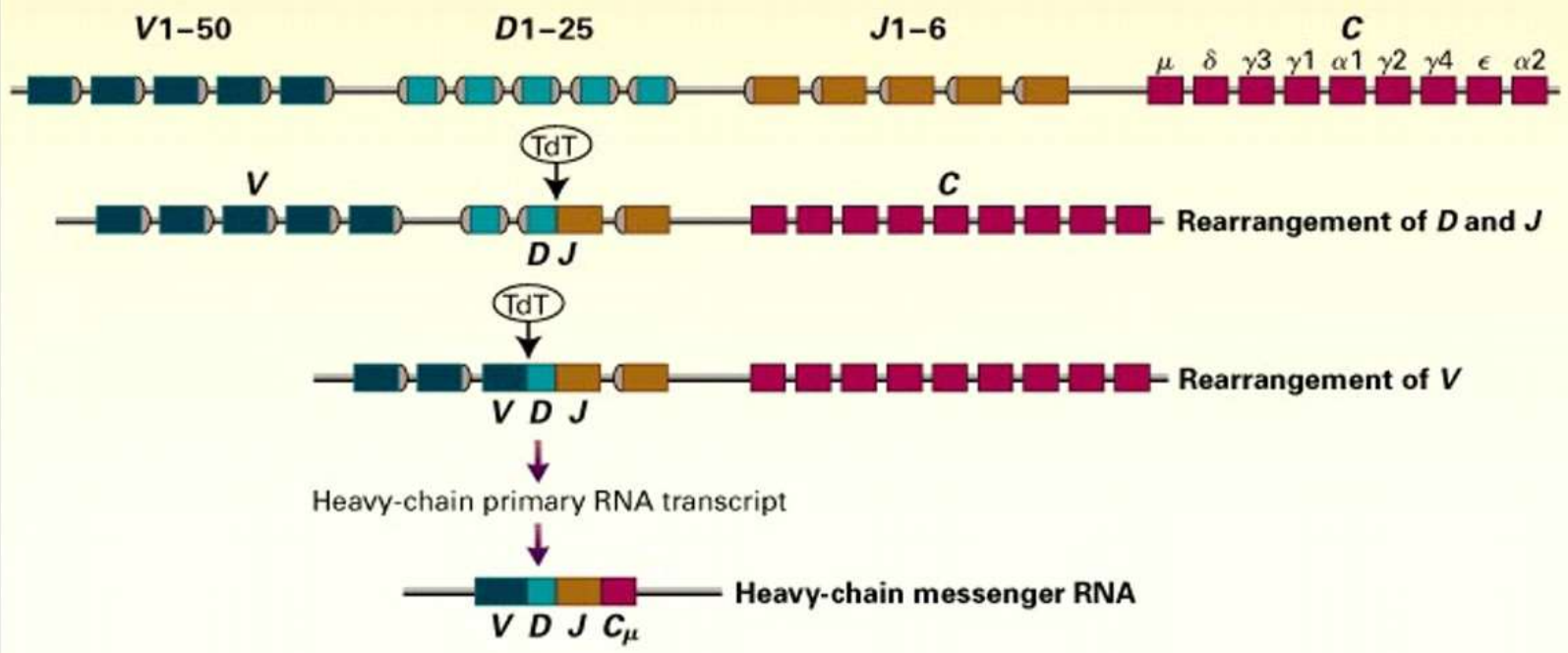


IL-7r
IL-3r



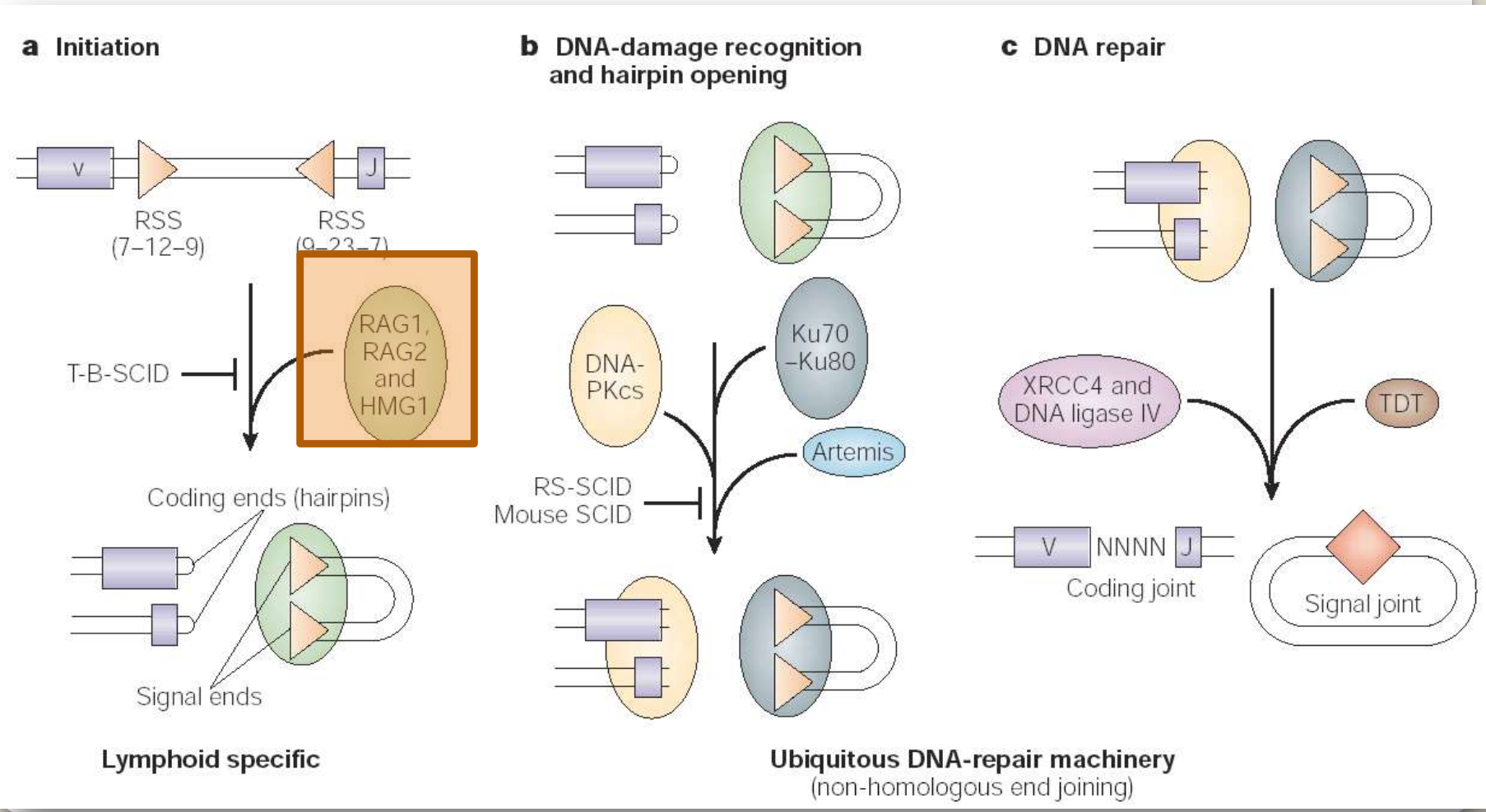
Expression of *RAG1* and *RAG2*

Immunoglobulin gene rearrangement



Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

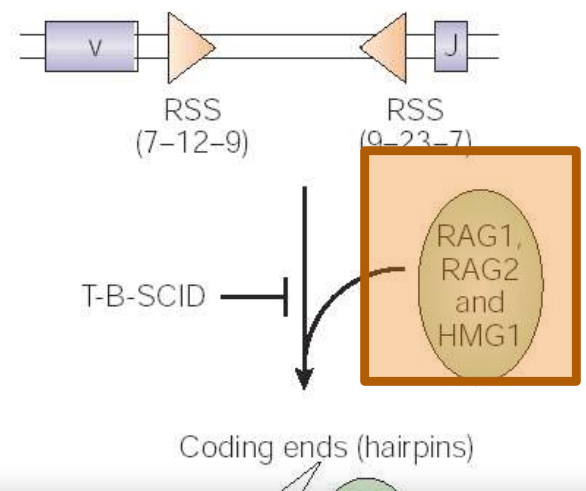
TdT añade nucleótidos a la unión V-D y D-J favoreciendo aun mas la diversidad (incrementa la diversidad de CDR3) o pérdida de nucleótidos



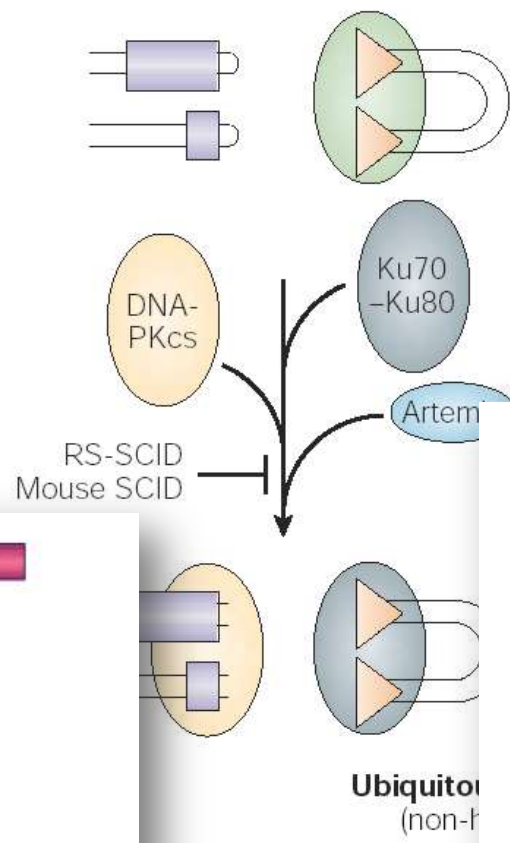
TdT añade nucleótidos a la unión V-D y D-J favoreciendo aun mas la diversidad (incrementa la diversidad de CDR3) o pérdida de nucleótidos

Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

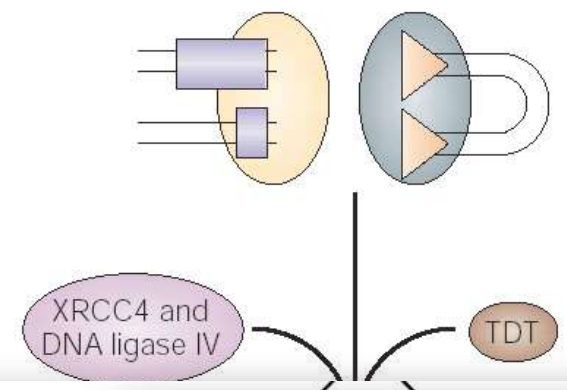
a Initiation



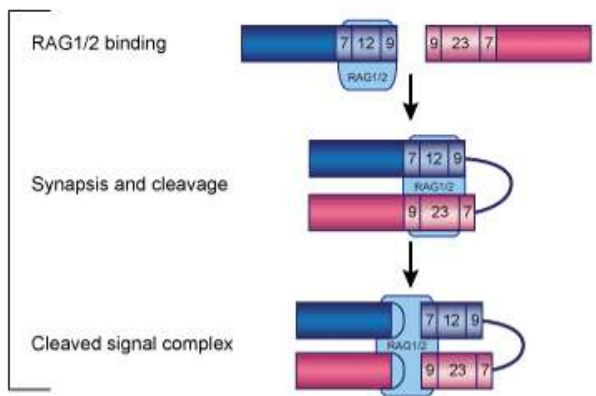
b DNA-damage recognition and hairpin opening



c DNA repair



Phase 1



Phase 2

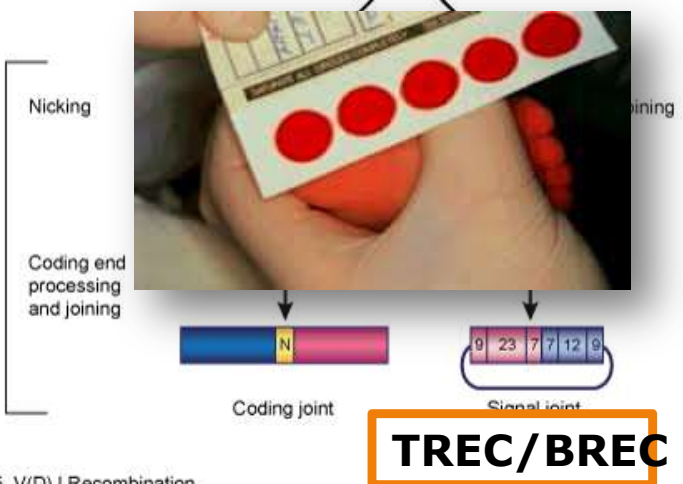
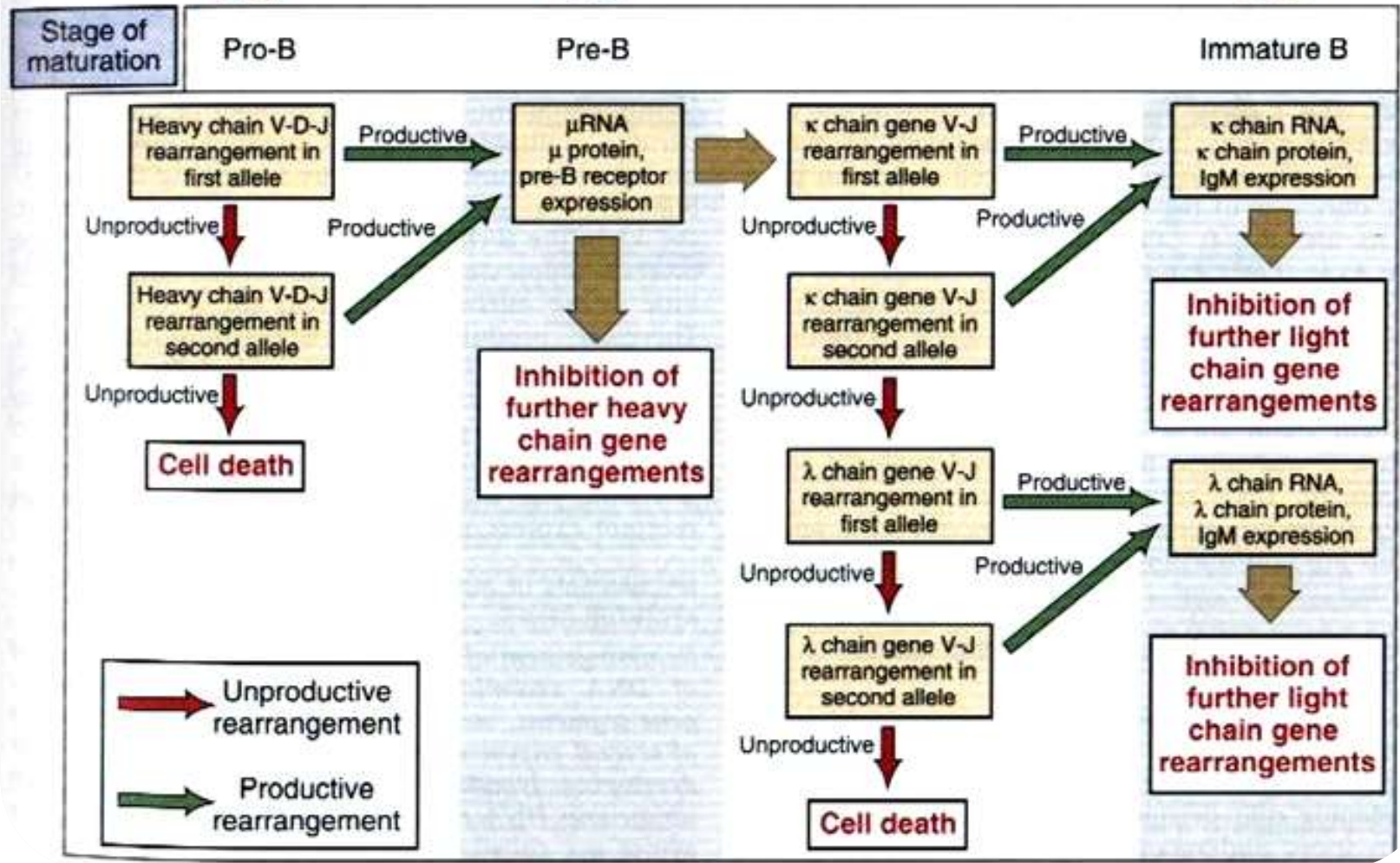


Figure 5. V(D)J Recombination. The two DNA coding segments to be joined are shown as dark blue and pink rectangles.

Ontogenia de Linfocitos B

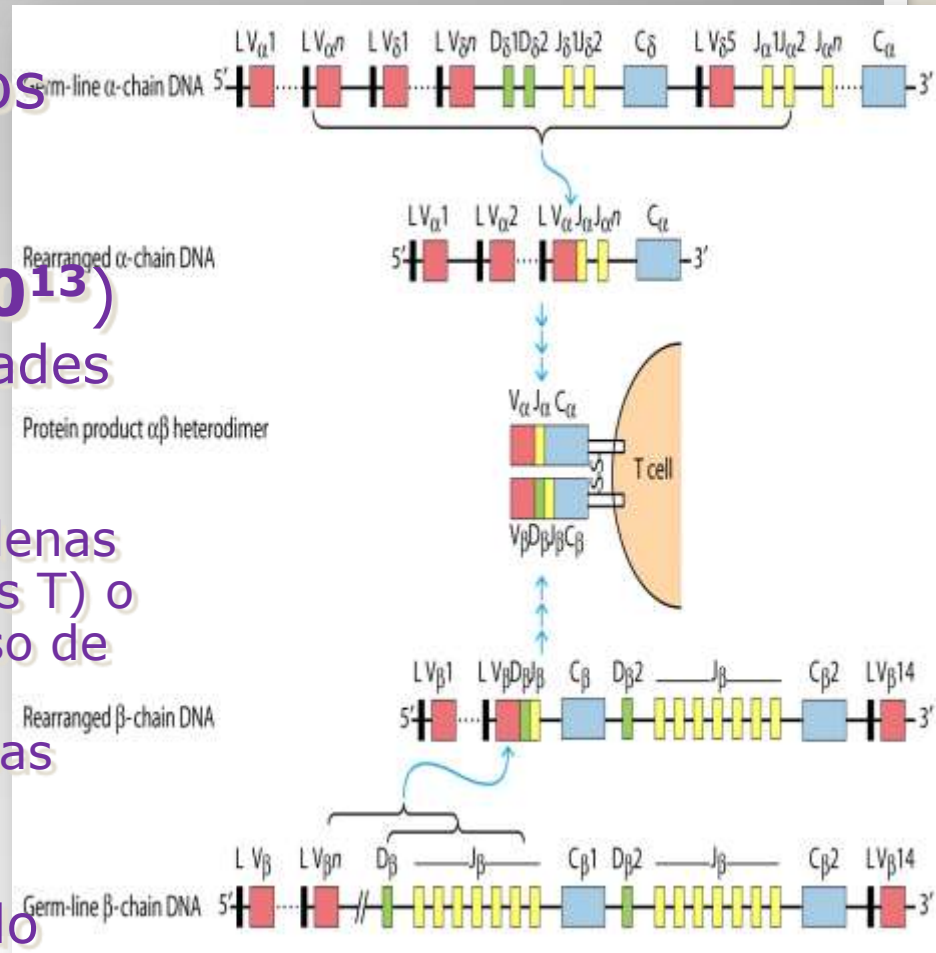


Eclusion alelica e isotipica

Ontogenia de linfocitos

Resumen

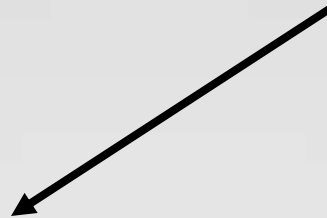
- Mecanismos involucrados en la generación de la diversidad (aproximadamente 10^{13})
 - Diversidad en las posibilidades de combinación
 - Familias de genes V, D y J
 - Combinaciones entre las cadenas β y α (en el caso de linfocitos T) o pesadas y livianas (en el caso de linfocitos B)
 - Mediado por las Recombinasas (Rag1 y Rag2)
 - Diversidad en los sitios de unión de los genes mediado por la enzima deoxirribonucleotil transferasa terminal o TdT



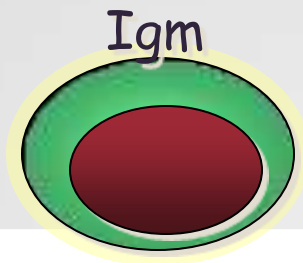
Ontogenia de Linfocitos B

Estadío II (pre-B):

Reordenamiento genético de las cadenas livianas Ig



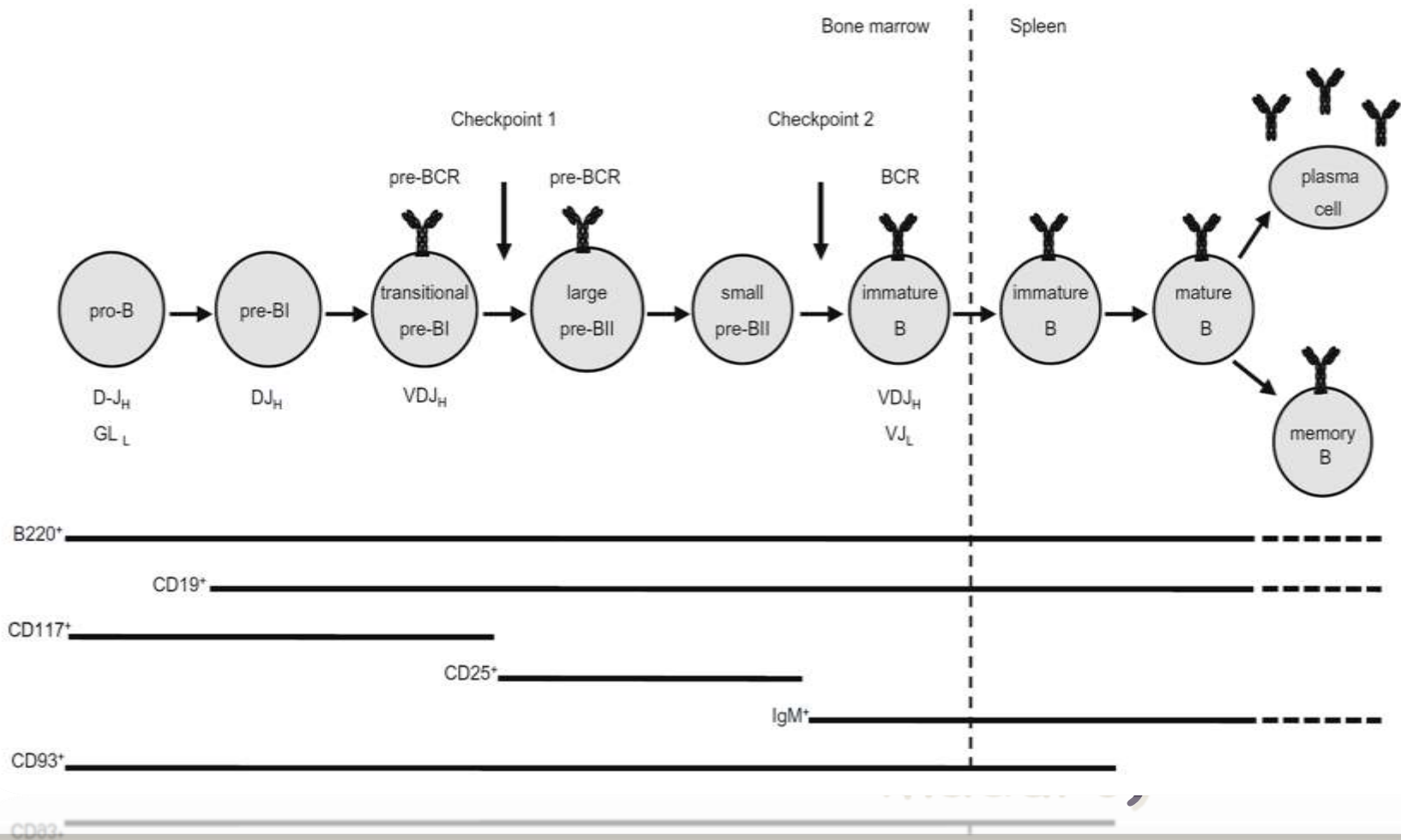
Estadío III
(linfocito B
inmaduro):



Estadío IV
(linfocito B
maduro):

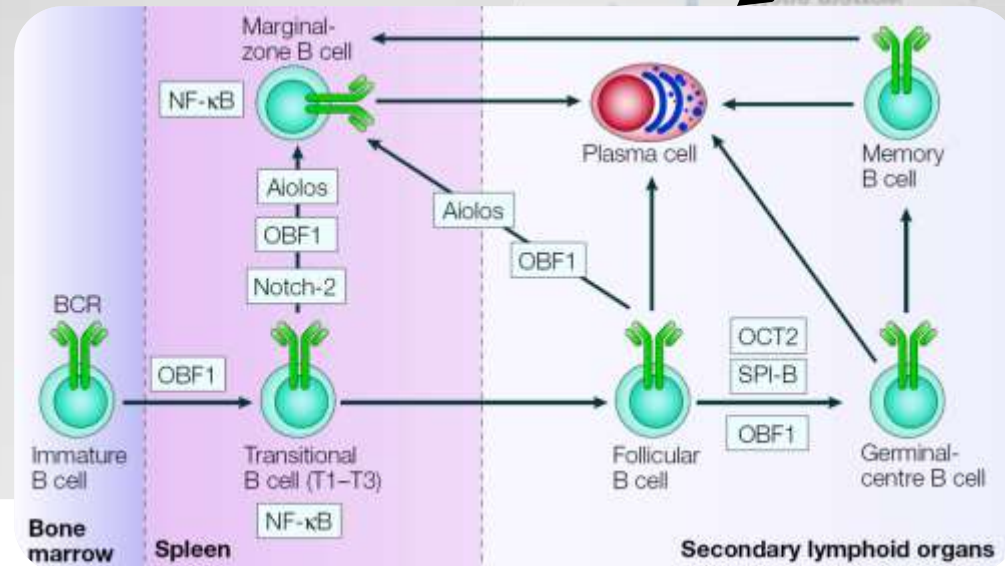
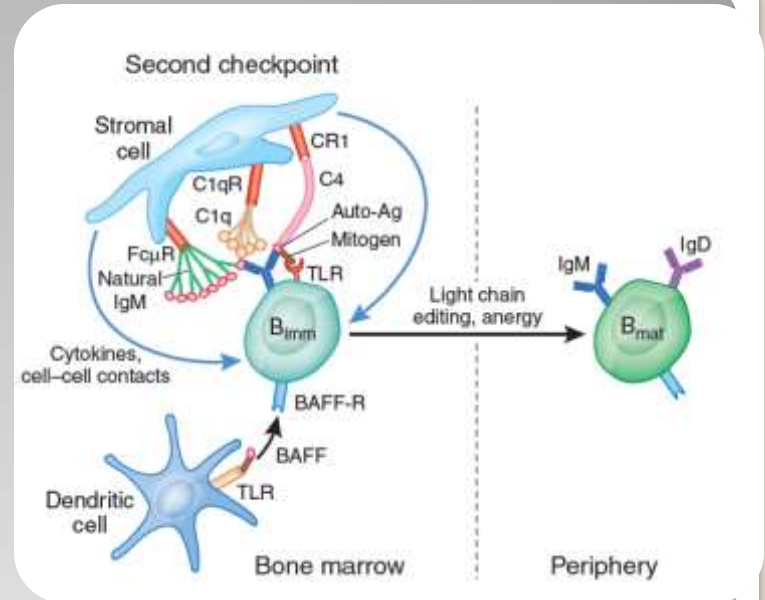


Ontogenia de Linfocitos B

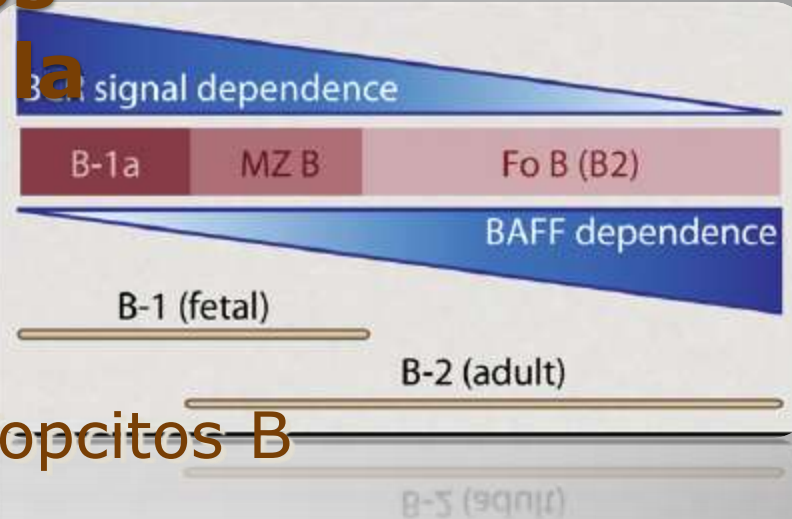


Ontogenia: LINFOCITO B

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



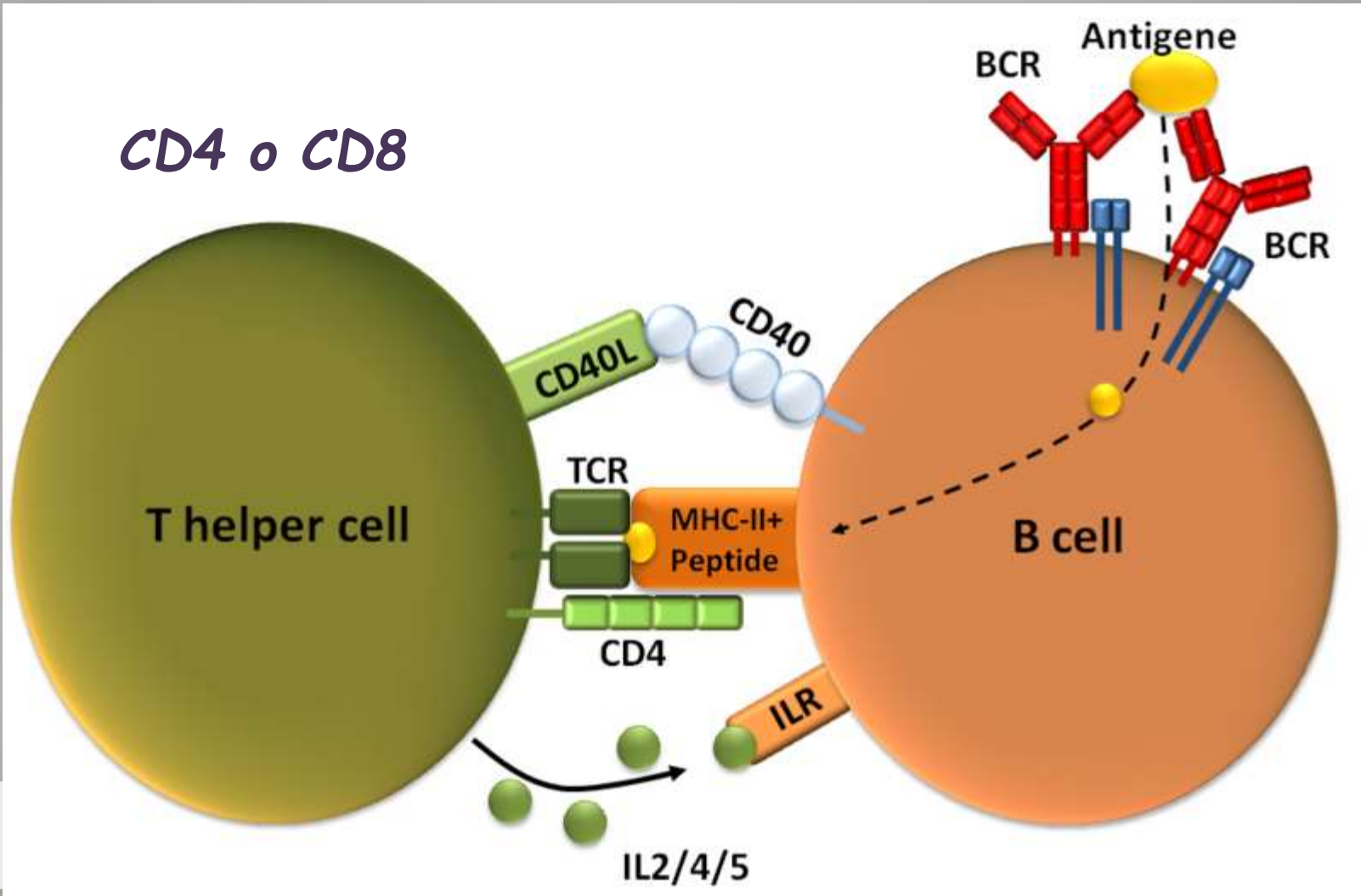
Ontogenia de linfocitos B: Subpoblaciones en la periferia

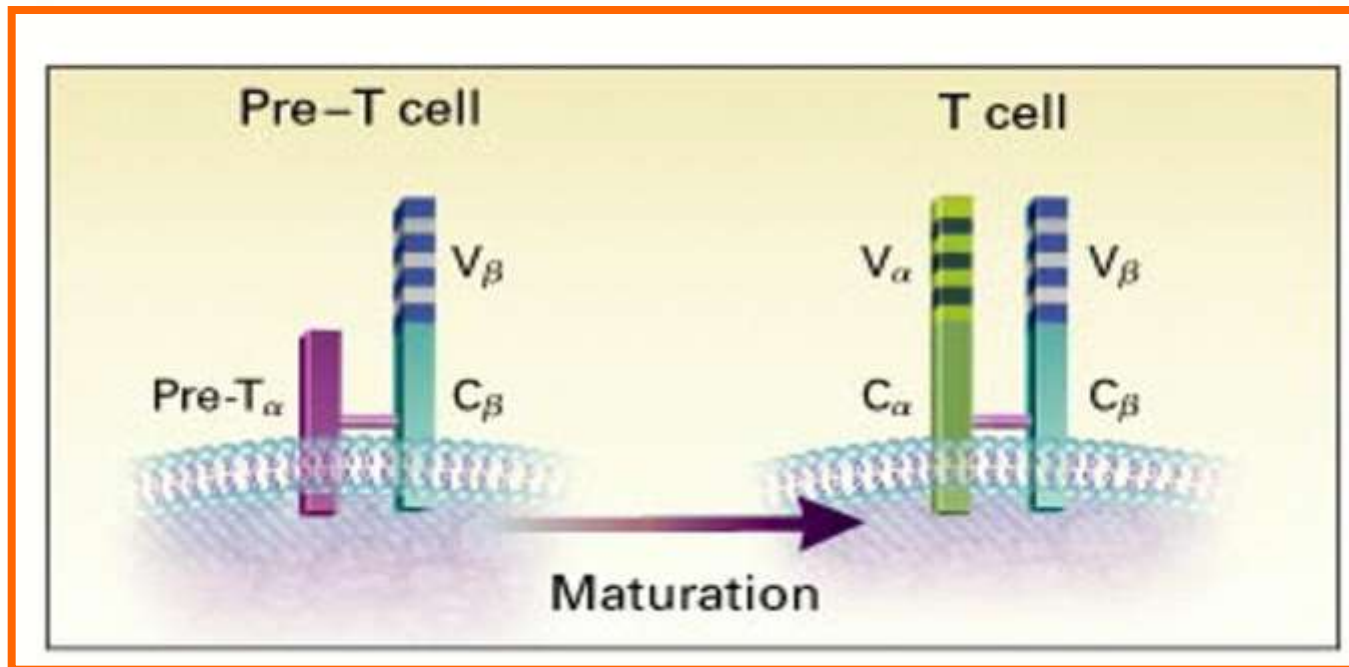
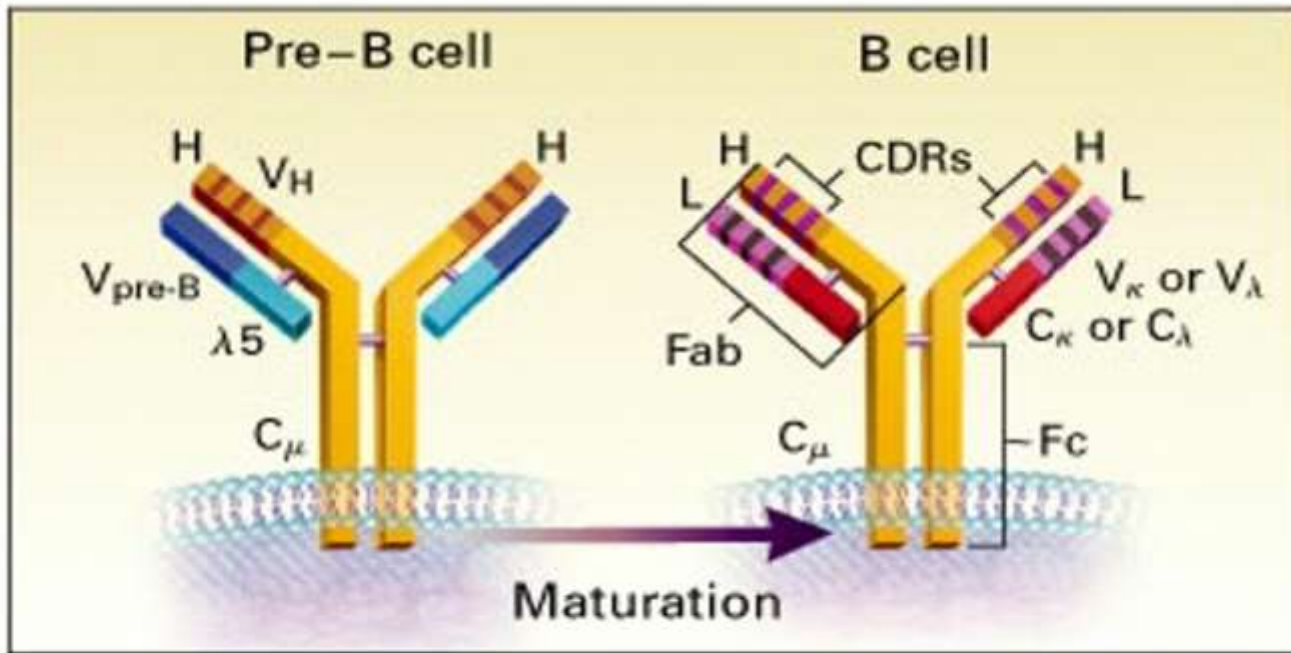


- ▶ Subpoblaciones de linfocitos B
- ▶ B-1:
 - CD5+
 - Ubicadas preferencialmente en cavidad peritoneal
 - Potencialmente autorreactivas
 - No son eliminadas por antígenos propios
 - Producción de anticuerpos naturales, producción de IgM contra streptococos
- ▶ B-2
 - Predominan en la periferia
 - CD5-

Ontogenia de los linfocitos T

TCR: cadenas α y β (γ y δ) asociados con CD3 (γ, δ, ϵ) y otras dos moléculas que permiten la comunicación intracelular





- 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

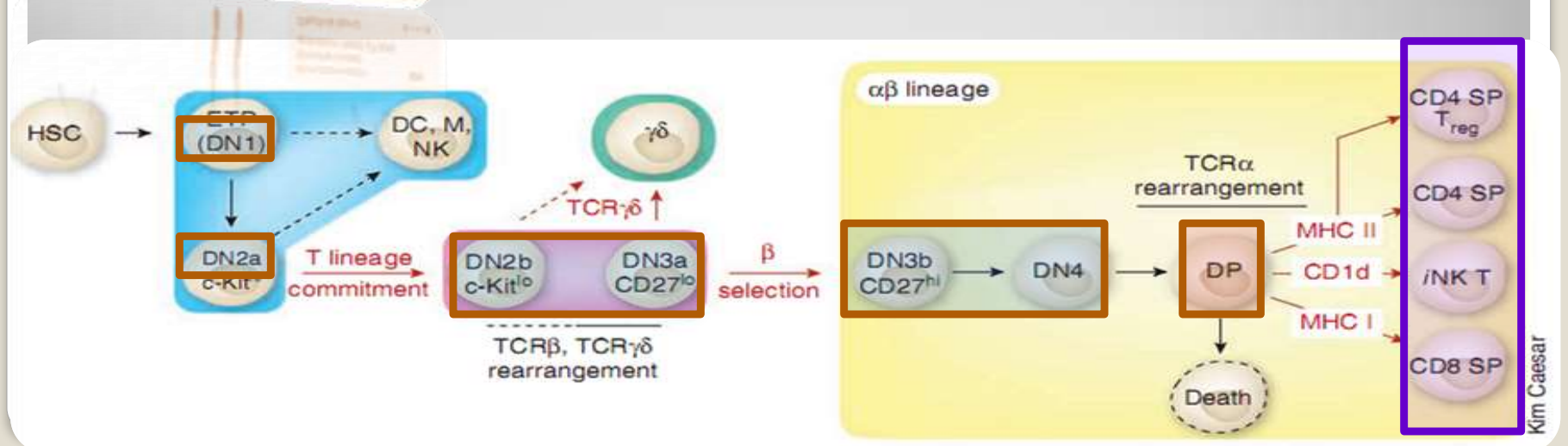
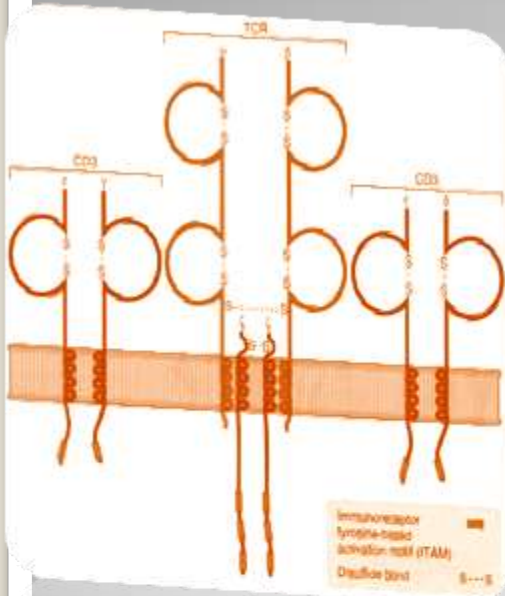
Ontogenia de linfocitos T

Ontogenia de linfocitos T

- Se desarrollan en el timo
- Están sujetos a mecanismos de selección positiva y negativa
- El repertorio de células se genera por recombinaciones de segmentos de genes del TCR

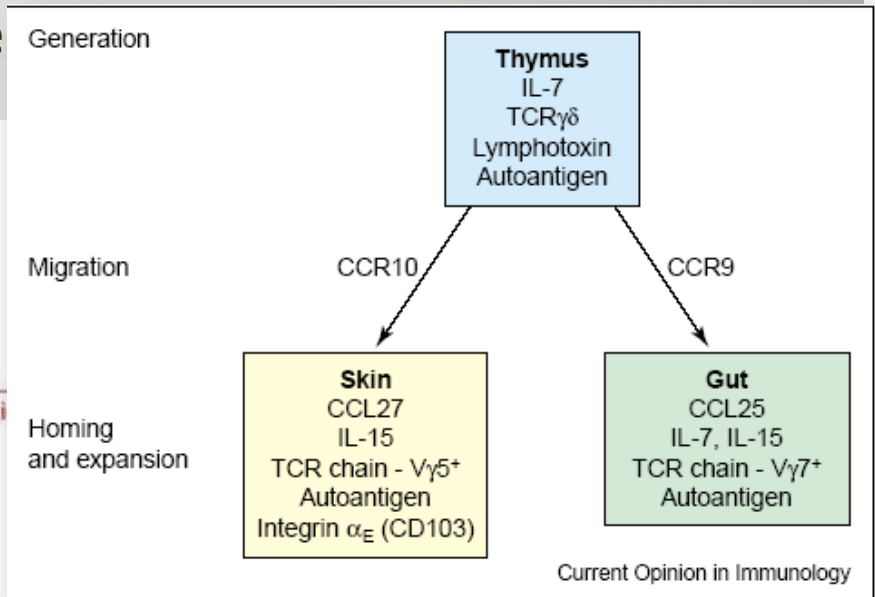
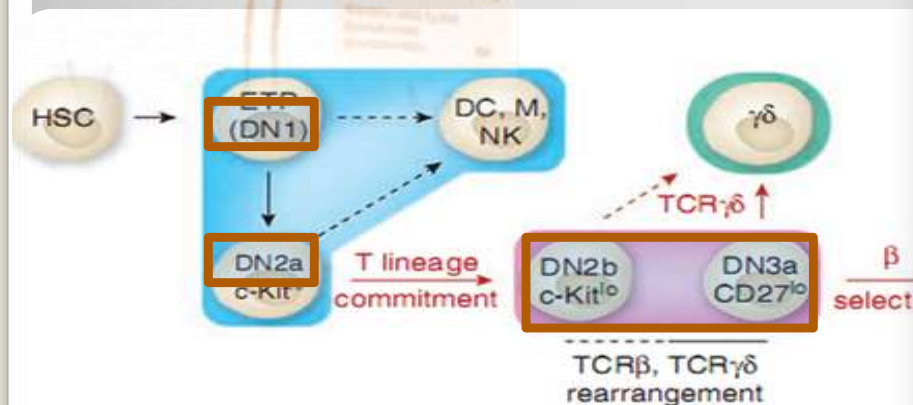
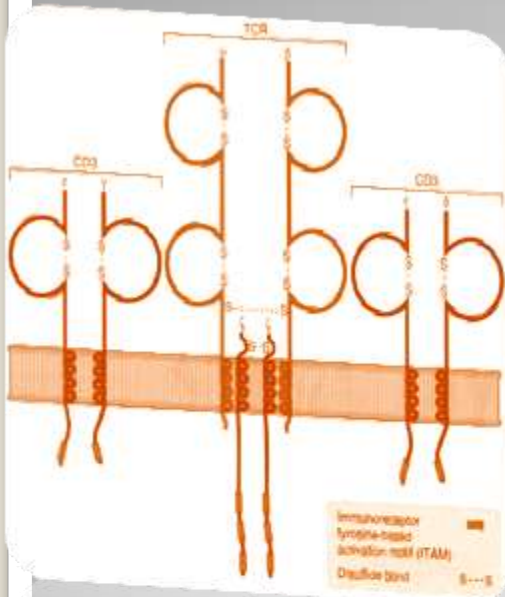
Ontogenia de linfocitos T

- 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 β , α
 - Selección positiva y negativa
 - Escoger entre CD4, CD8, NKT o Treg



Ontogenia de linfocitos T

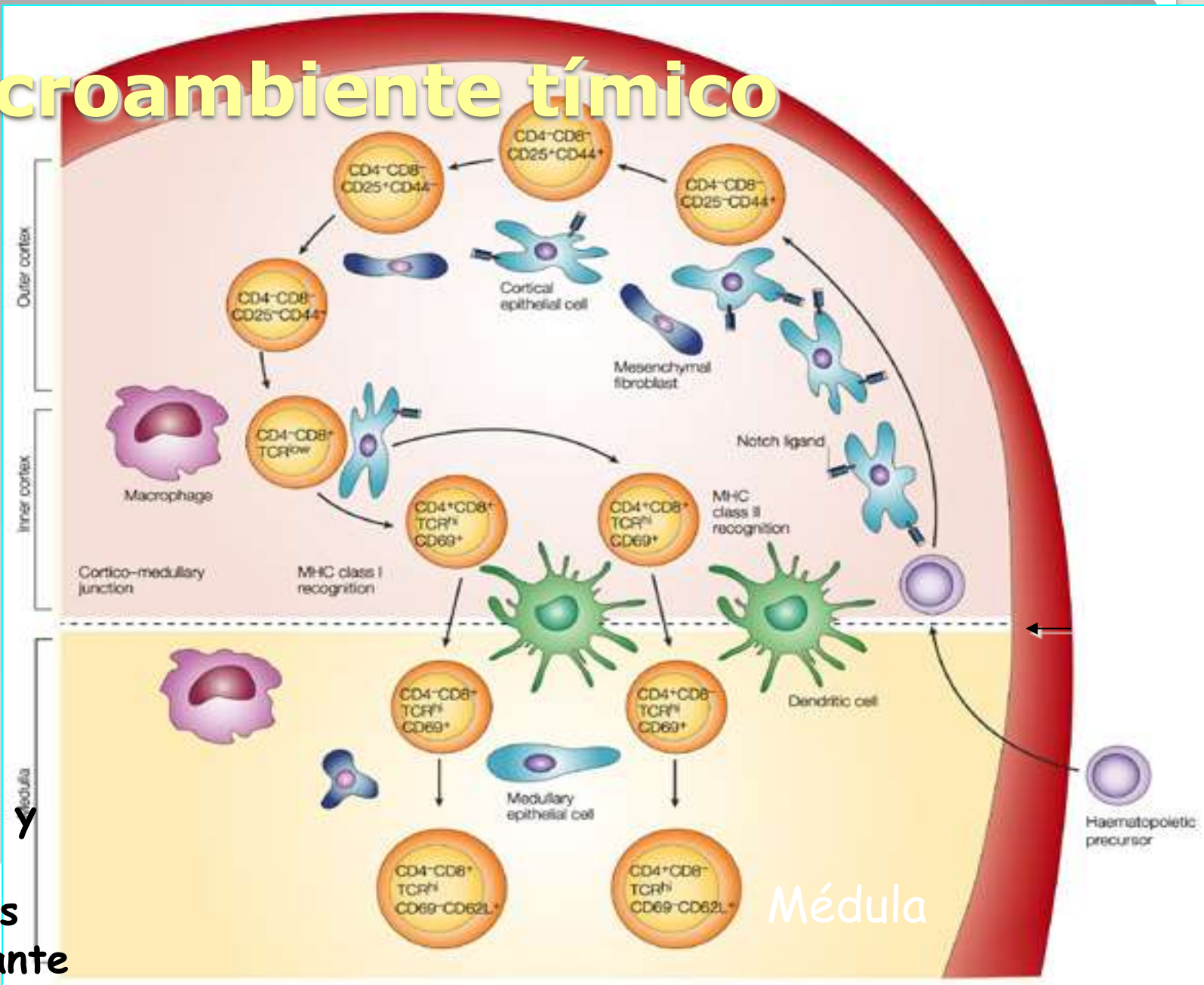
- Durante la ontogenia de linfocitos T se toman las siguientes decisiones:
 - Comisionar hacia el linaje linfoide y decidir hacia linfocito T o B
 - Reordenamiento del TCR
 - Escoger entre $TCR\gamma\delta$ o $TCR\alpha\beta$
 - Selección de la cadena β , α
 - Selección positiva y negativa
 - Escoger



Microambiente tímico

Células
epiteliales
corticales

Células
epiteliales
medulares y
células
dendríticas
interdigitante



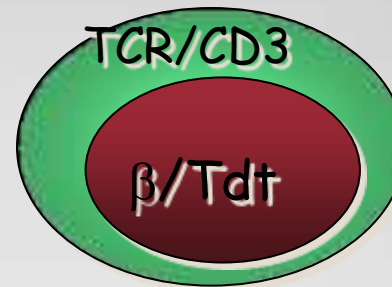
Médula

Ontogenia de Linfocitos T

Estadío I (timocito temprano):

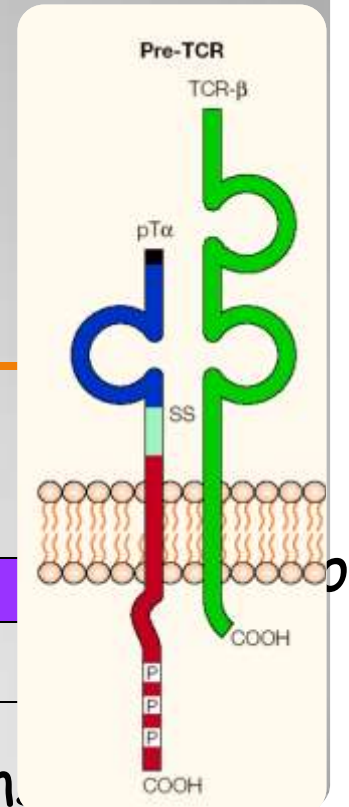
Reordenamiento de la Cadena β del TCR
(receptor del linfocito T)
Doble negativos (DN)

Pro-T a pre-T



Región variable, diversidad y unión

Región con

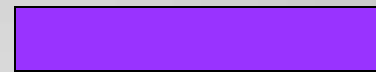


Ontogenia de Linfocitos T

Reordenamiento de la Cadena α del TCR
(receptor del linfocito T) Doble negativos (DN)

1 2 3 4 5 6 n

1 2 3 4 n

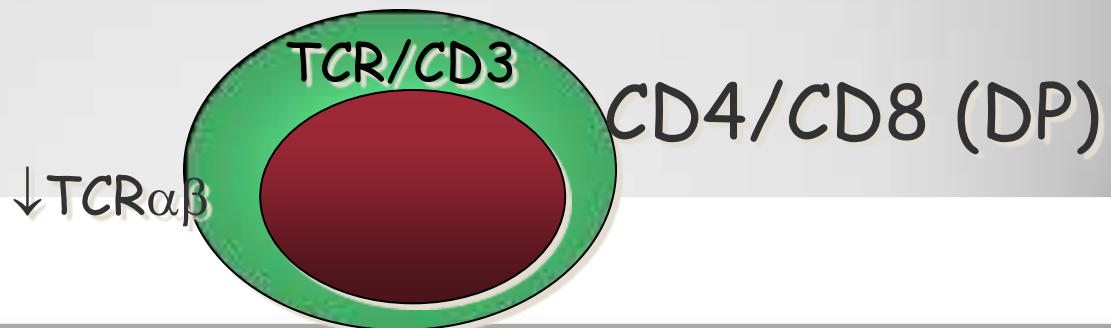


1er alelo

Región variable, diversidad
y unión

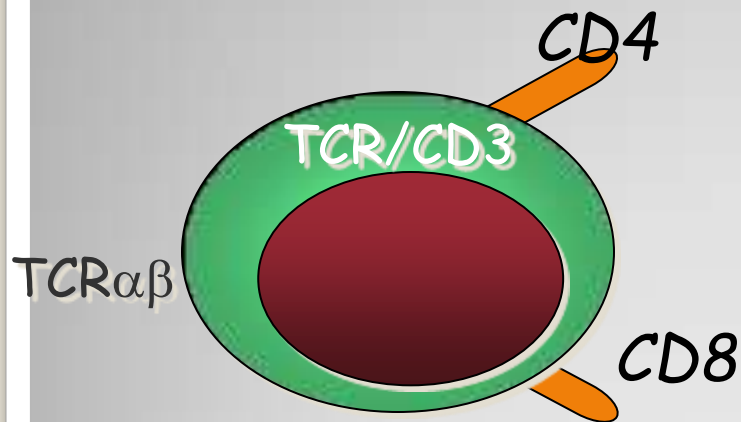
Región constante

Estadío II (timocito intermedio o común):

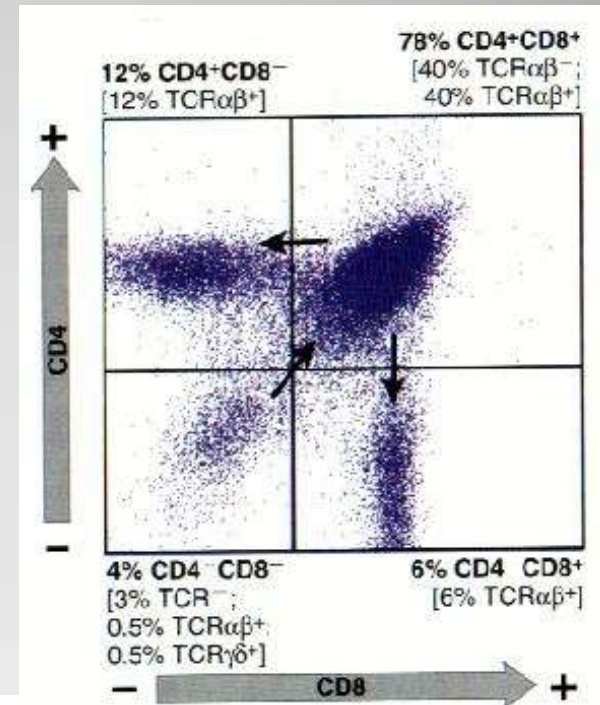


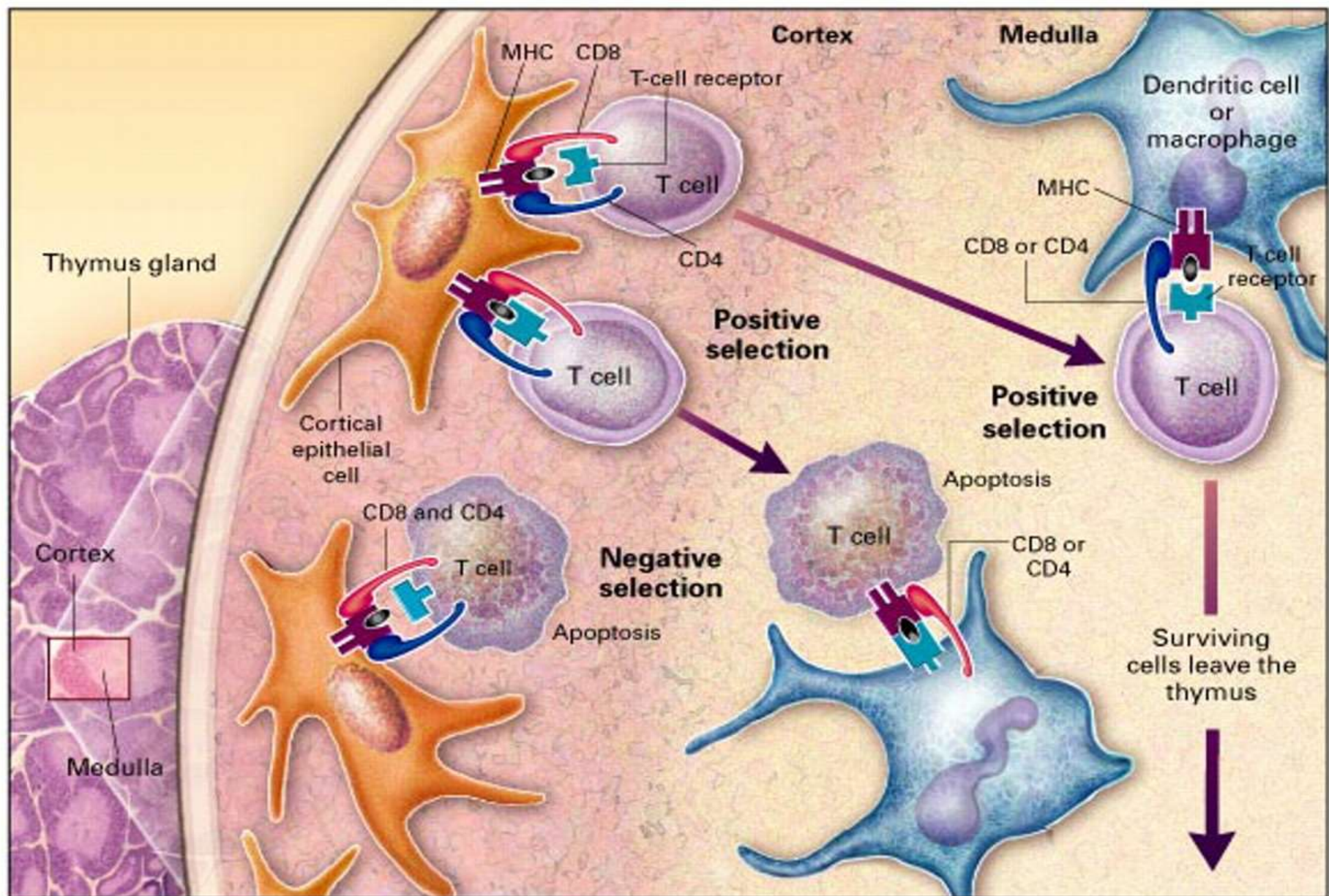
Ontogenia de Linfocitos T

Timocito doble positivo:



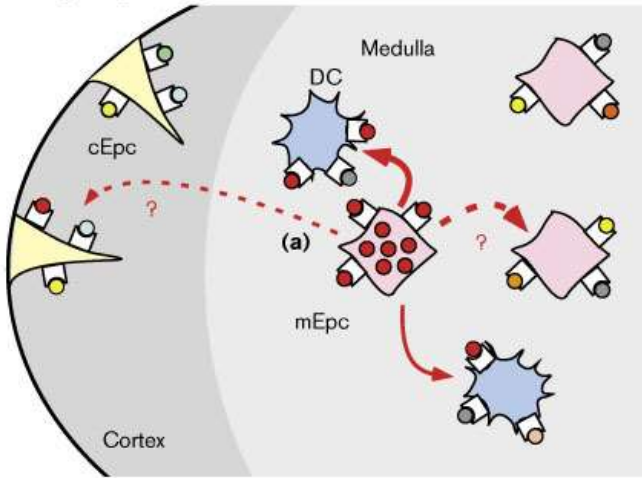
Expresan TCR y además CD4 y CD8 (DP) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo



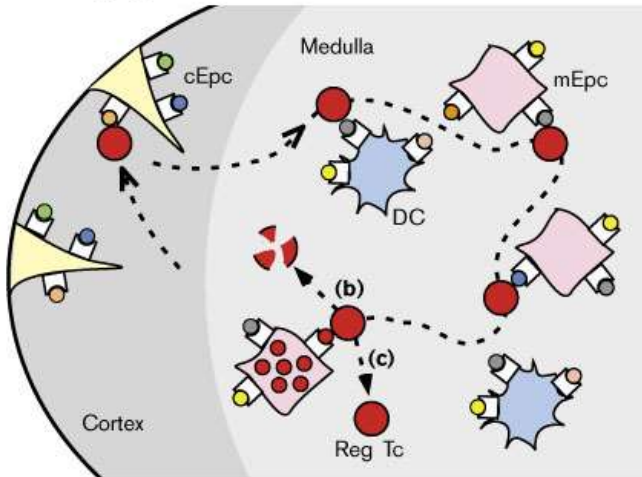


Ontogenia de linfocitos T: CÉLULAS DEL ESTROMA TÍMICO

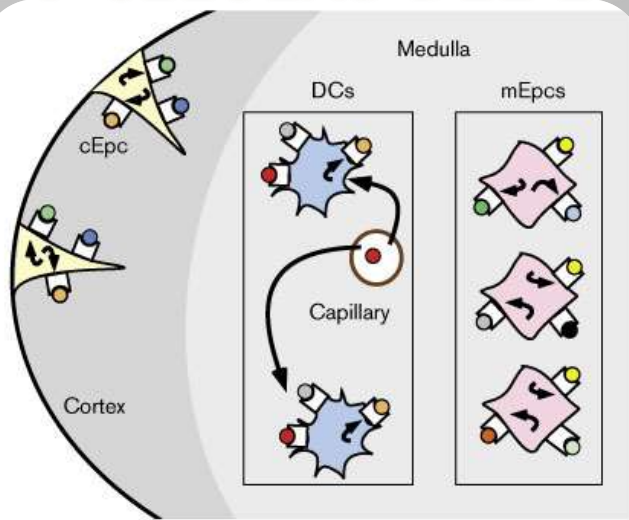
Antigen spreading



Scanning by T cells



Current Opinion in Immunology



'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

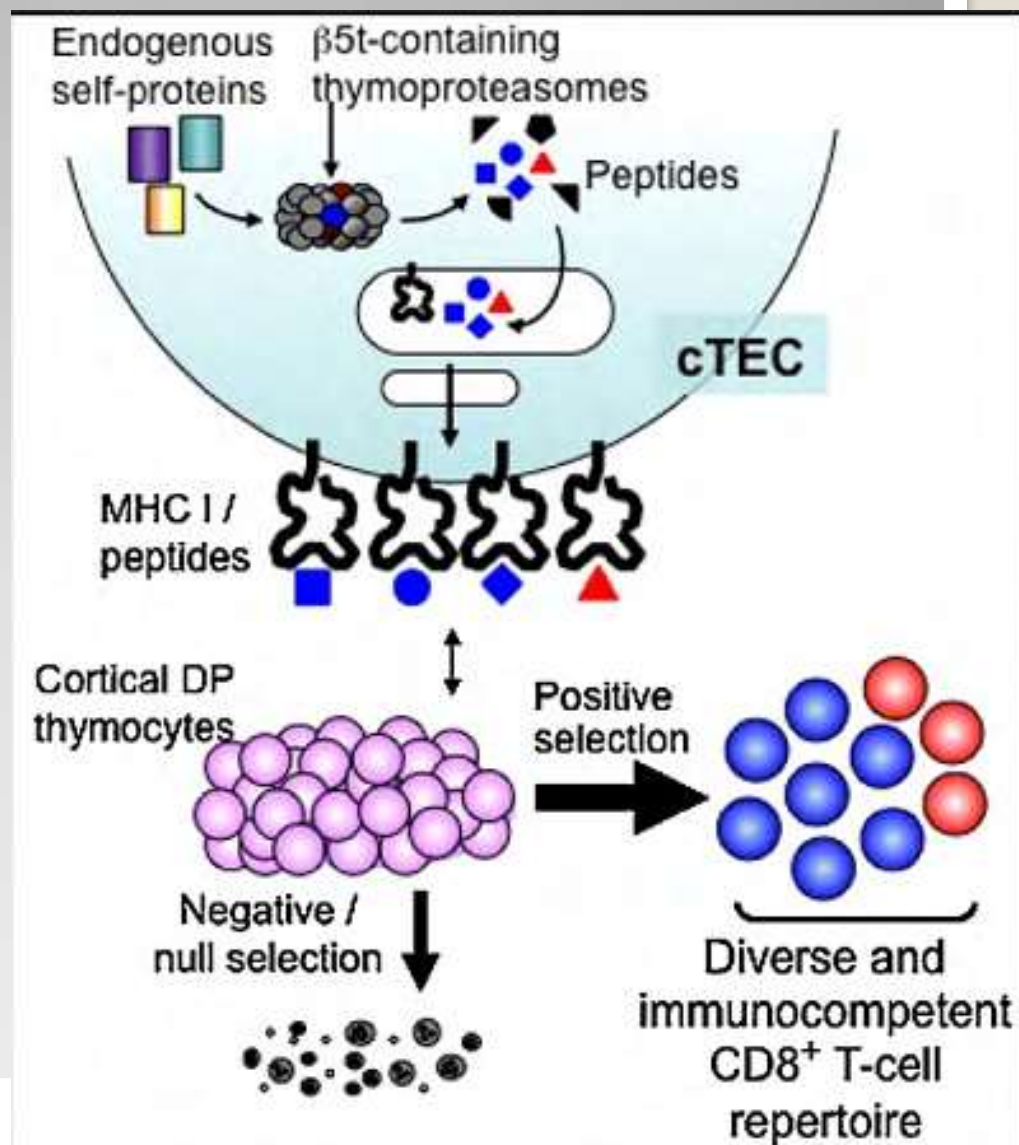
Macroautofagia

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

Resumen

- cETC: macroautofagia
 - La selección positiva regulada por las cEpc
 - Selección positiva: evaluar TCR apropiadamente expresados
 - Timoproteosoma: supe de péptidos citoplasmáticos-MHC-I/CD8
 - Alta expresión de catepsin y serinproteasa timo-esprcifica, MHC-II/CD4
- mETC: AIRE/ macroautofagia
- CDm: transporte a Ag desde la periferia
 - La tolerancia central, es mediada principalmente por las mETC y *células dendríticas tímicas residentes del timo*

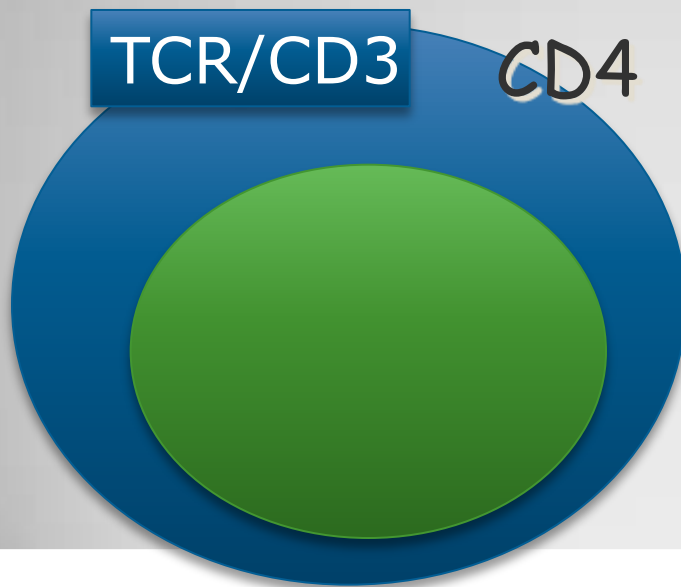


Ontogenia de Linfocitos T

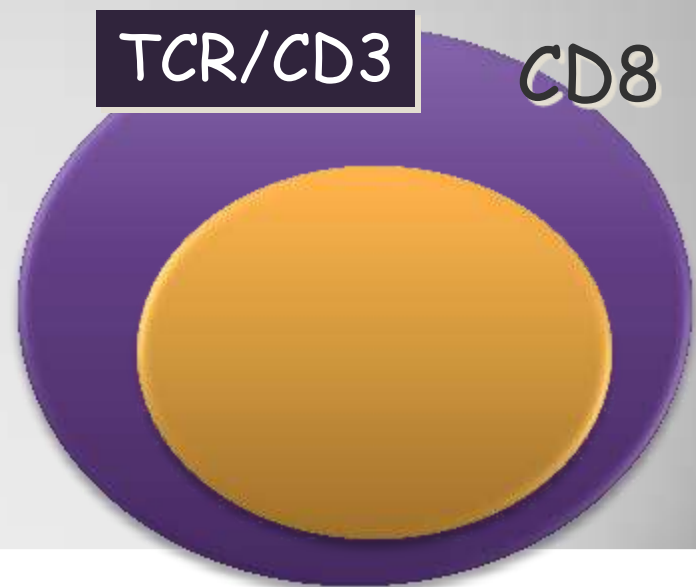
Estadío III (linfocito T maduro):

MHC-II

MCH-I



\uparrow TCR $\alpha\beta$



Ontogenia de linfocitos

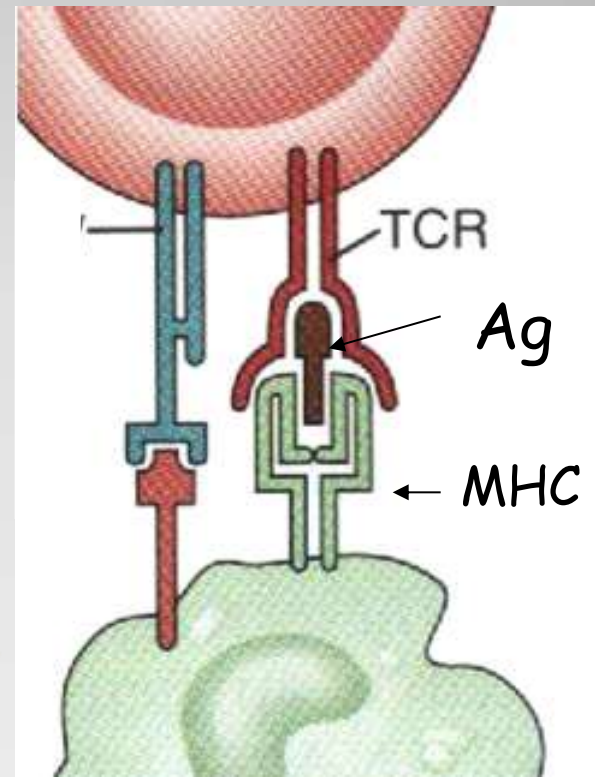
T

- Selección positiva (rescate de la apoptosis):
 - TCR no reconozca a los Ag propios
- Selección negativa:
 - TCR con alta afinidad por el Ag propio
 - Corteza profunda, unión cortico-medular y medula
 - Células interdigitantes

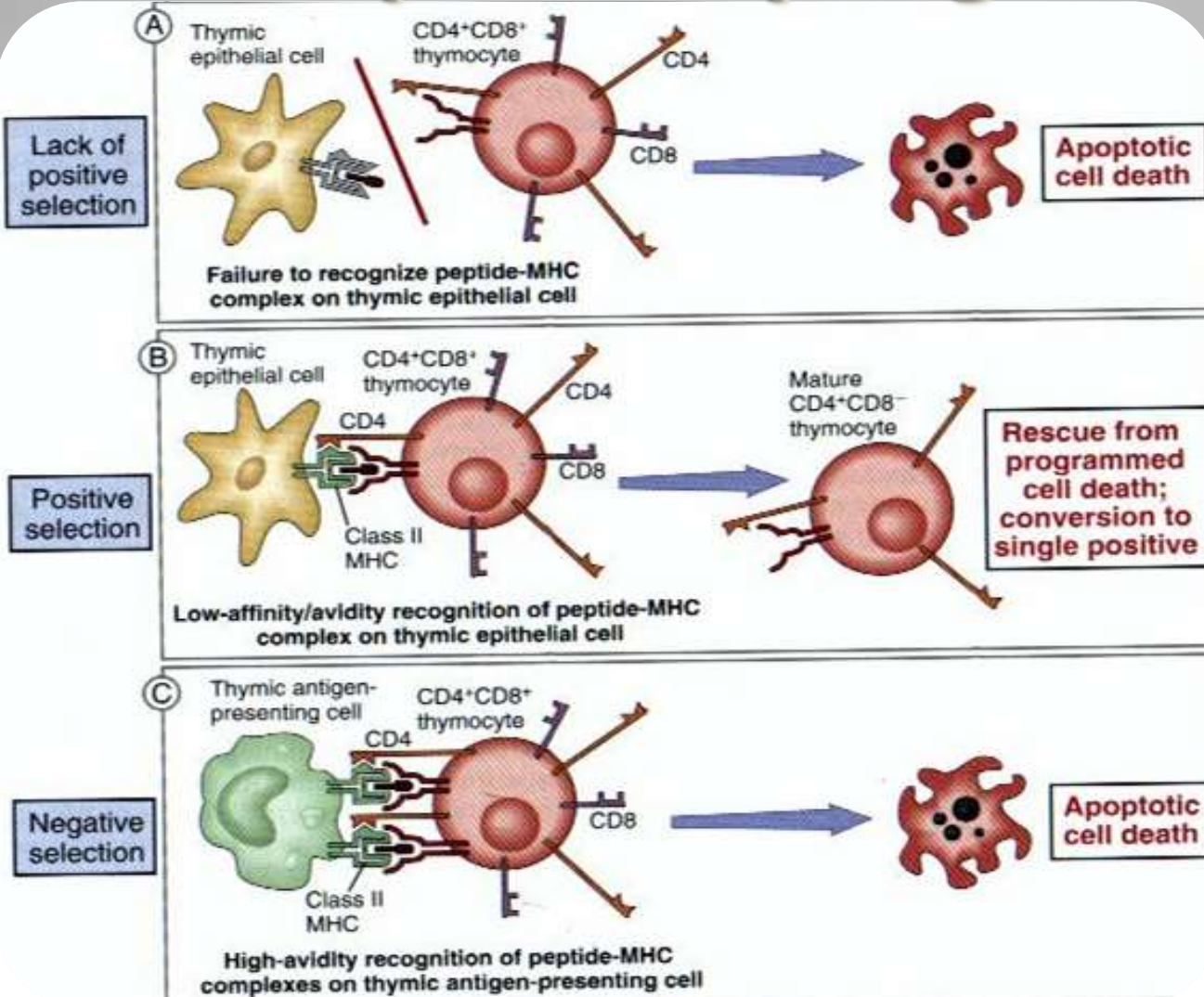
Ontogenia de Linfocitos T

Control de calidad:

Capaz de interactuar con MHC propia (base de toda respuesta inmunológica) y de esta manera reconoce los antígenos presentados



Ontogenia de Linfocitos T: Selección positiva y negativa

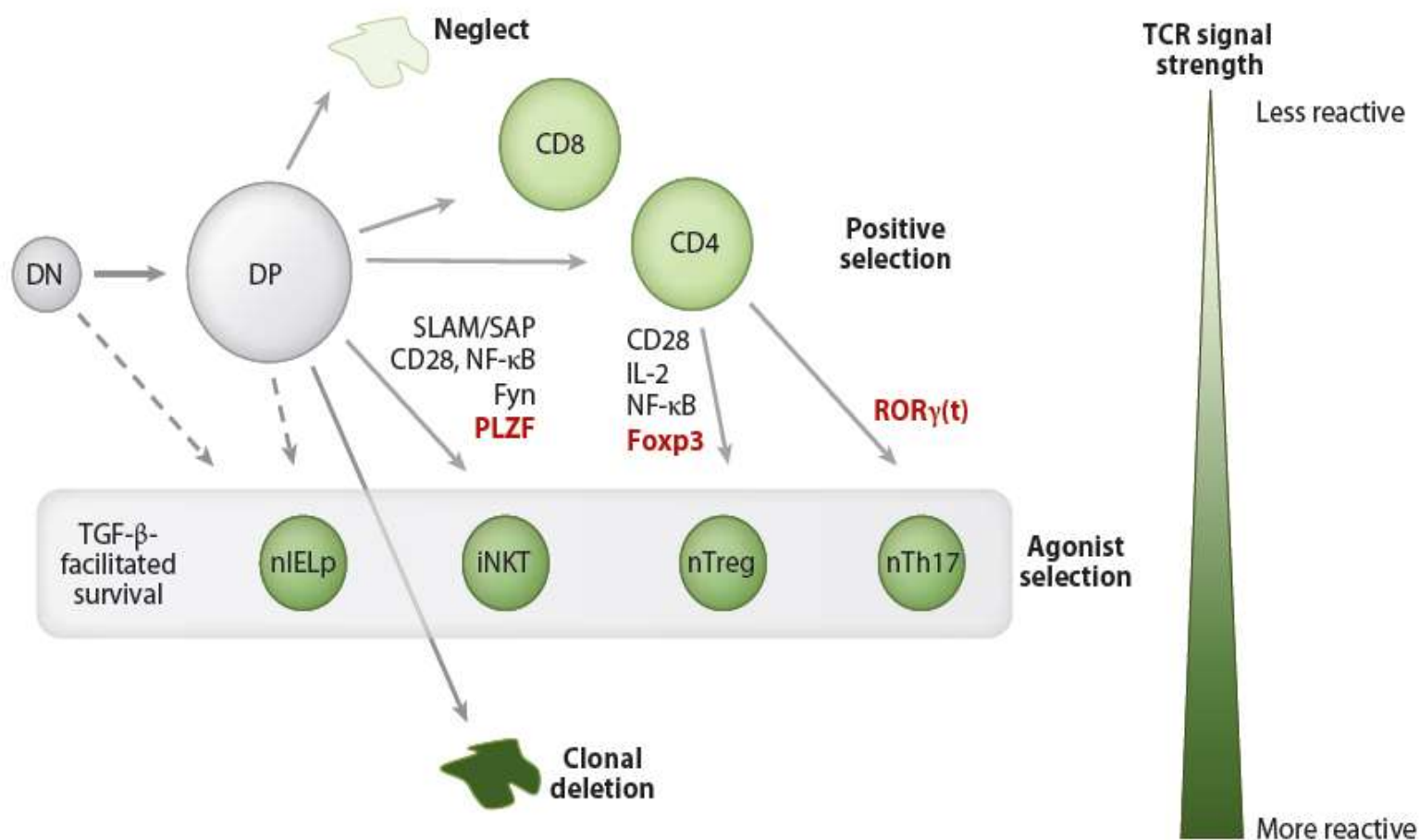


Muerte o
anergia

Ontogenia de linfocitos T

- *Selección negativa:*
 - TCR con alta o muy baja (negligencia, no recibe señal de sobrevida) afinidad por el Ag (son CD24+)
 - 90% mueren por negligencia
 - Muchos TCR se acoplan simultáneamente con su ligando y tiempo de unión al ligando?
 - Altas concentraciones de ligandos de alta afinidad
 - Mueren por apoptosis mediada por:
 - Fas, TNFR, CD30 (CD28 actúa como co-factor)
 - TCRs con alta afinidad pueden dar origen a células T reguladoras (CD4/CD25+)

Ontogenia de linfocitos T



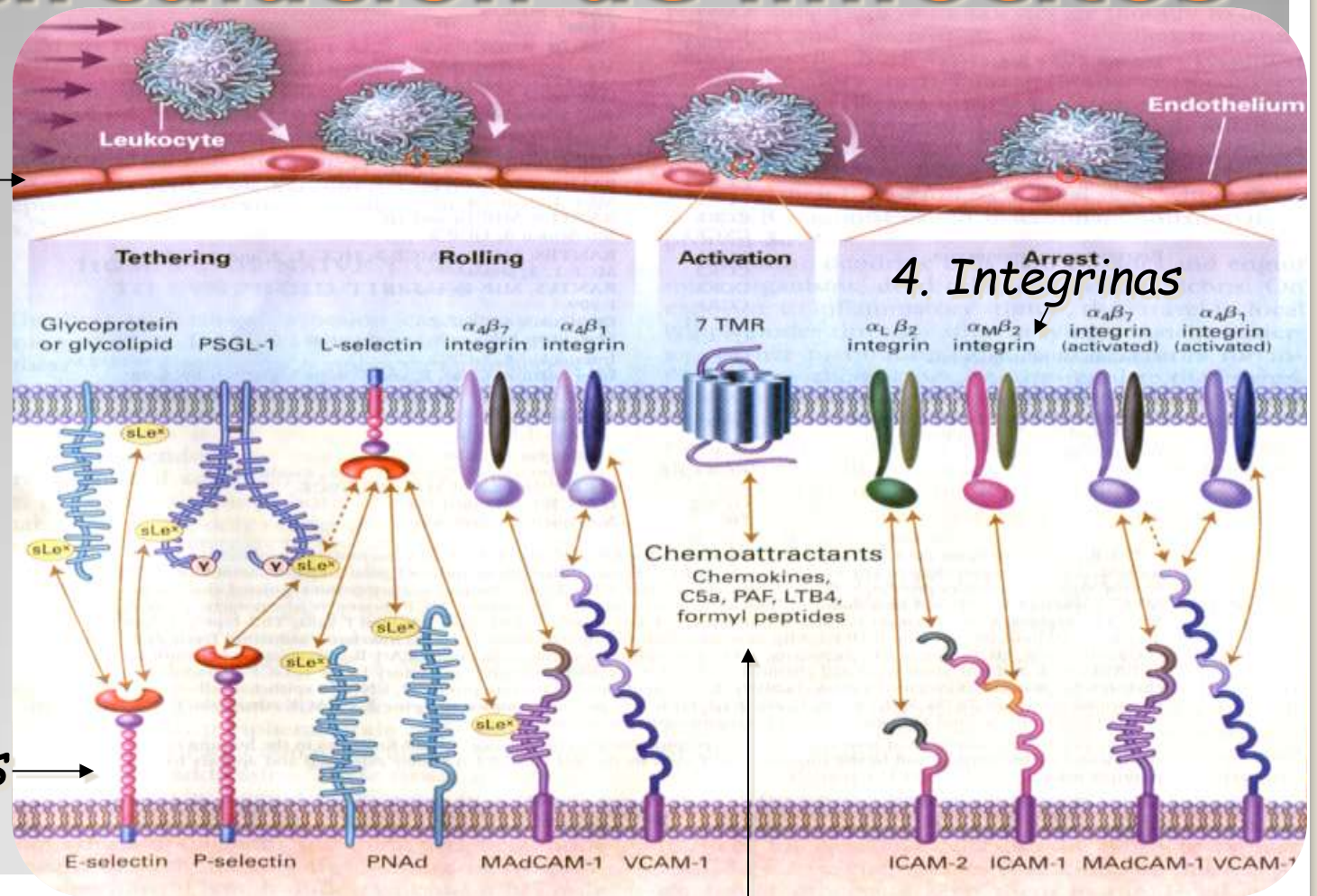
Recirculación de linfocitos

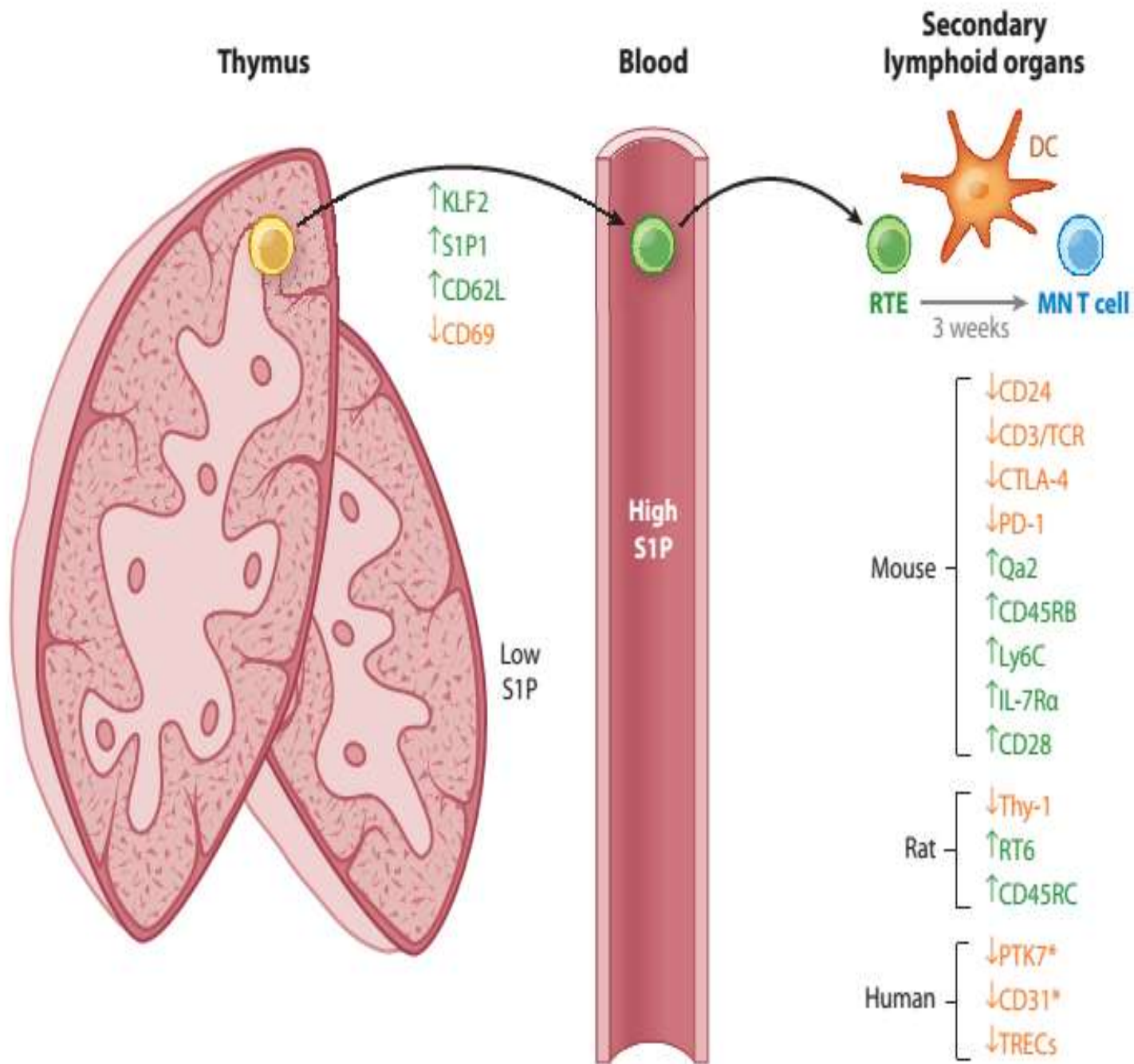
1. HEV →

2. Selectinas →

3. Quimiocinas

4. Integrinas

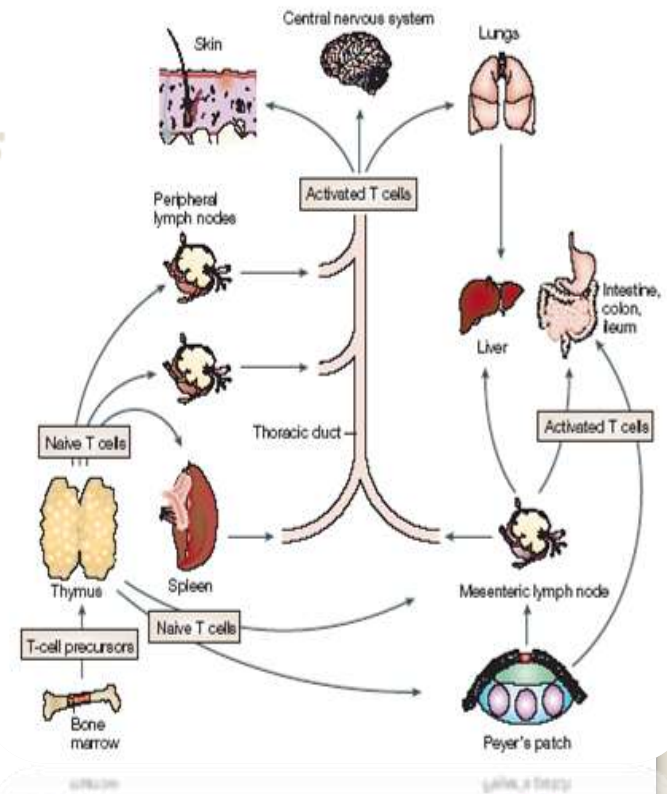




Recirculación y alojamiento de los leucocitos

Objetivos fundamentales de la recirculación y alojamiento:

- Balance en la distribución de linfocitos en los tejidos
- Selección de linfocitos Ag-específicos (órganos linfoides secundarios)
- Renovación continua de los microambientes
- Representantes en todo el cuerpo de linfocitos específicos para un determinado Ag
- Reclutamiento rápido a los sitios de inflamación



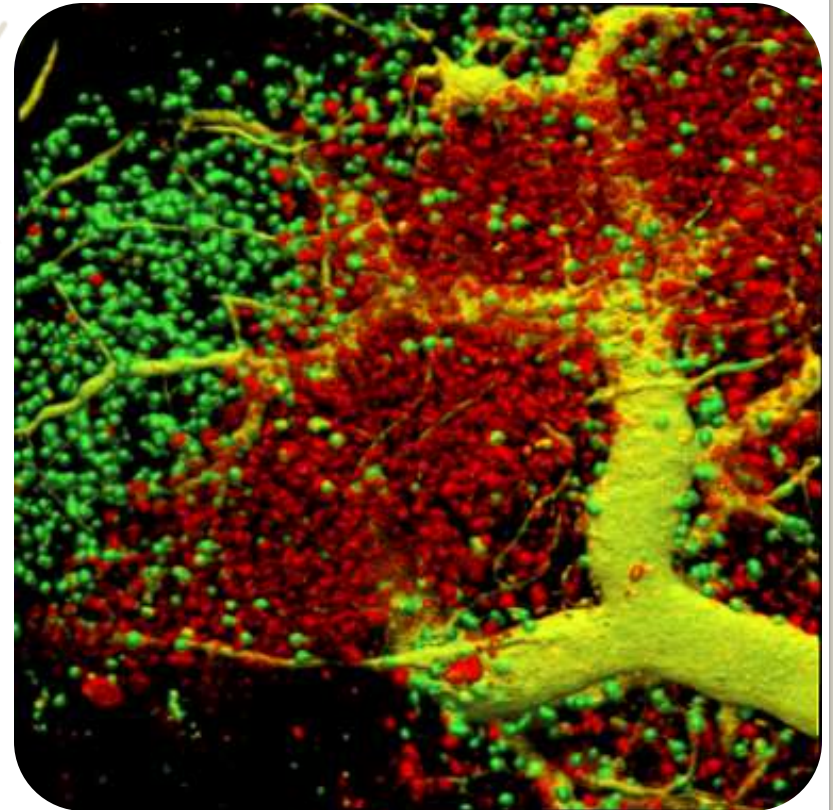
Recirculación y alojamiento de los leucocitos

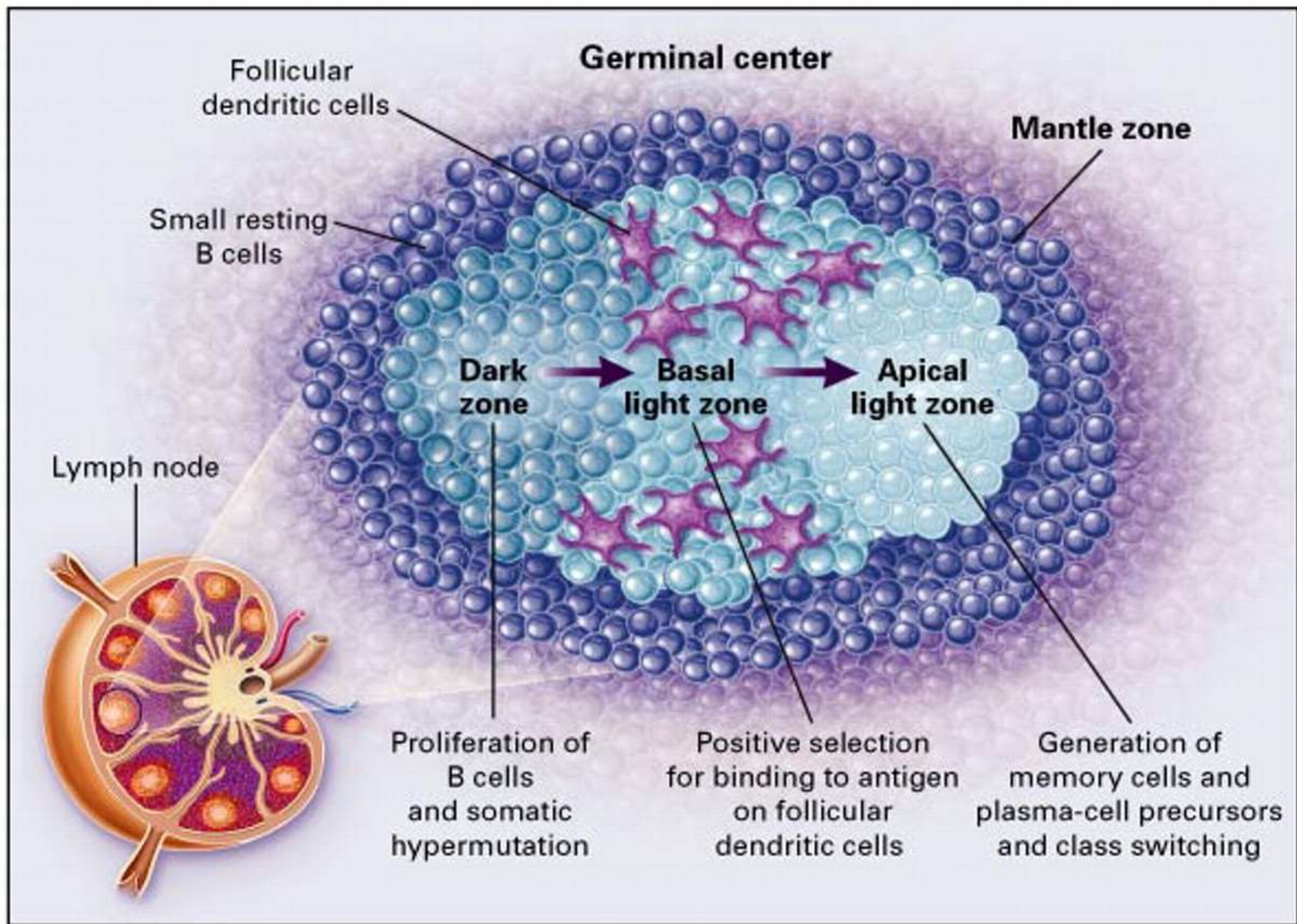
Tráfico no es aleatorio

Qué determina la distribución y tráfico diferencial?

Expresión y activación diferencial de receptores de quimiocinas y de integrinas

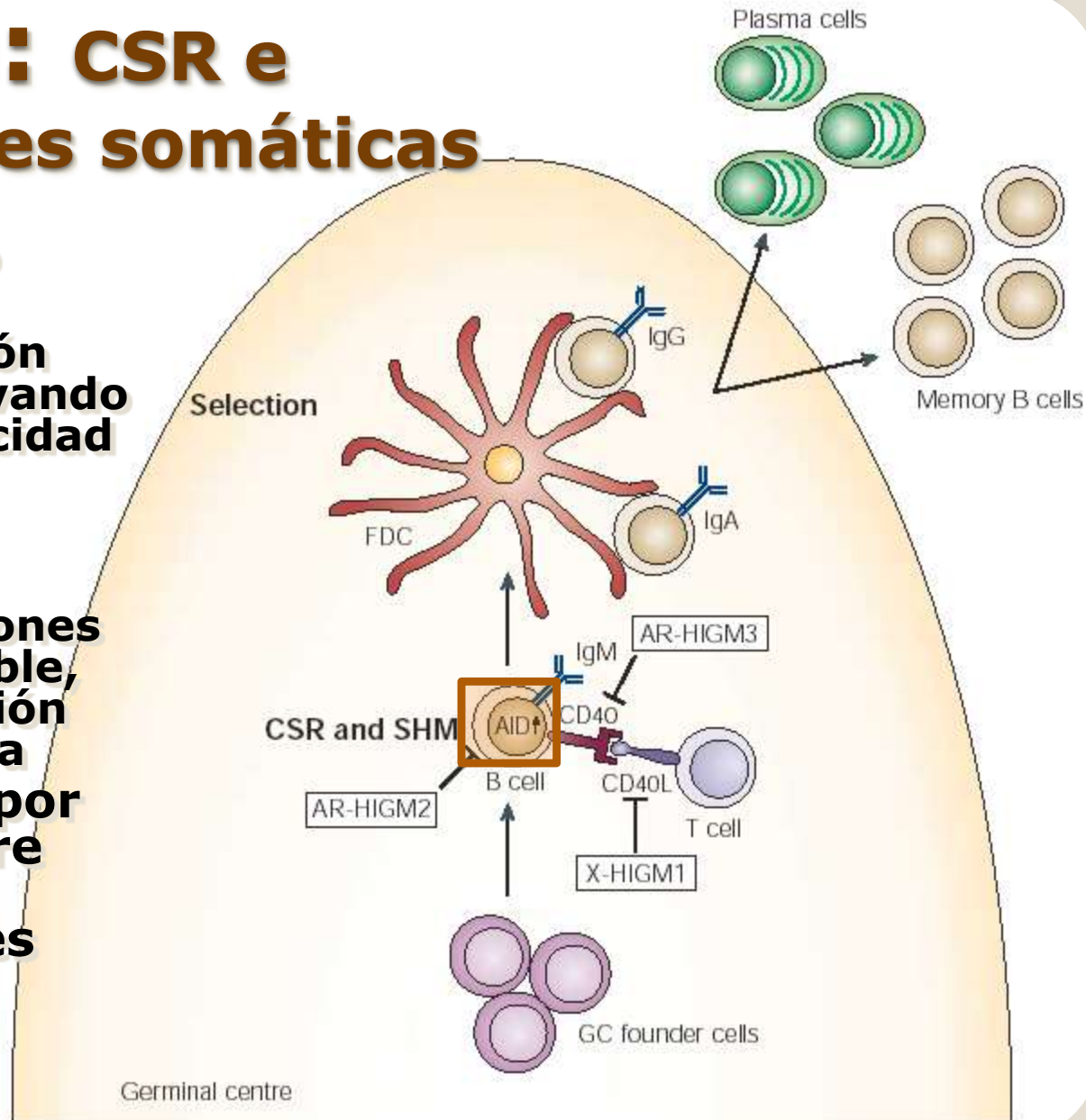
- Células "naïve" migración restringida a los órganos secundarios
- Células efectoras y de memoria pueden trasladarse a órganos linfoides y no linfoides (virtualmente a cualquier órgano)
 - Tendencia a ubicarse en el sitio original de su activación





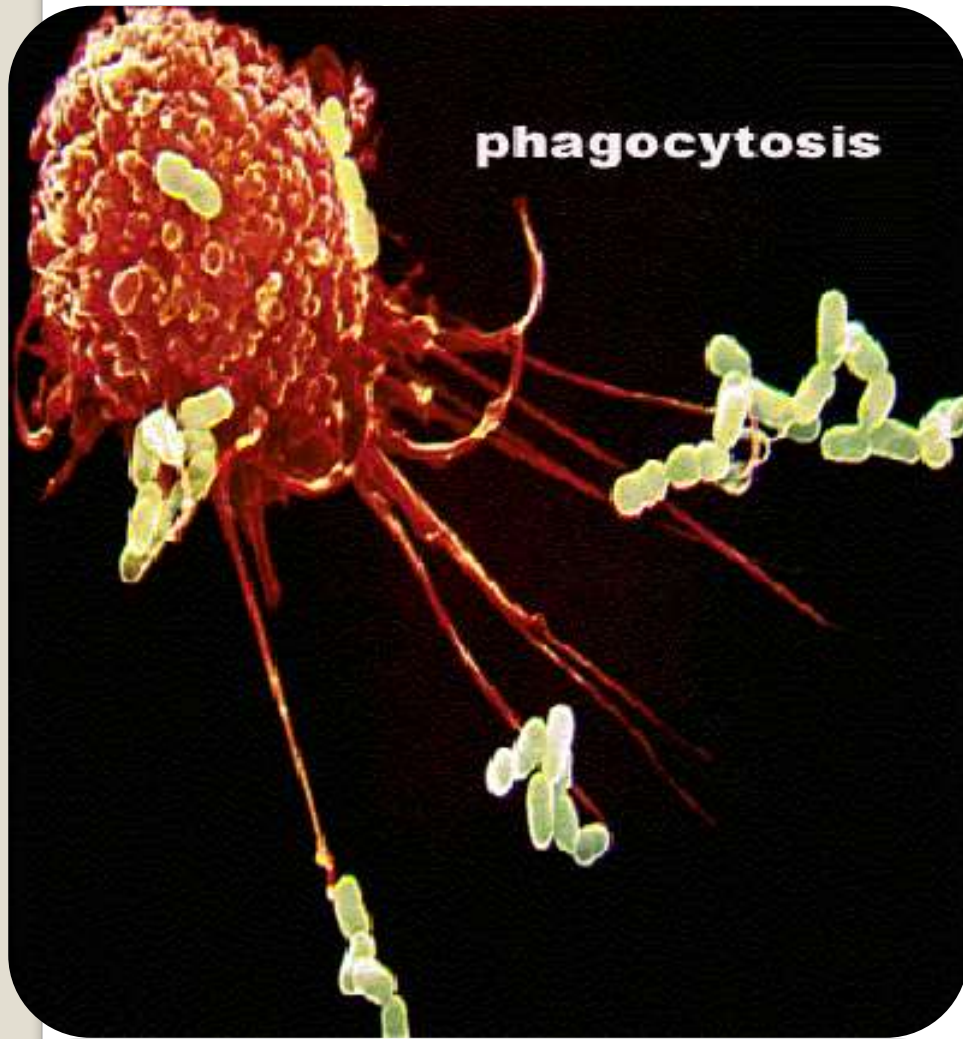
Ontogenia: CSR e hipermutaciones somáticas

- ▶ **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 y maduración final de los linfocitos

- *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, recirculación y alojamiento le permite a los linfocitos estar preparados para reconocer de manera específica a los antígenos extraños