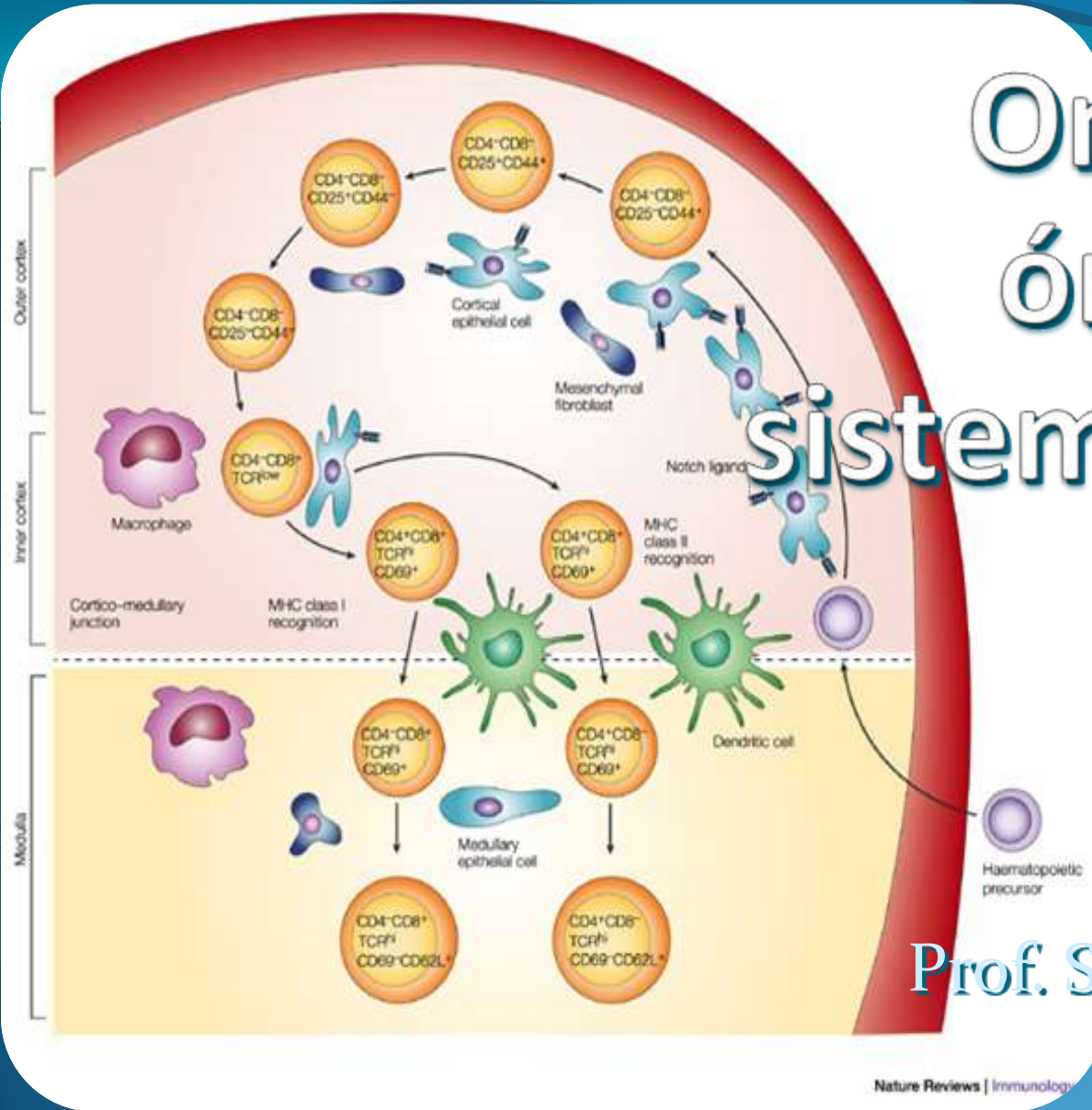


Ontogenia y órganos del sistema inmune



Prof. Siham Salmen Halabi
Idic-ULA

Curso de Pre-grado 2011

Órganos del sistema inmune

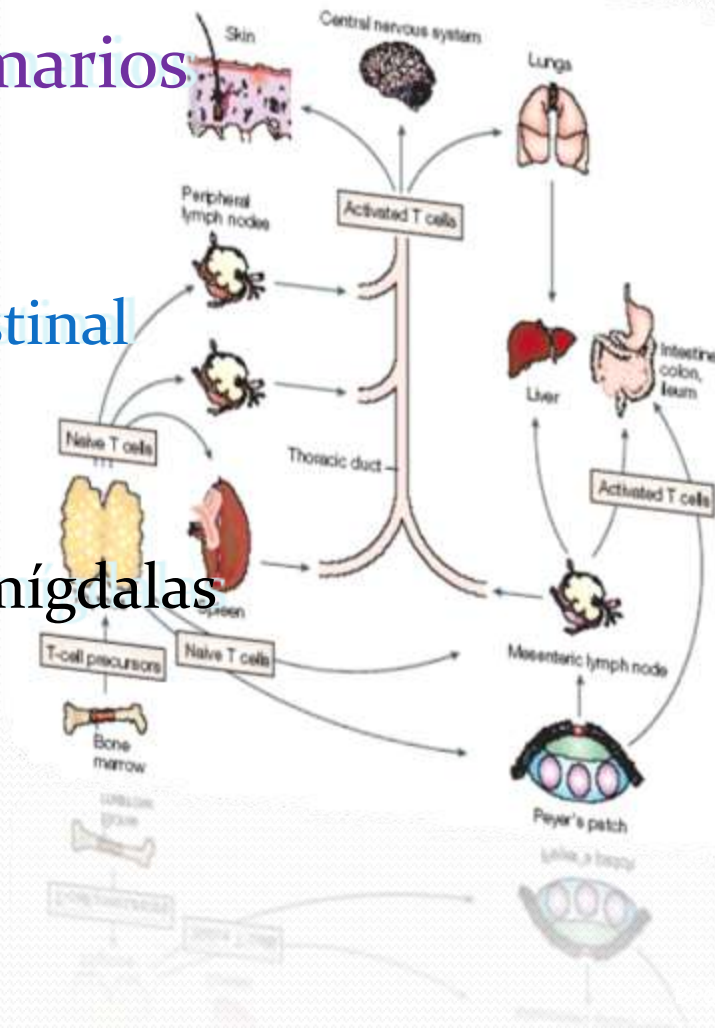
- Microambientes

- Órganos primarios

- Timo
- Médula ósea
- Epitelio intestinal

- Órganos secundarios

- Ganglios y amígdalas
- Bazo
- MALT



Elementos de la respuesta inmune:

Inmunidad innata:

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

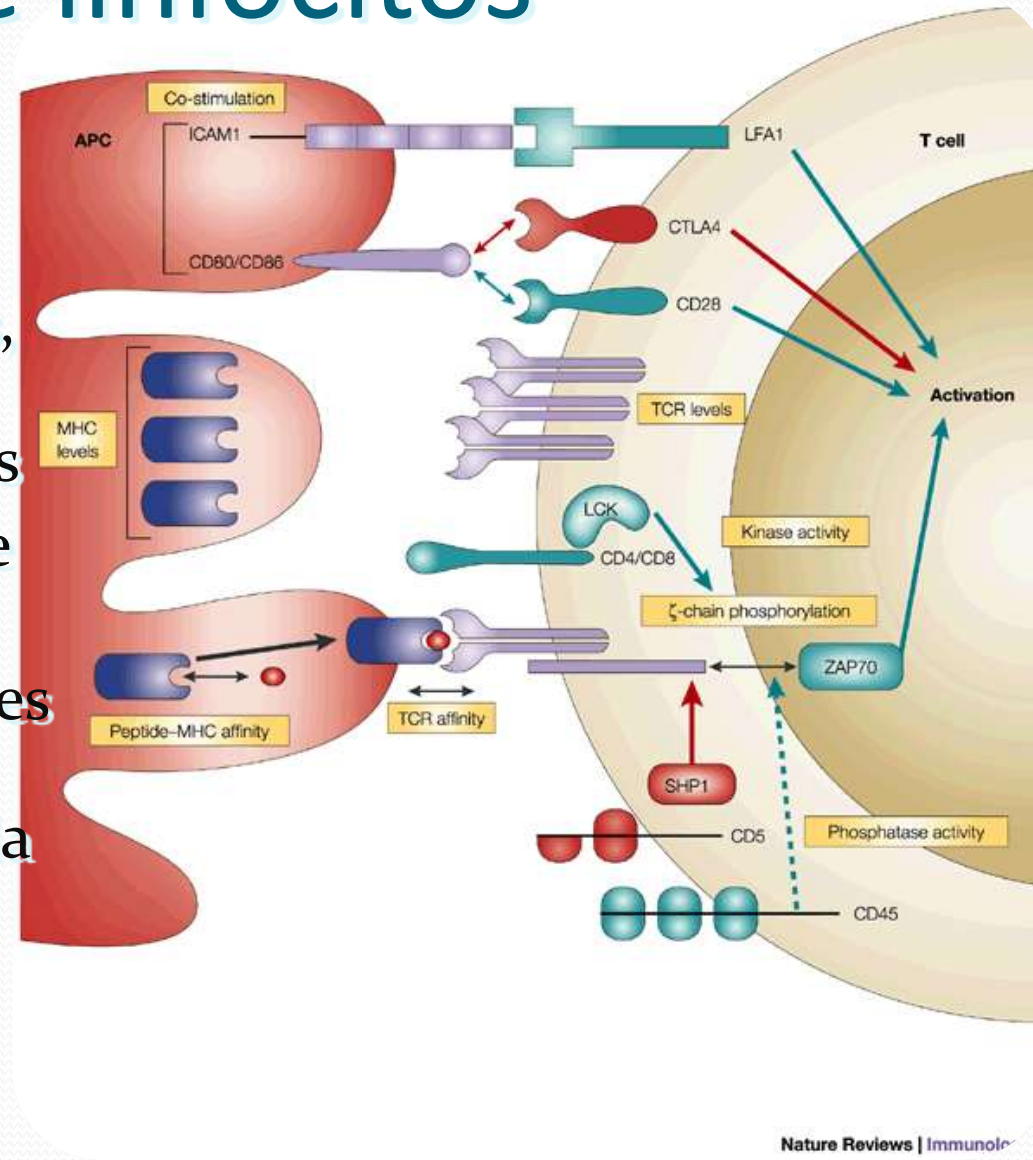
Células linfoides
(células dendríticas plasmocitoides, NK, linfocitos $T\gamma\delta$)

Inmunidad adaptativa

Linfocitos T (CD4, CD8, Treg, NKT) y B (B1 y B2)

Ontogenia de linfocitos

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



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

- **Preguntas a responder:**

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

Ontogenia de linfocitos

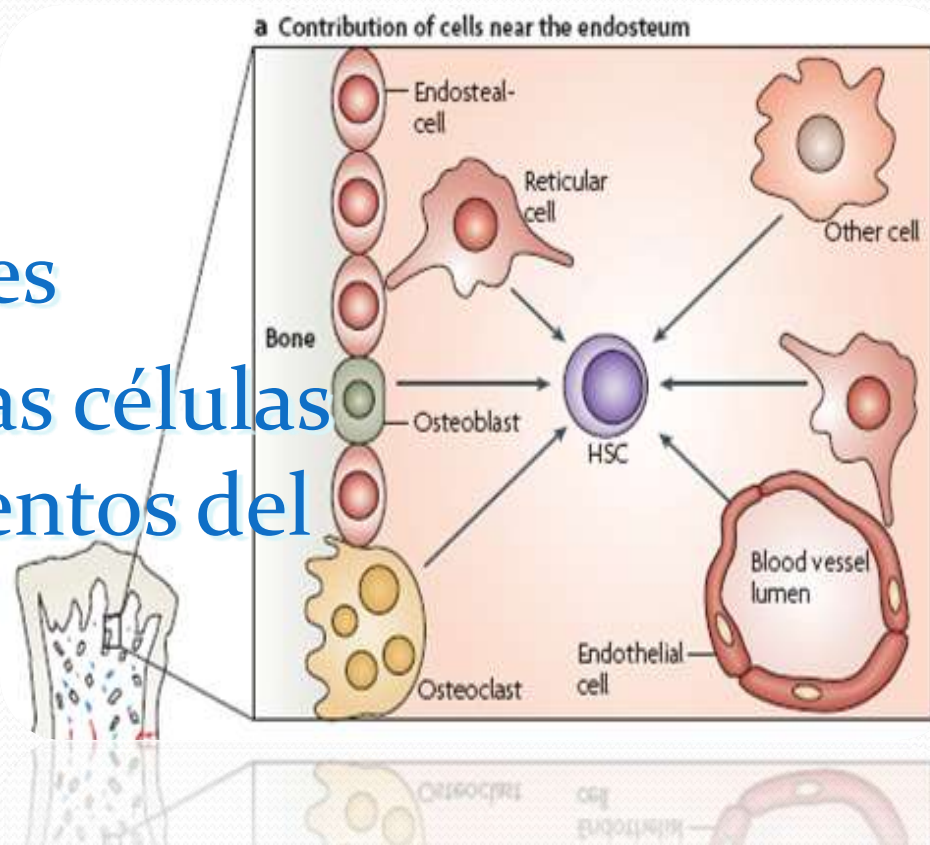
- ¿Cuál es la razón de la existencia mecanismos de regulación del desarrollo de los linfocitos?
 - Asegurarse de contar con el repertorio de células capaces de reconocer a todos los Ag extraños presentes en la naturaleza
 - Asegurarse que el sistema inmune reconozca como propio a los Ag del individuo (**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 de regulación del desarrollo de los linfocitos?
 - Asegurarse que los receptores antigénicos (BCR, TCR) sean útiles (selección positiva) y los receptores potencialmente peligrosos y autorreactivos sean eliminados (selección negativa)
 - Asegurarse que los linfocitos puedan comunicarse con las células accesorias (aquellos que no lo hacen sufren muerte por negligencia)

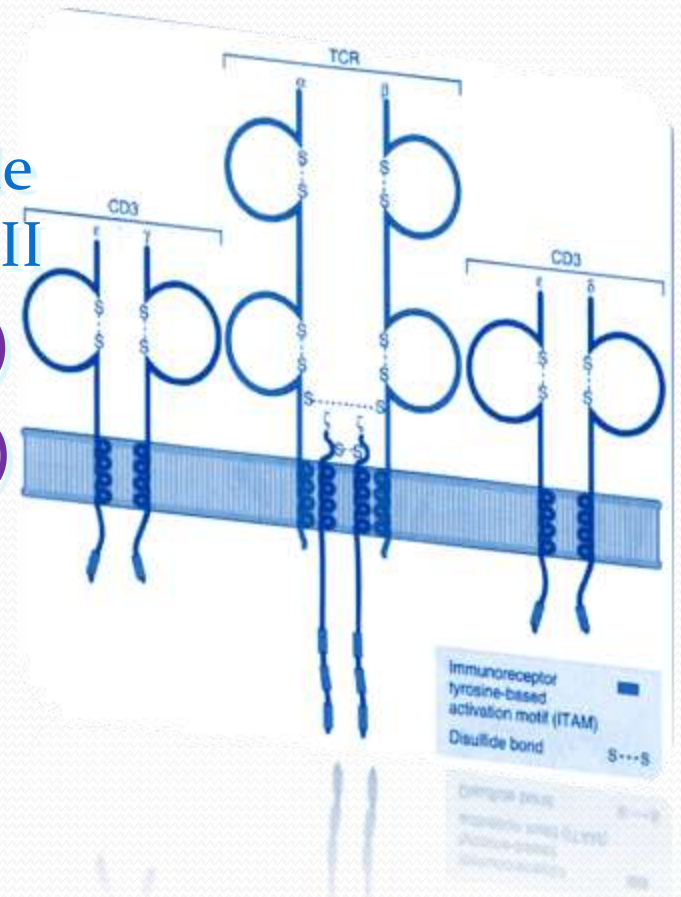
Ontogenias de linfocitos

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



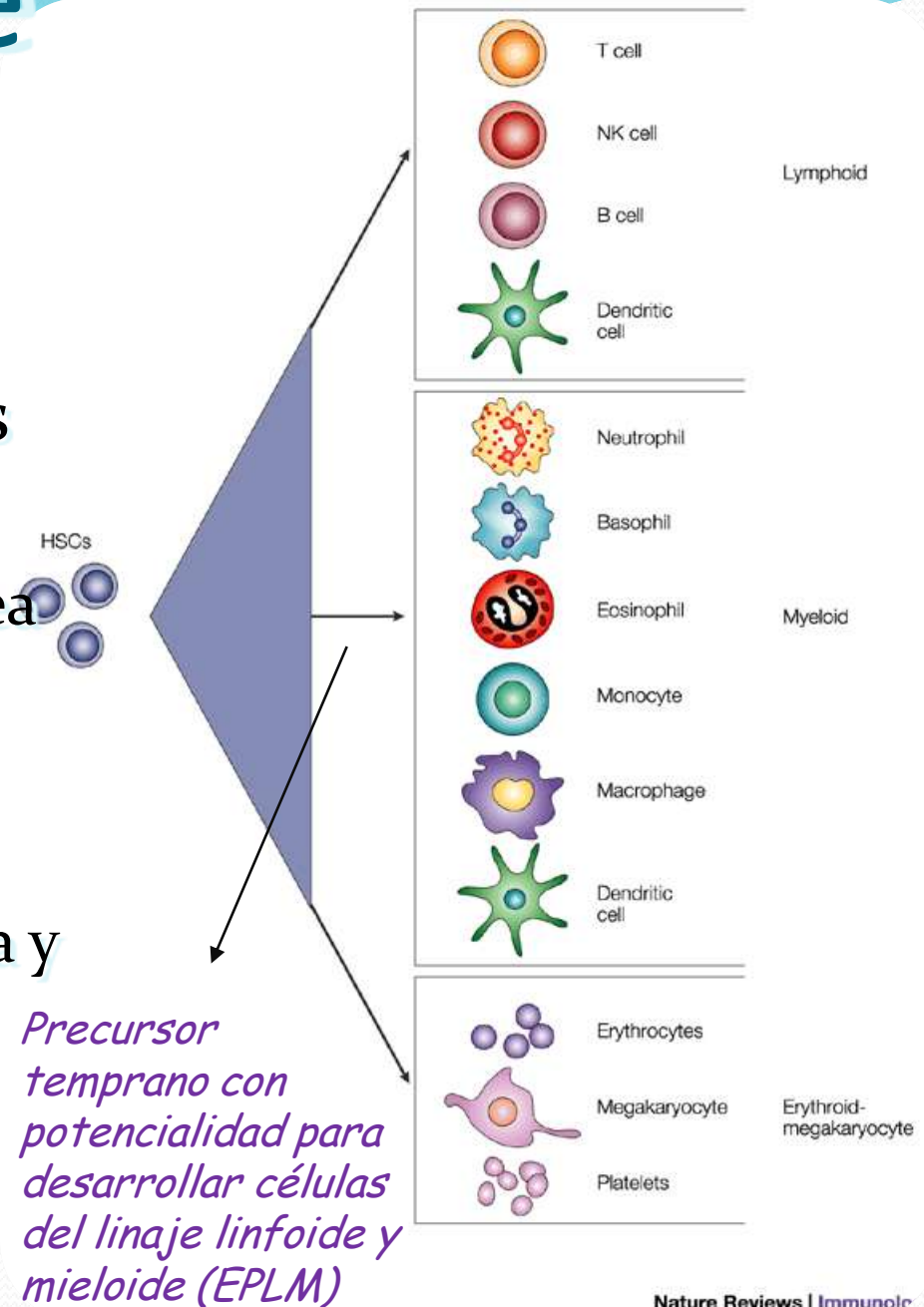
Elementos del sistema inmune

- MHC-I y MHC-II
 - Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II
- Receptor de linfocitos T (TCR)
- Receptor de linfocitos B (BCR)
- Mediadores solubles (Ej. Interleukinas)



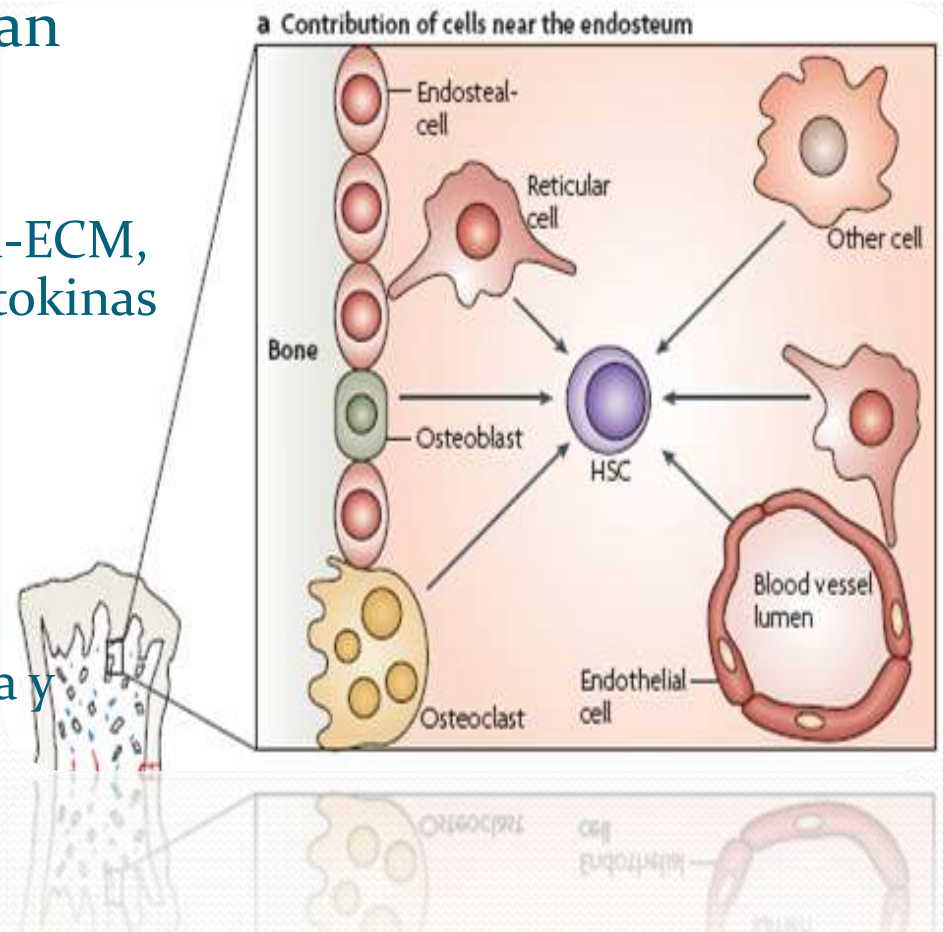
Ontogenia de linfocitos

- 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

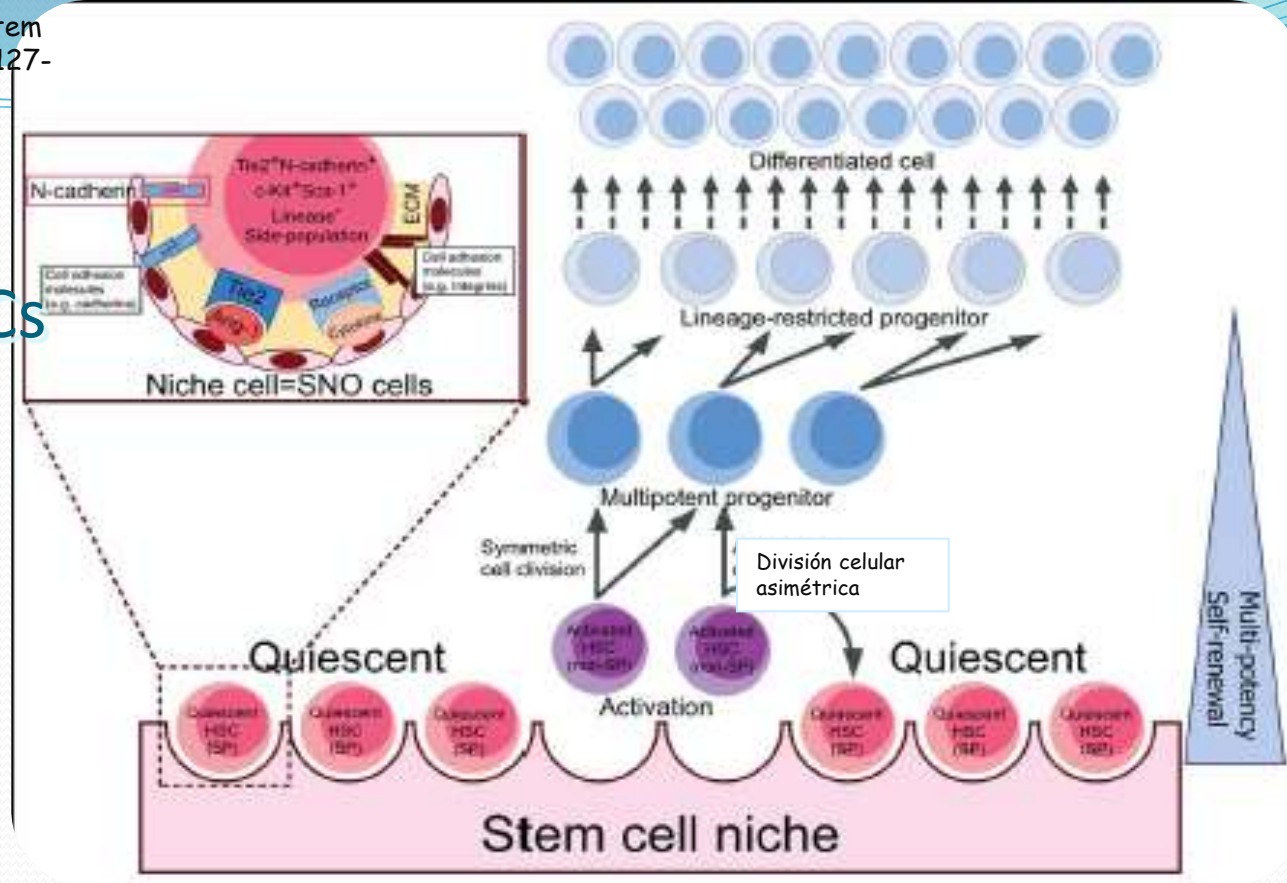
- Médula ósea
 - Nicho: combinación de HCS y células del estroma, median señales extrínsecas que mantienen a las HCS.
 - Sitios de contacto cel-cel, cel-ECM, concentración variable de citokinas y factores de crecimiento
 - Endostio
 - Formado por osteoblastos y osteoclasto
 - ECM: colágeno, elastina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

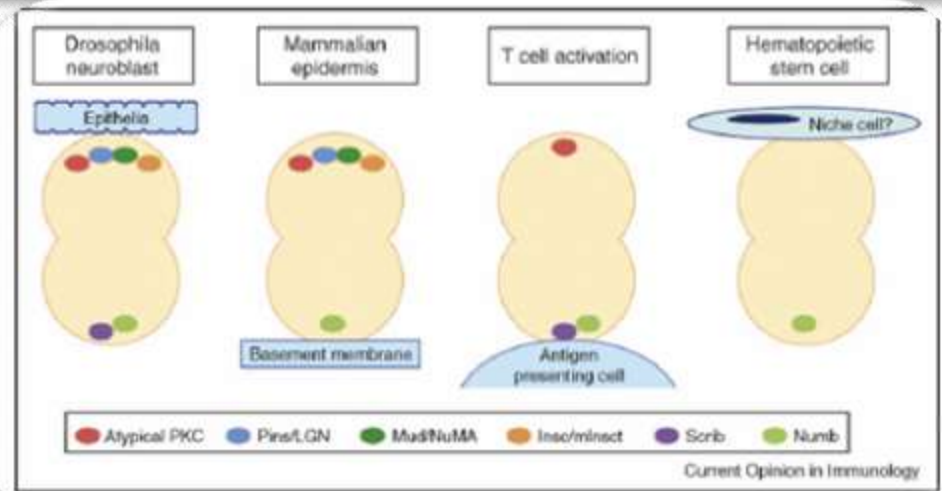
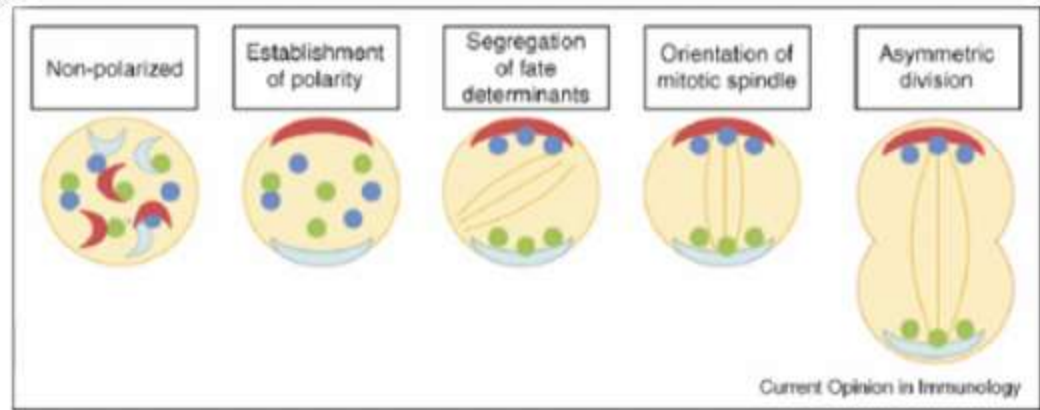
Características de las HSCs en reposo

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: 1-6%

Ontogenia: ORIGEN DE LAS HSCs

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

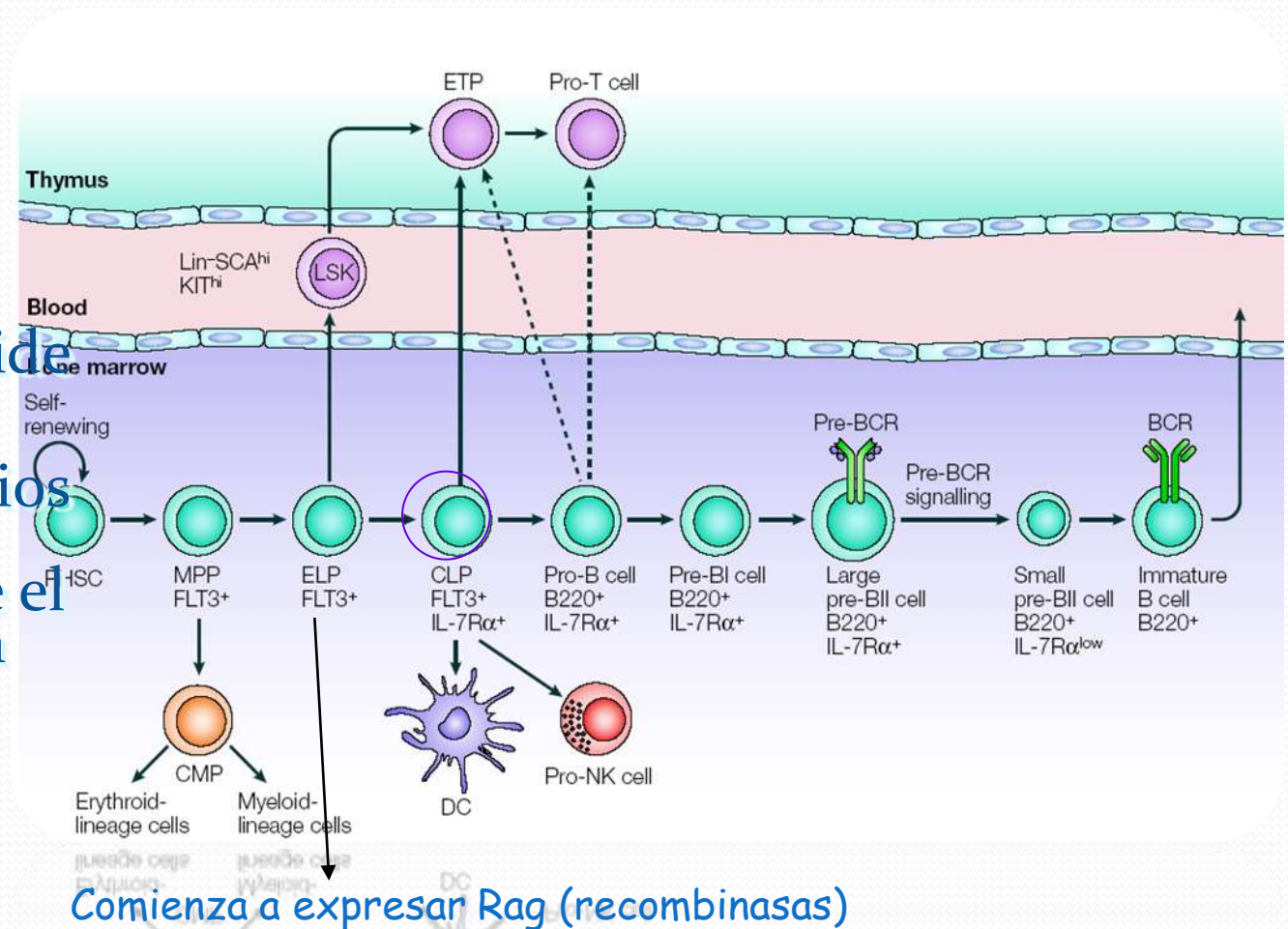
Ubicación del huso mitótico perpendicular al nicho, así asegurar que una de las hijas pierda el contacto con el nicho



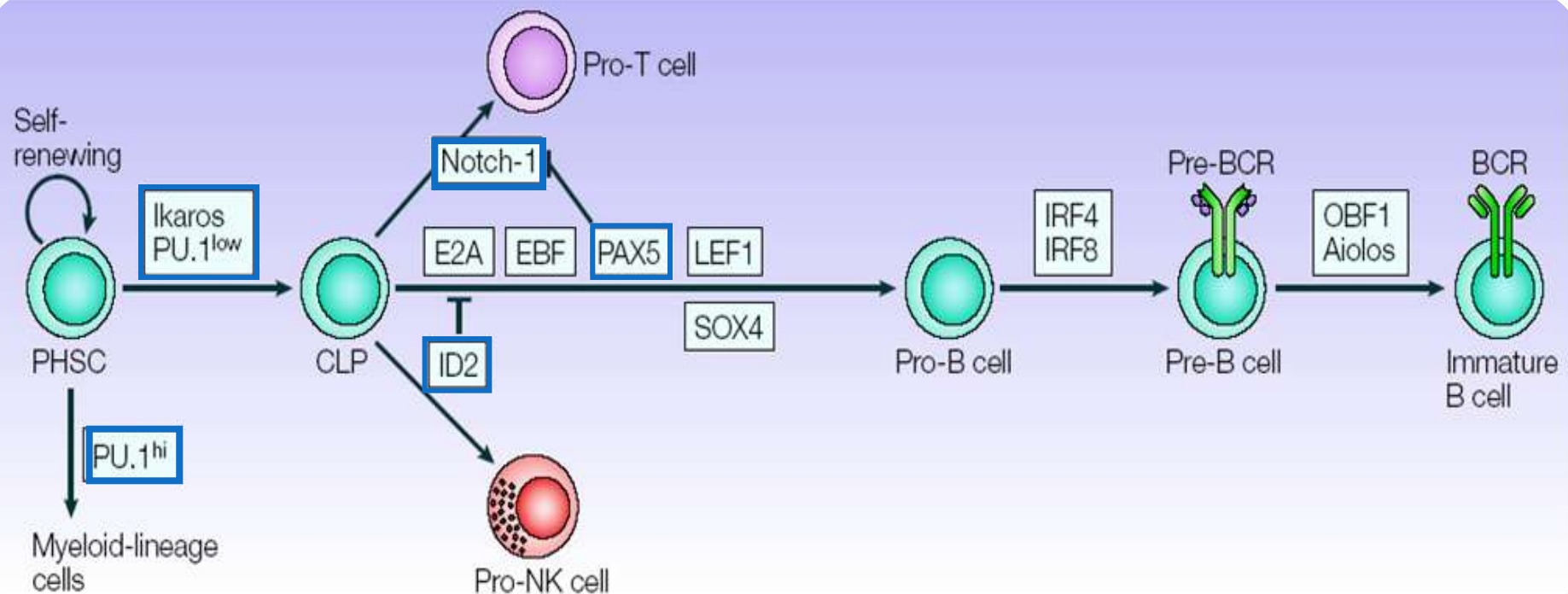
Ontogenia de linfocitos

CLP: precursor linfoide común
CMP: precursor mieloide común

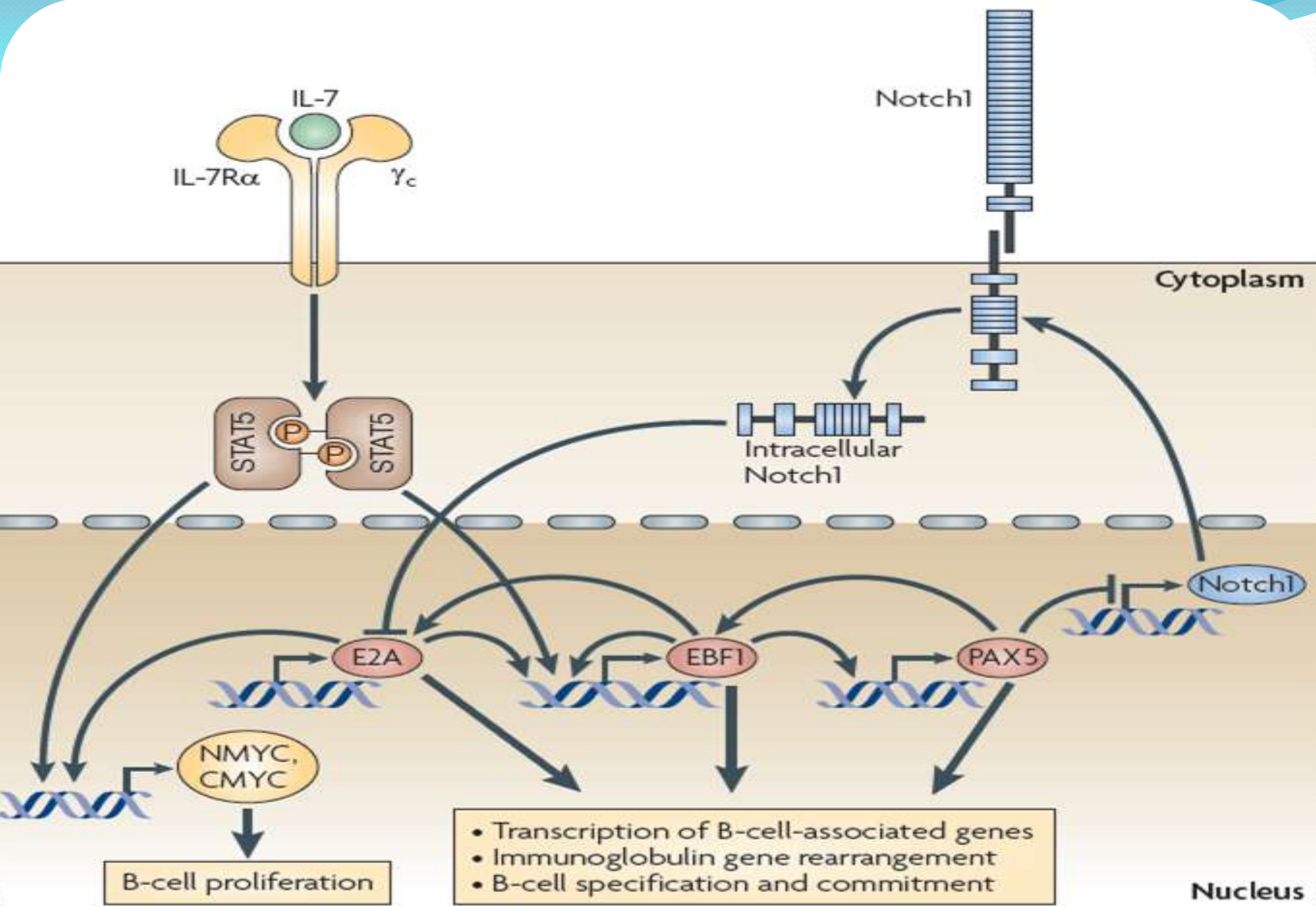
- Primer paso: Progenitor multipotencial origina el linaje linfoide y mieloide
- En ciertos estadios de maduración puede revertirse el desarrollo de un linaje celular



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

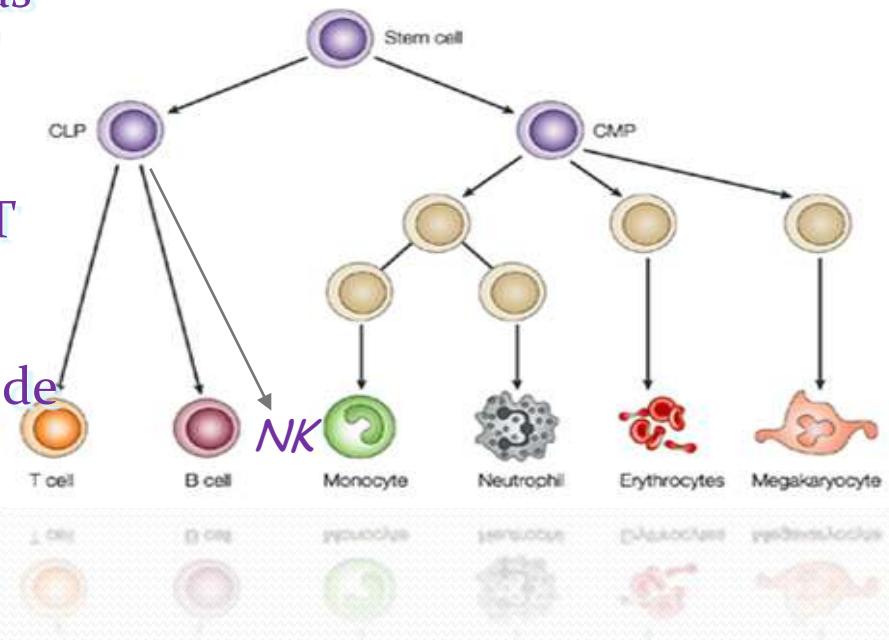


Factores de transcripción involucrados en el desarrollo



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) ^a
 - 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



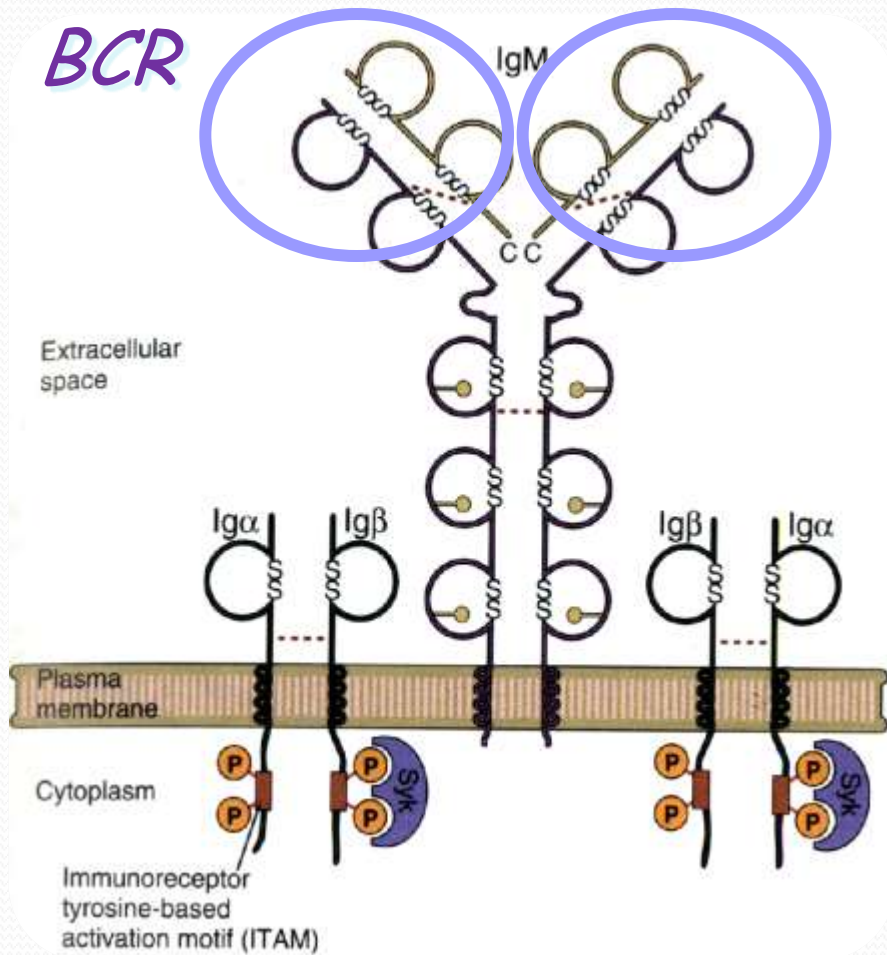
Ontogenia de los linfocitos

- 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

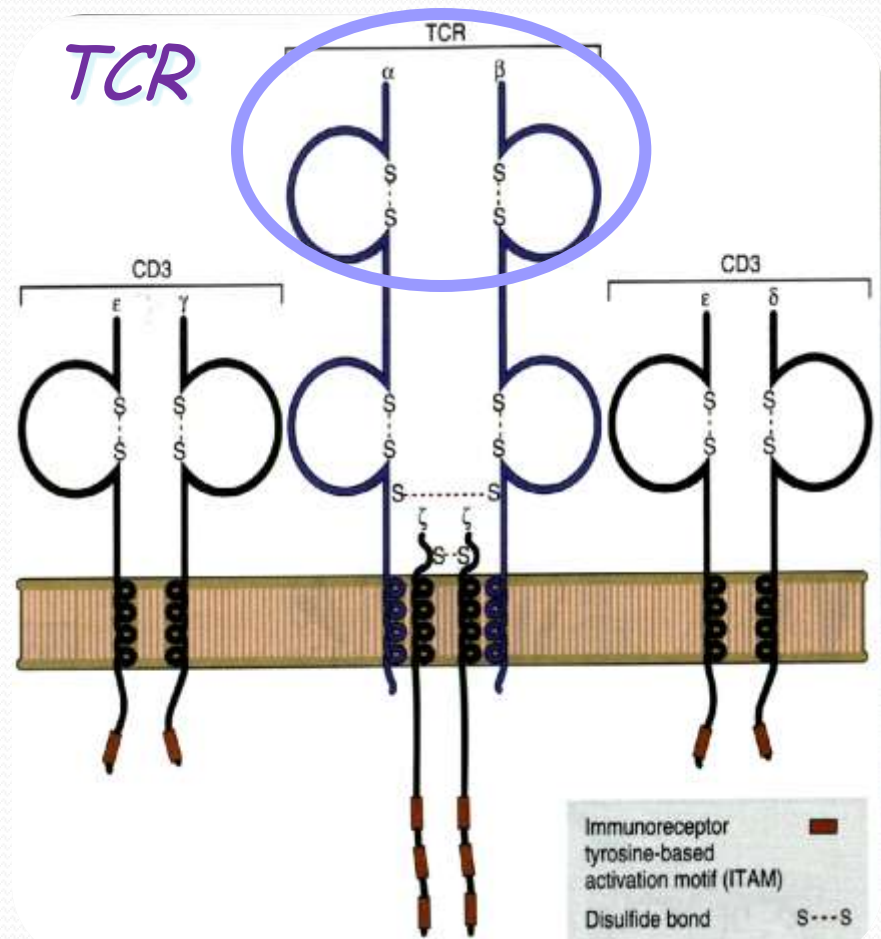
Uno de los objetivos fundamentales de la ontogenia:

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

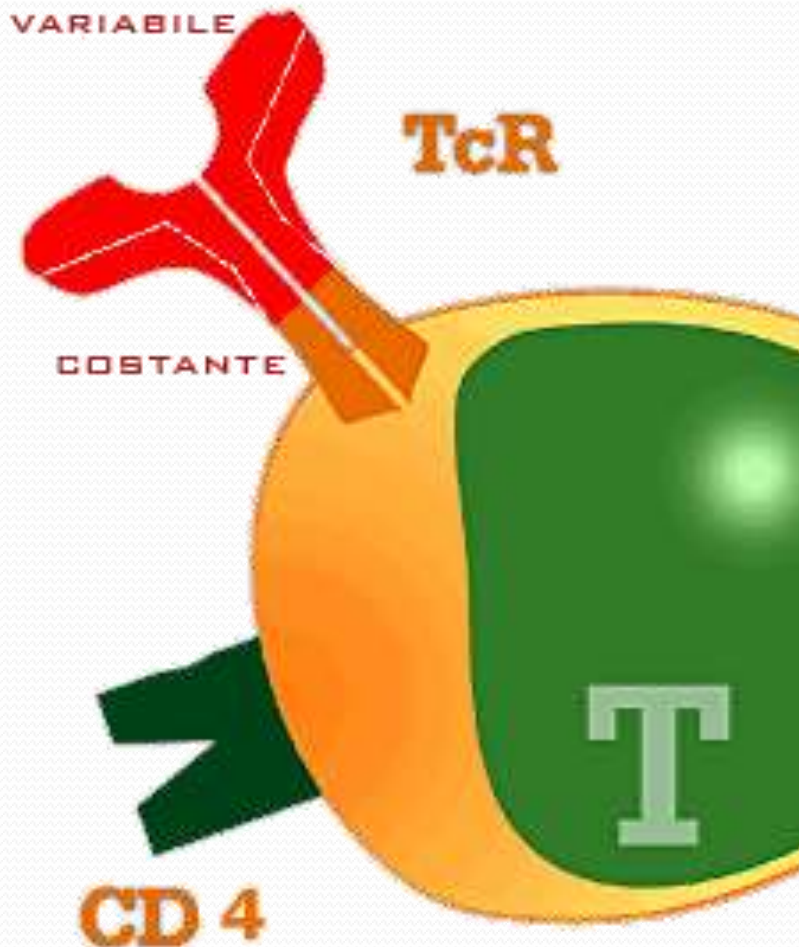
BCR



TCR



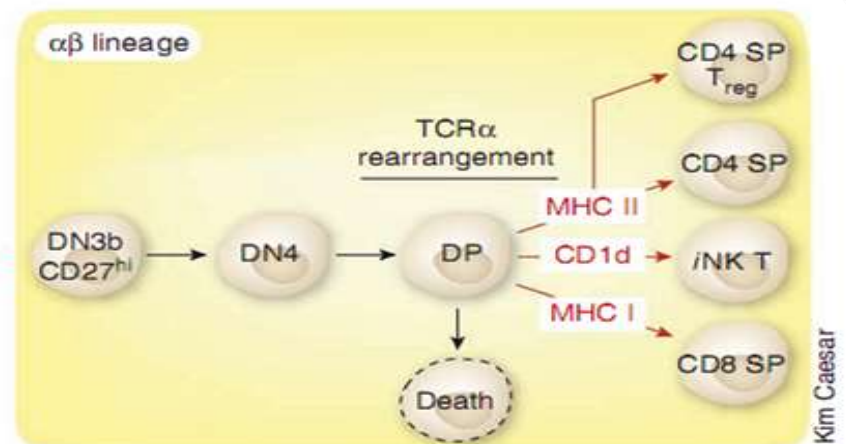
Ontogenia de los linfocitos T



TCR: cadenas α y β
(γ y δ) asociados
con CD3 (γ, δ, ϵ , y $\zeta\zeta$)
Moléculas que
permiten la
comunicación
intracelular

CD4 o CD8

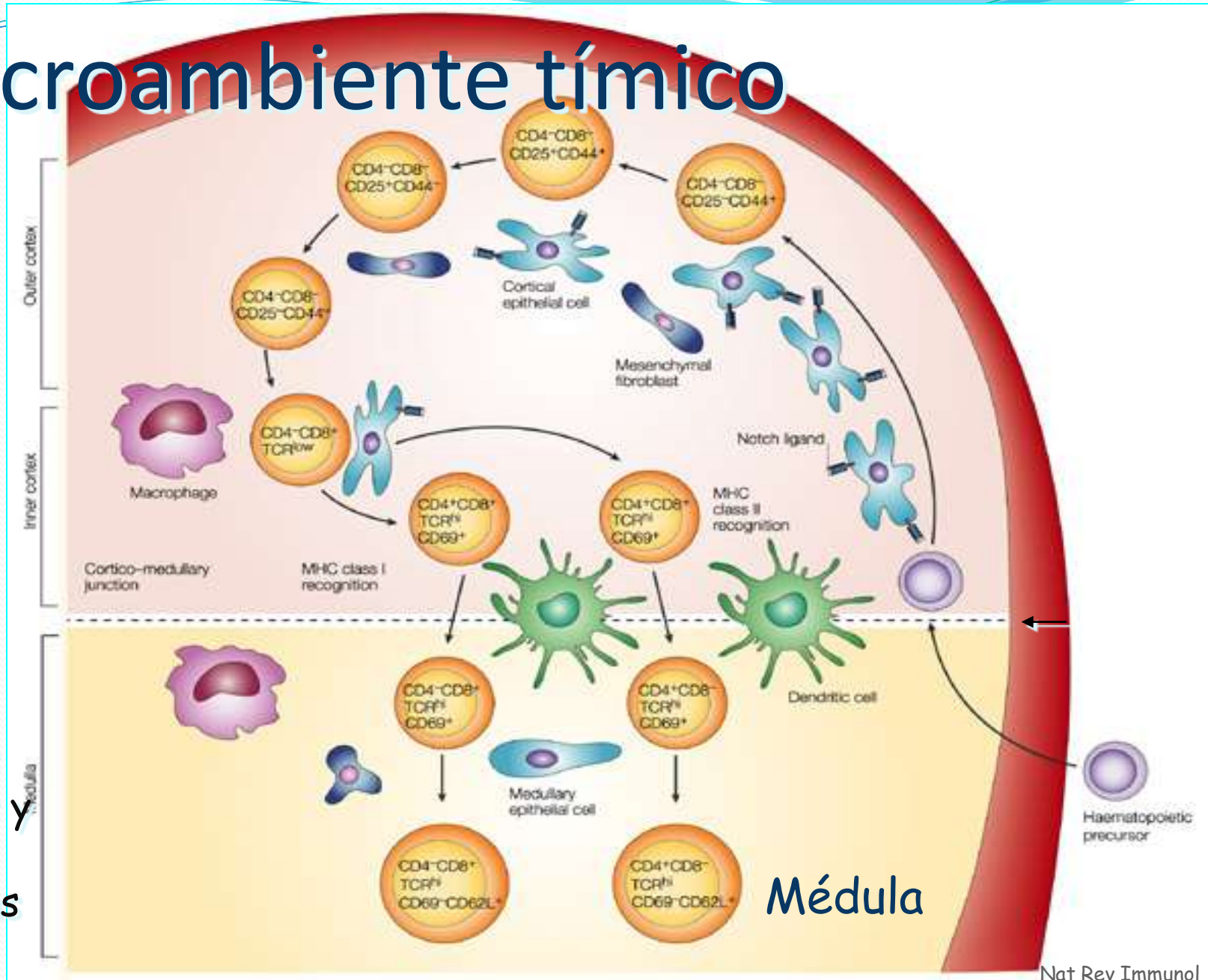
-
- The diagram illustrates the structure of the T-cell receptor (TCR) and CD3 complex. The TCR is composed of two alpha (α) and two beta (β) chains, each with a variable region (V) and a constant region (C). The CD3 complex consists of three epsilon (ε) and three delta (δ) chains, each with a constant region (C) and a variable region (V). The TCR and CD3 complex are associated with an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and a disulfide bond (S-S). The diagram also shows the lineage of T cells, starting from a Hematopoietic Stem Cell (HSC) and differentiating into T cells via the ETP (DN1) stage, which then leads to the DN2a c-Kit^{hi} stage. The T lineage commitment is marked by the expression of TCRβ and TCRγδ. The final stage shown is the DN2b c-Kit^{lo} DN3a CD27^{lo} stage, which undergoes β selection and TCRβ, TCRγδ rearrangement.



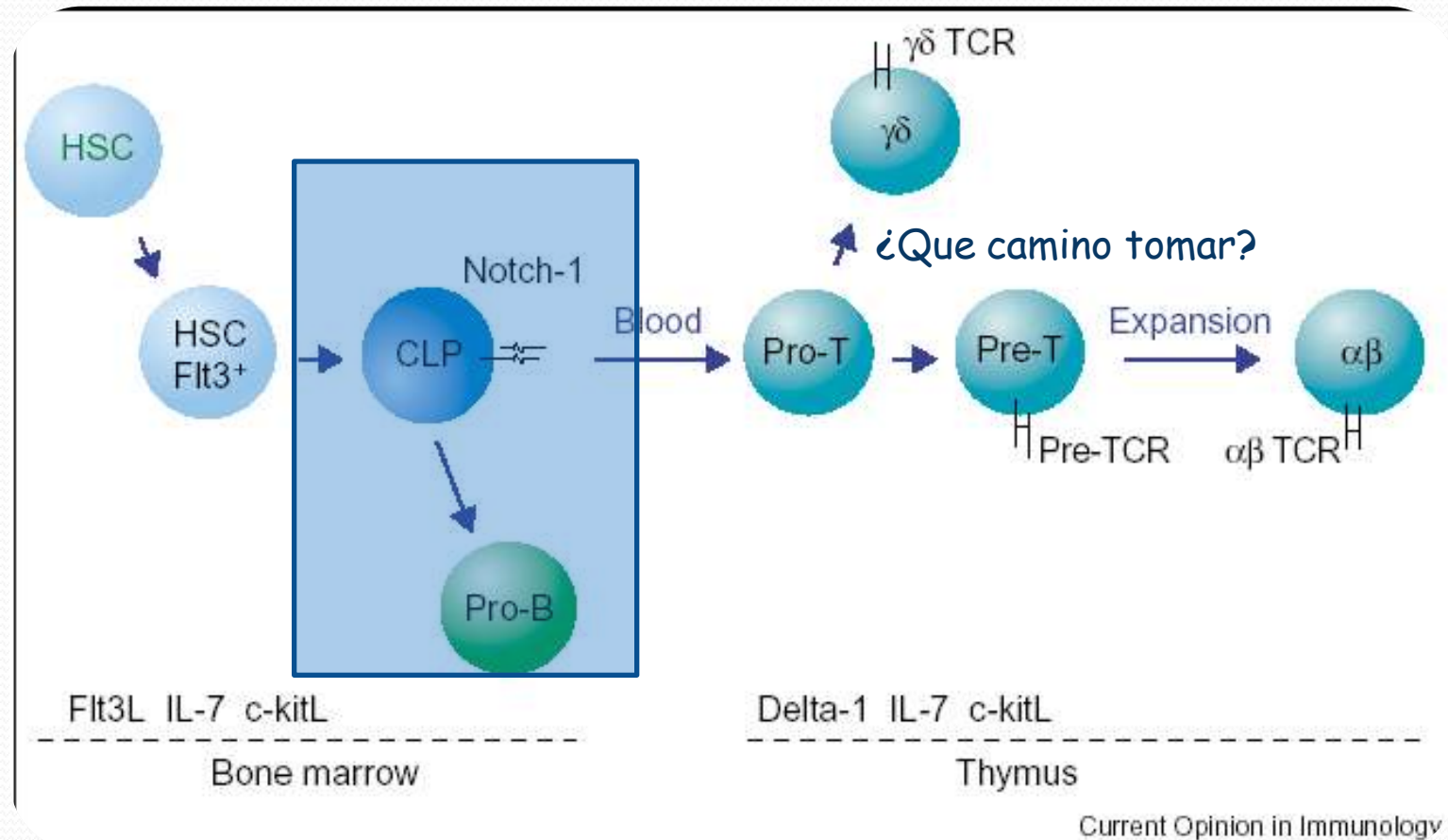
Microambiente tímico

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

Generation

Thymus
IL-7
TCR $\gamma\delta$
Lymphotoxin
Autoantigen

β
selection

Migration

CCR10

CCR9

Homing
and expansion

Skin
CCL27
IL-15
TCR chain - V γ 5⁺
Autoantigen
Integrin α_E (CD103)

Gut
CCL25
IL-7, IL-15
TCR chain - V γ 7⁺
Autoantigen

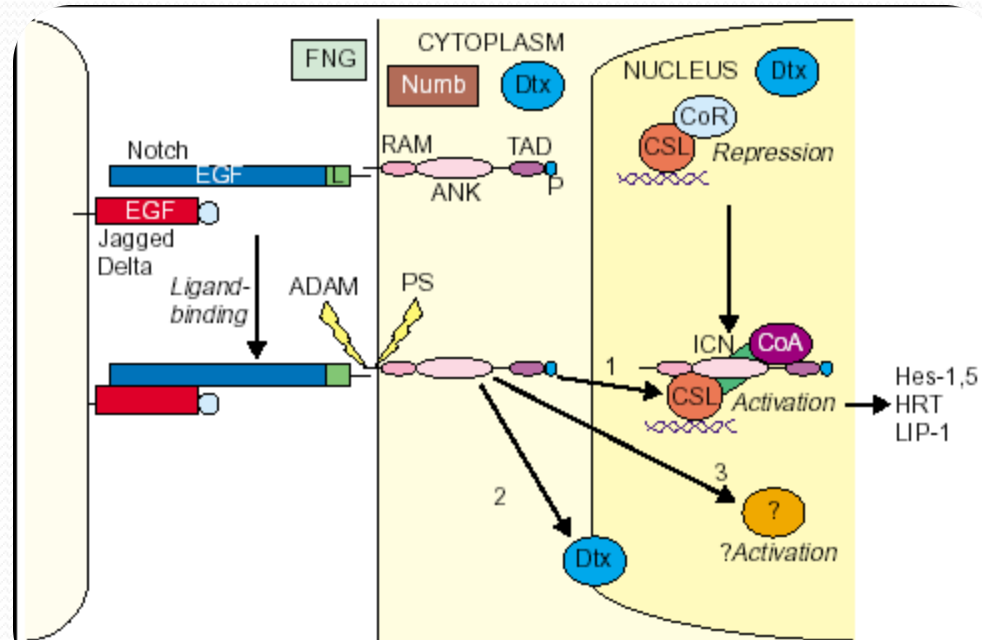
Current Opinion in Immunology

Ontogenia: LINFOCITOS T

Papel de Notch

- Ligando de Notch, DELTA-1/4 es expresado en la unión córtico-medular
 - Favorece desarrollo de $T\alpha\beta$ sobre $\gamma\delta$
 - Noth en conjunto con el preTCR favorecen el paso de DN₃ a DP
 - Participa además en la selección del linaje CD₄/CD8

- Notch bloquea EA2/Pax5 (importante en la inducción del desarrollo de linf B)
- Media ensamblaje del pre-TCR y Sinergiza con él, en la selección de linfocitos TCR β



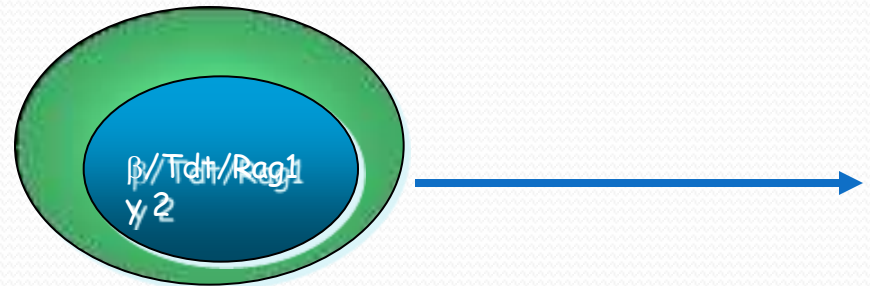
Ontogenia de Linfocitos T

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*

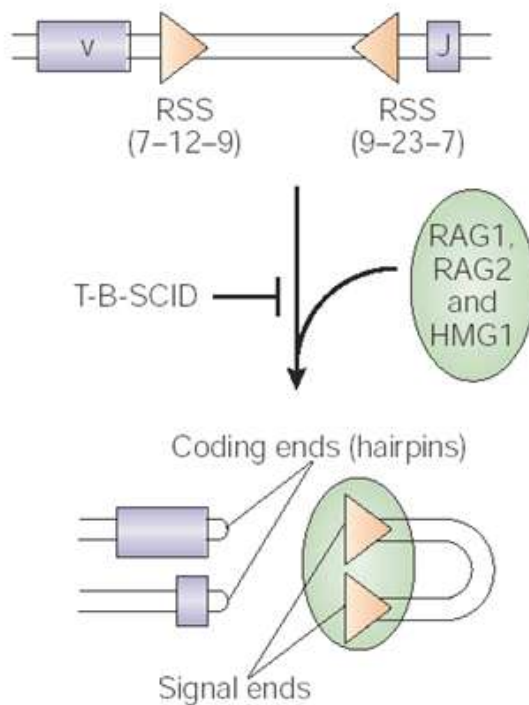
Región constante

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:

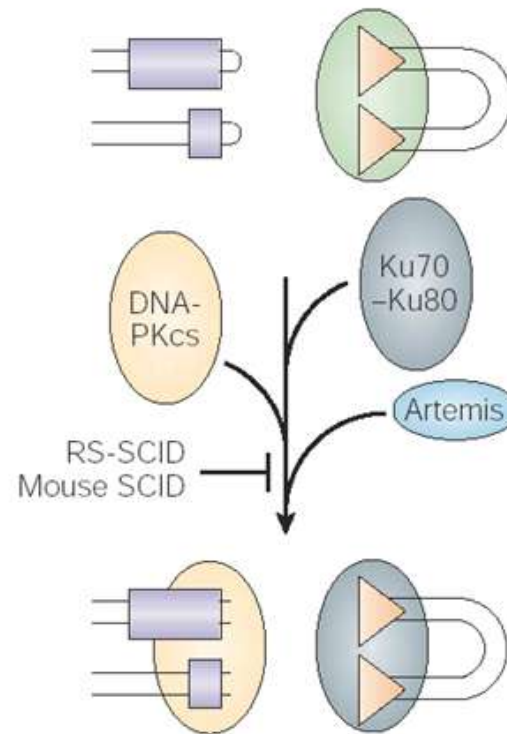
REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

a Initiation



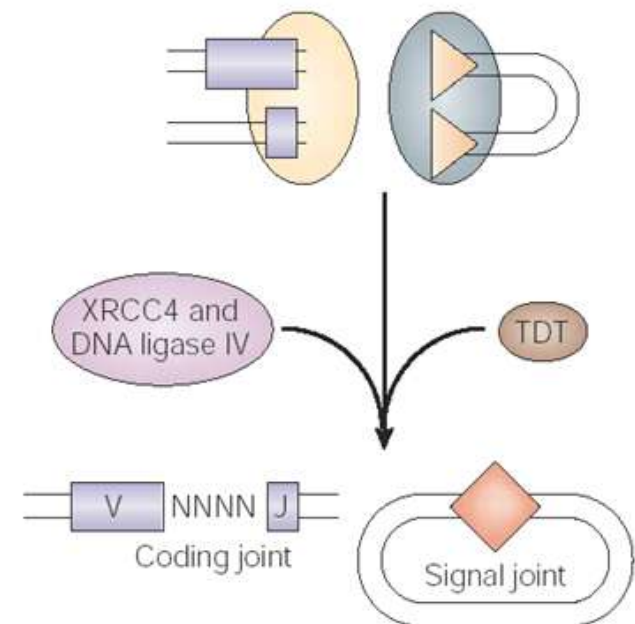
Lymphoid specific

b DNA-damage recognition and hairpin opening



Ubiquitous DNA-repair machinery
(non-homologous end joining)

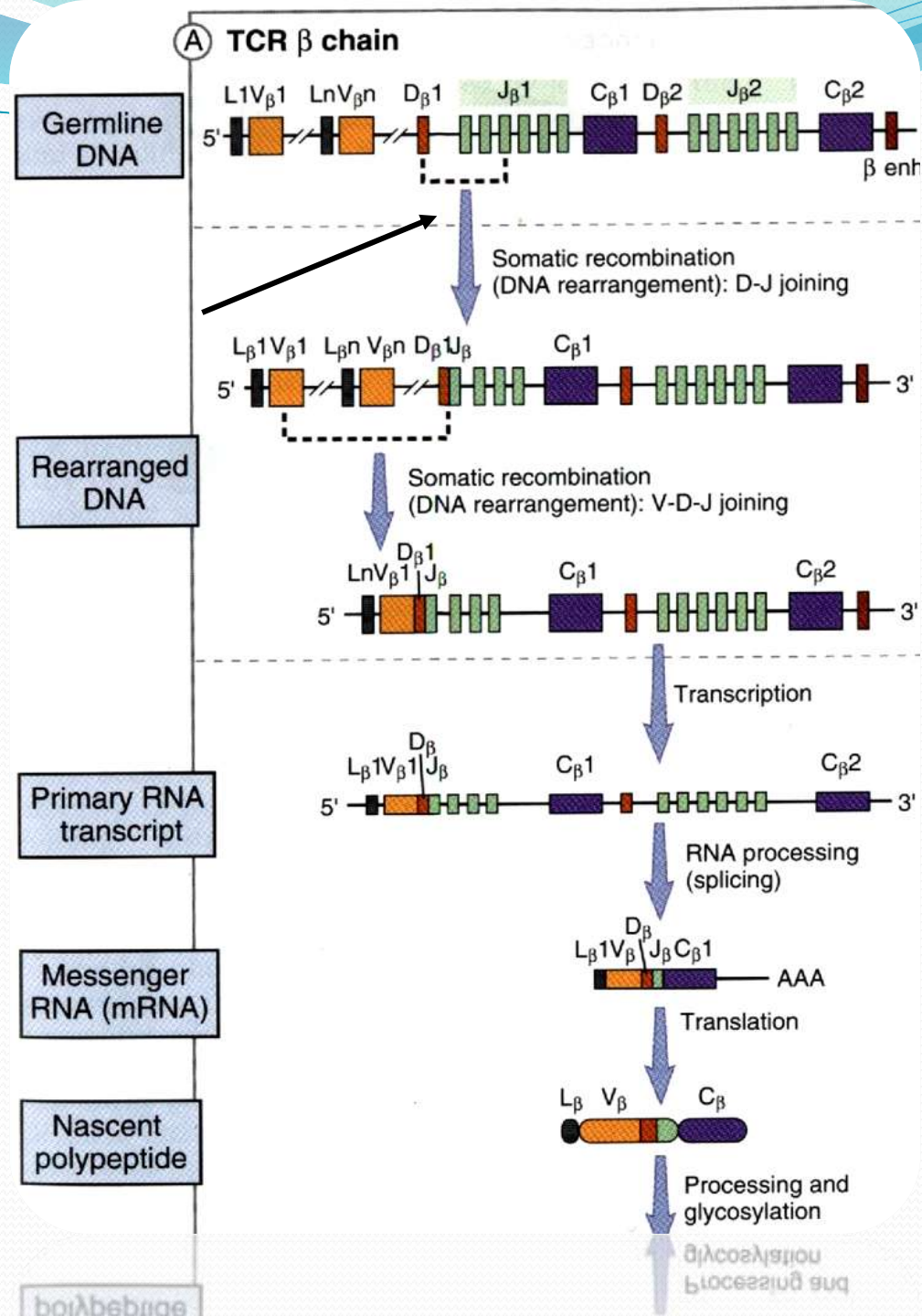
c DNA repair



Reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β

Dos alelos:

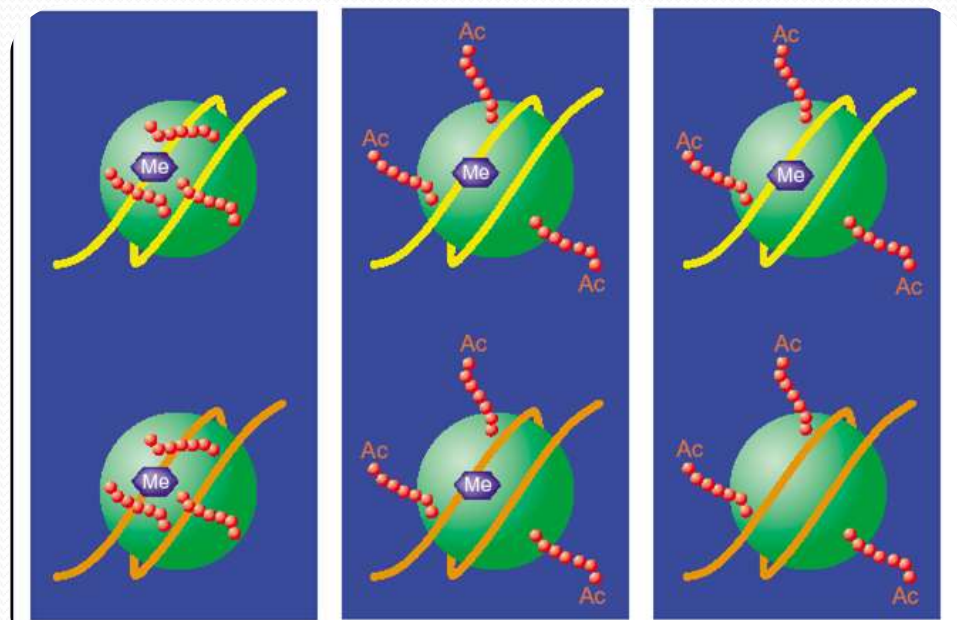
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: **EXCLUSIÓN ALÉLICA**



Ontogenia: REORDENAMIENTO DEL TCR Y BCR

Modificaciones de las histonas

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



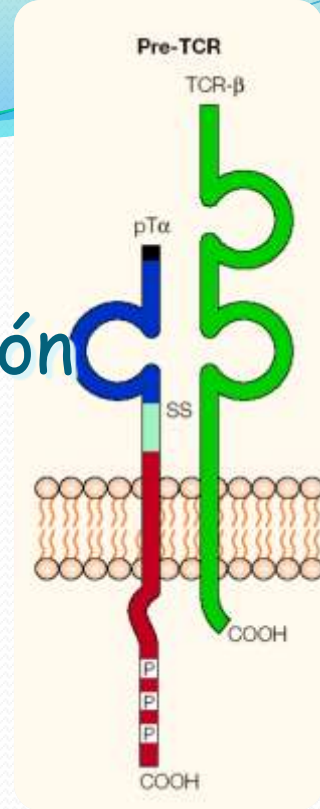
Current Opinion in Immunology

Current Opinion in Immunology

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-)



1er alelo

1 2 3 4 5 6 n

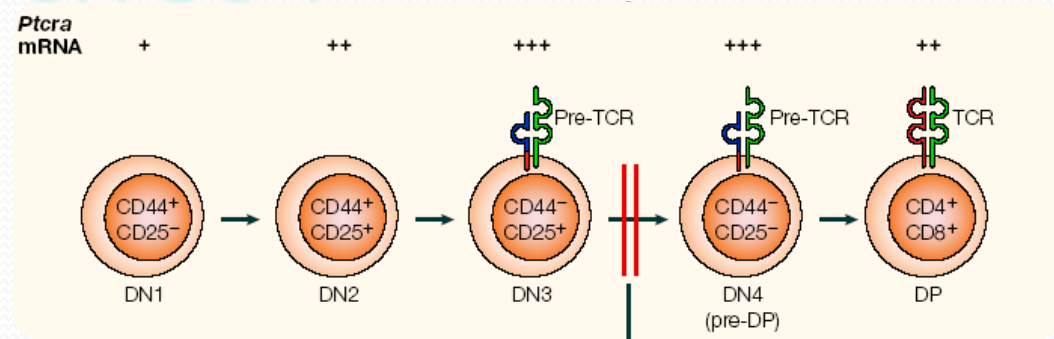
1 2 3 4 n



Región variable, diversidad y unión

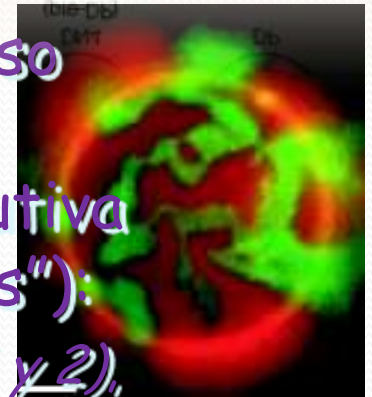
Región constante

Ontogenia: LINFOCITOS T



preTCR:

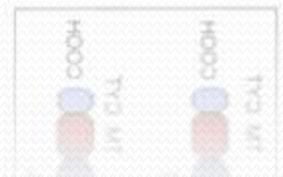
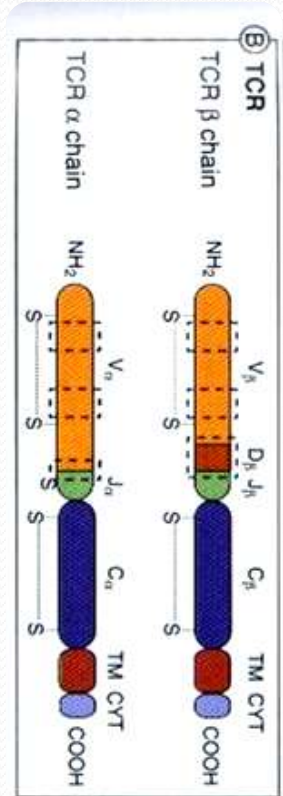
- Es expresado seguido al reordenamiento exitoso de TCR β .
- Media señales debido a su localización constitutiva en microdominios de membrana ("rafts lipídicos"):
 - Fosforilación y degradación de recombinasas (*RAG1 y 2*), asegura que no ocurra mas reordenamiento de β (*exclusión alélica*)
 - Favorece reordenamiento de la cadena α
 - Proliferación y da paso a timocitos Doble Positivos (co-expresión de CD4 y CD8)



Ontogenia de linfocitos

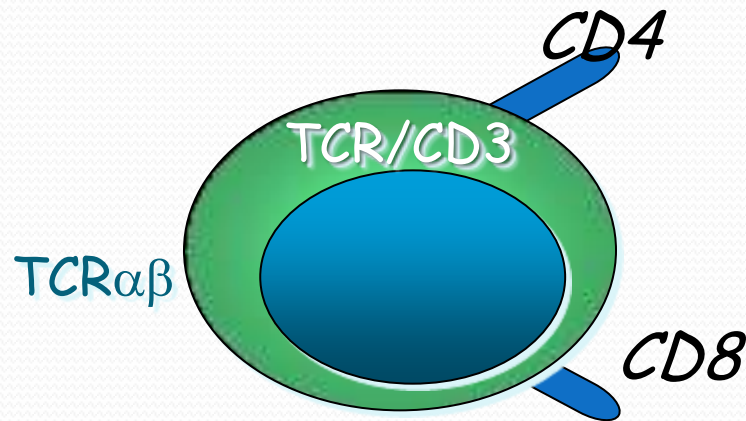
- Resumen

- 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

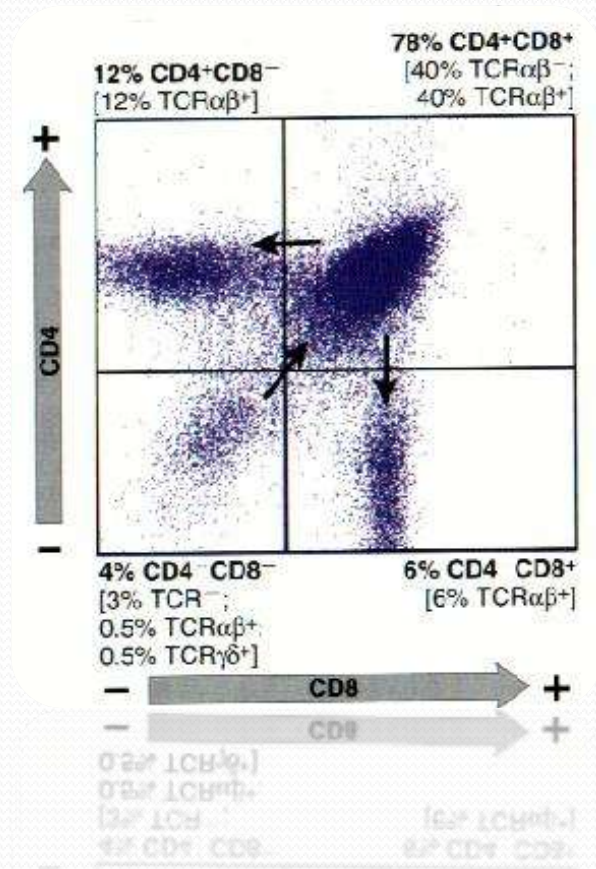


Ontogenia de Linfocitos T

Timocito doble positivo (DP):

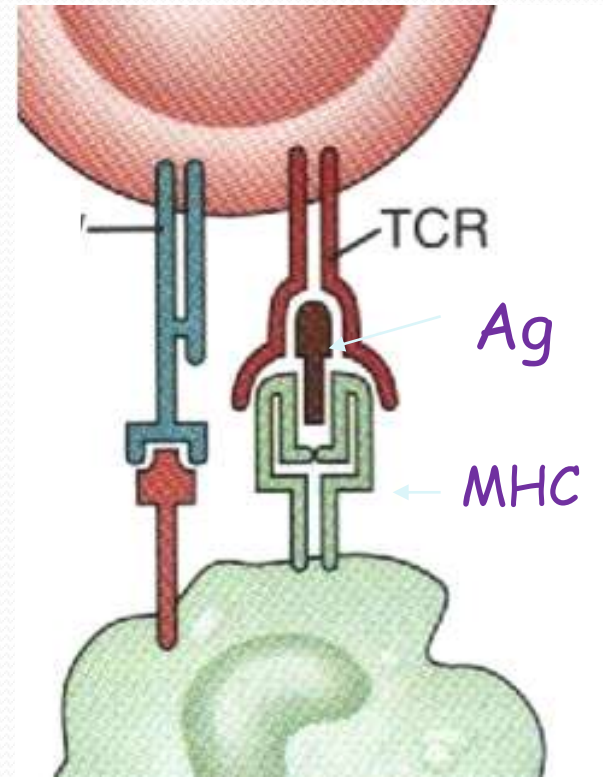


Expresan TCR y además CD4 y CD8 (Doble Positivas) en la superficie: da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa y se define el fenotipo

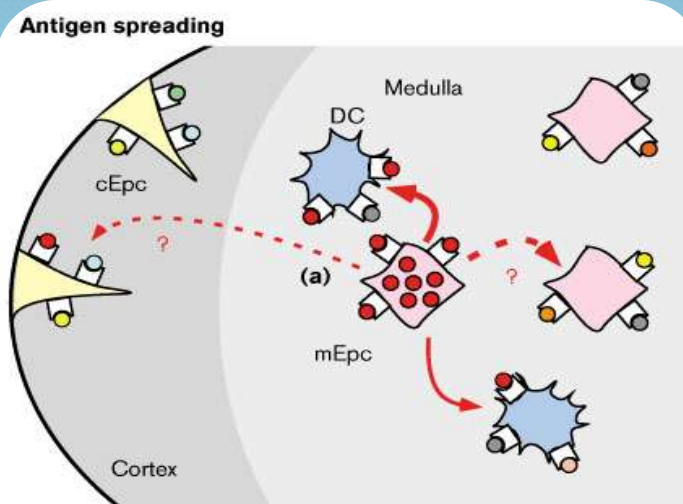


Ontogenia de Linfocitos T

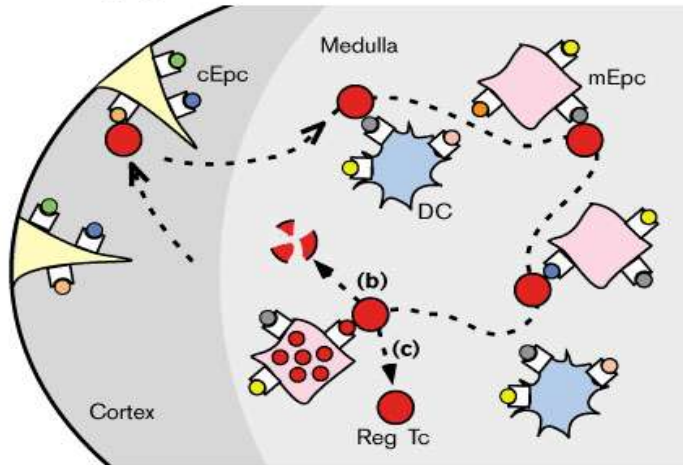
Control de calidad:
Capaz de interactuar con MHC propia (base de toda respuesta inmune) y de esta manera reconoce los antígenos presentados



Ontogenia de linfocitos T: CÉLULAS DEL ESTROMA TÍMICO

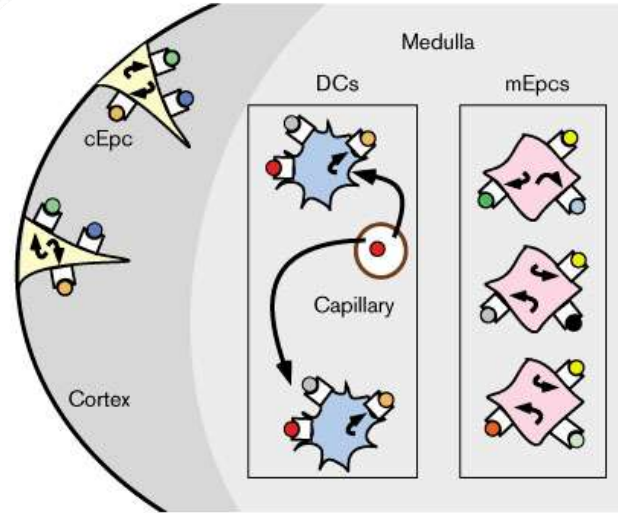


Scanning by T cells



Current Opinion in Immunology

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



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

• 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

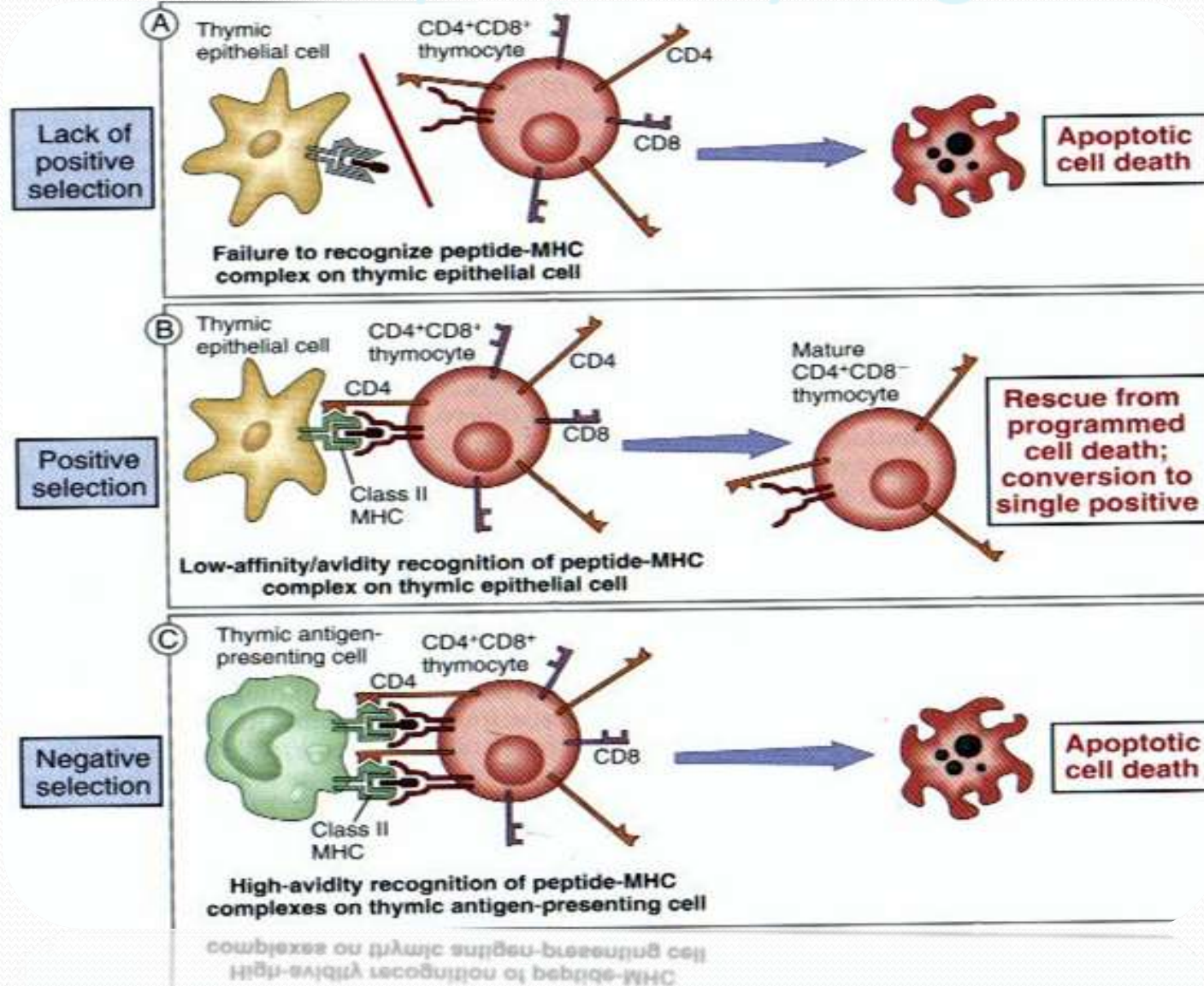
Macroautofagia

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:

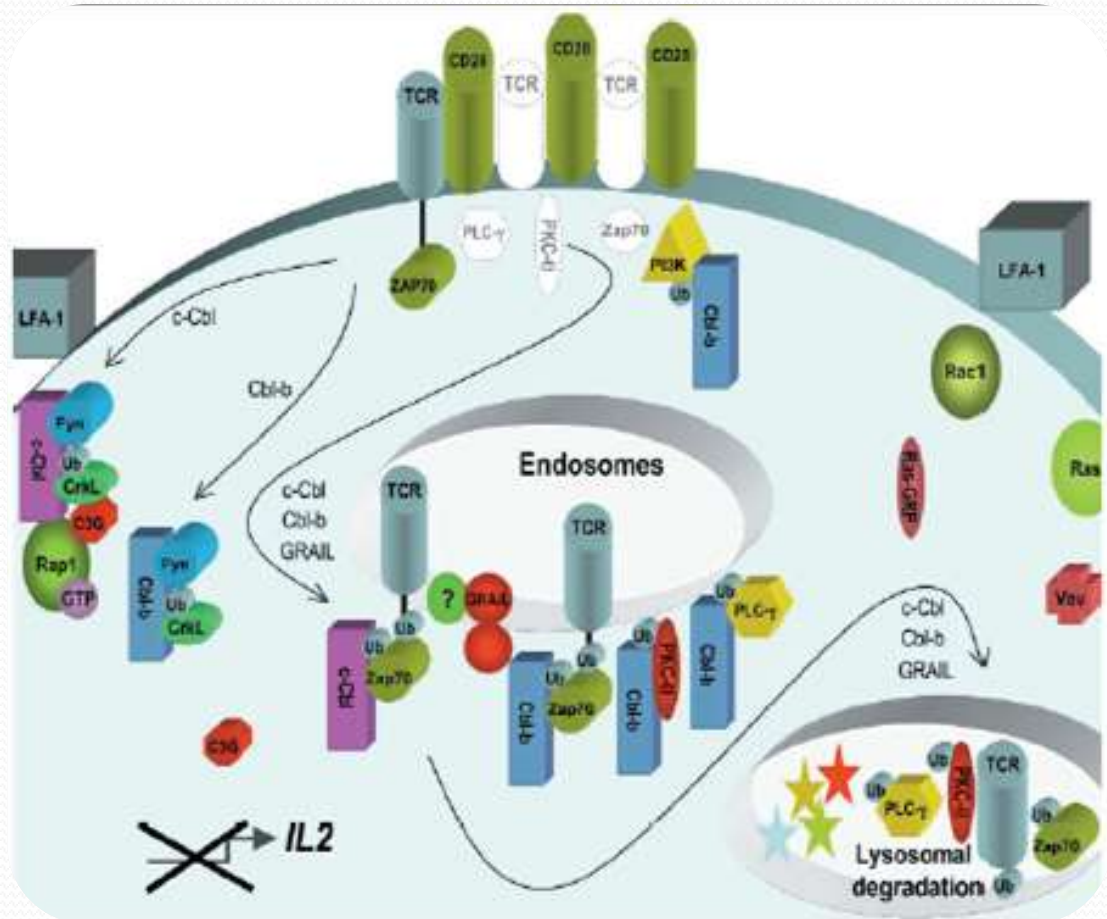
Selección positiva y negativa



Muerte o
anergia

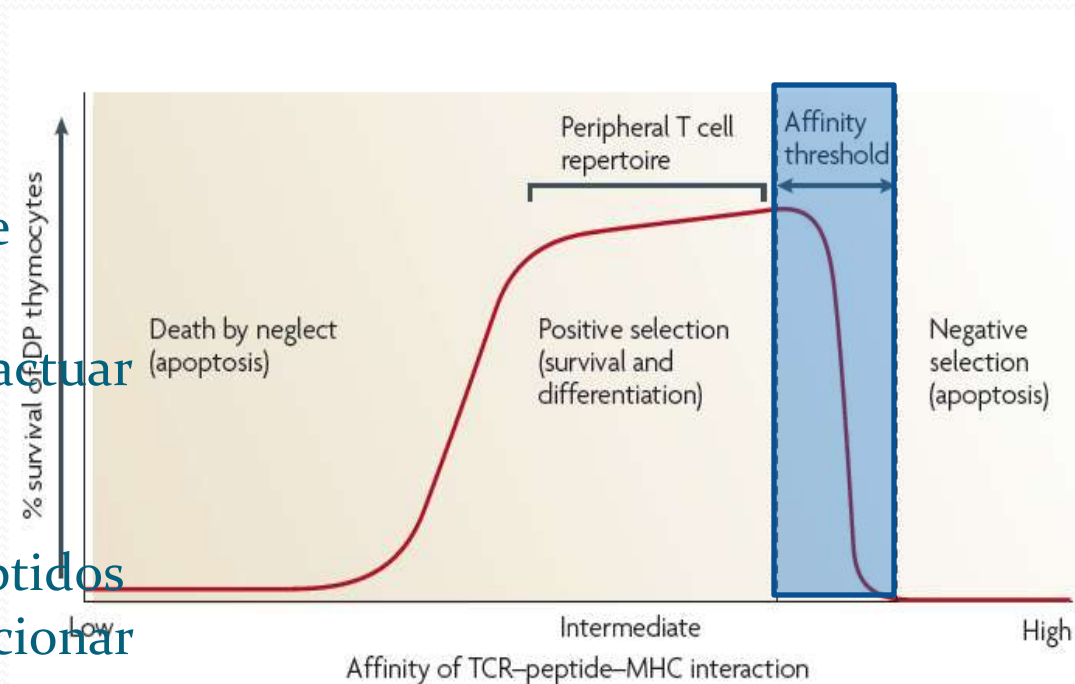
Ontogenia: MECANISMOS DE SELECCIÓN

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



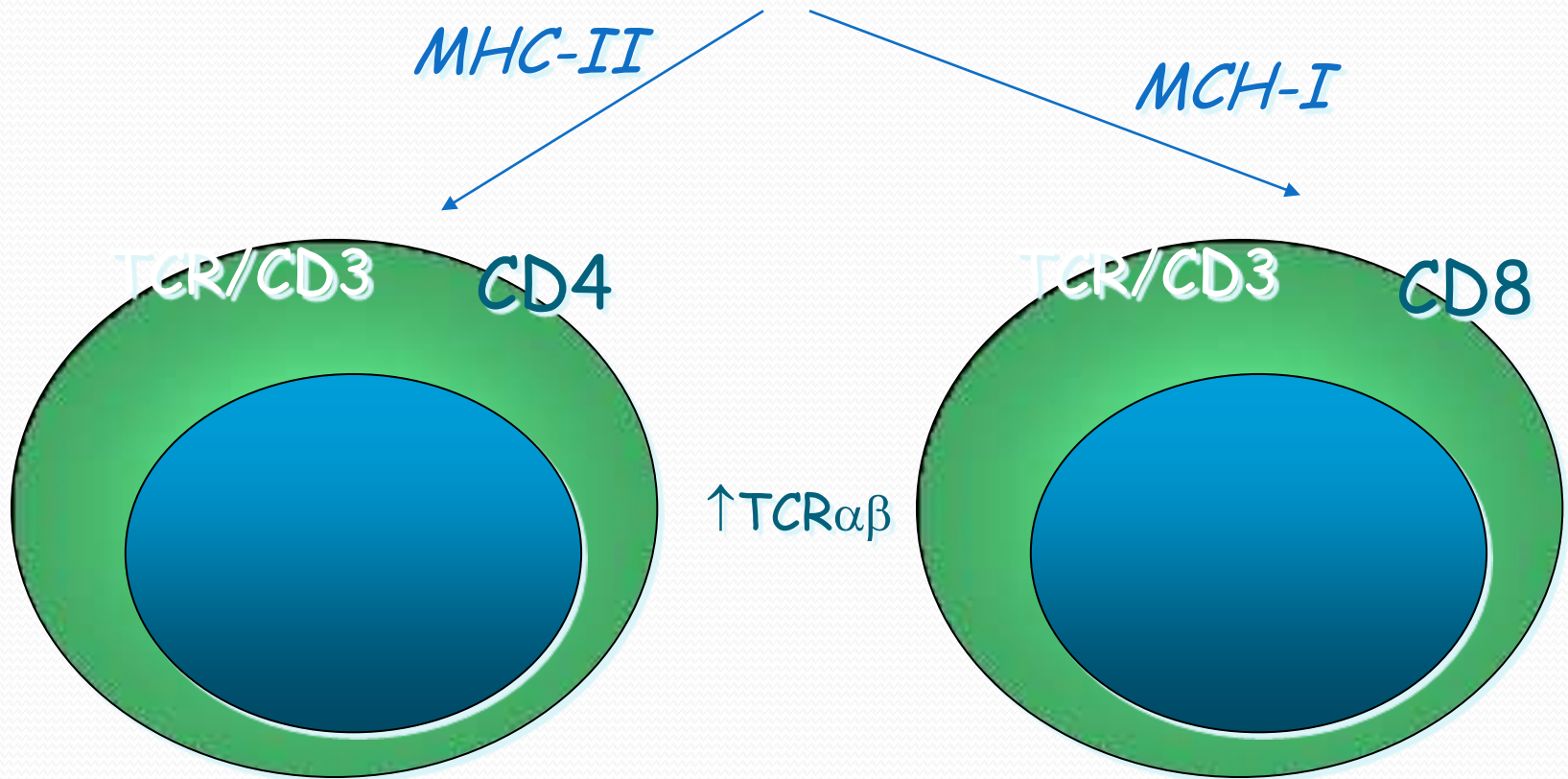
Ontogenia de linfocitos T

- Sobreviven:
 - TCR con moderada afinidad/avidez por el Ag sobreviven
 - Bajas concentraciones de ligandos de alta afinidad
 - Timocitos capaces de interactuar con MHC
 - Un TCR particular es seleccionado por varios péptidos (1 solo péptido puede seleccionar varios TCRs y viceversa)



Ontogenia de Linfocitos T

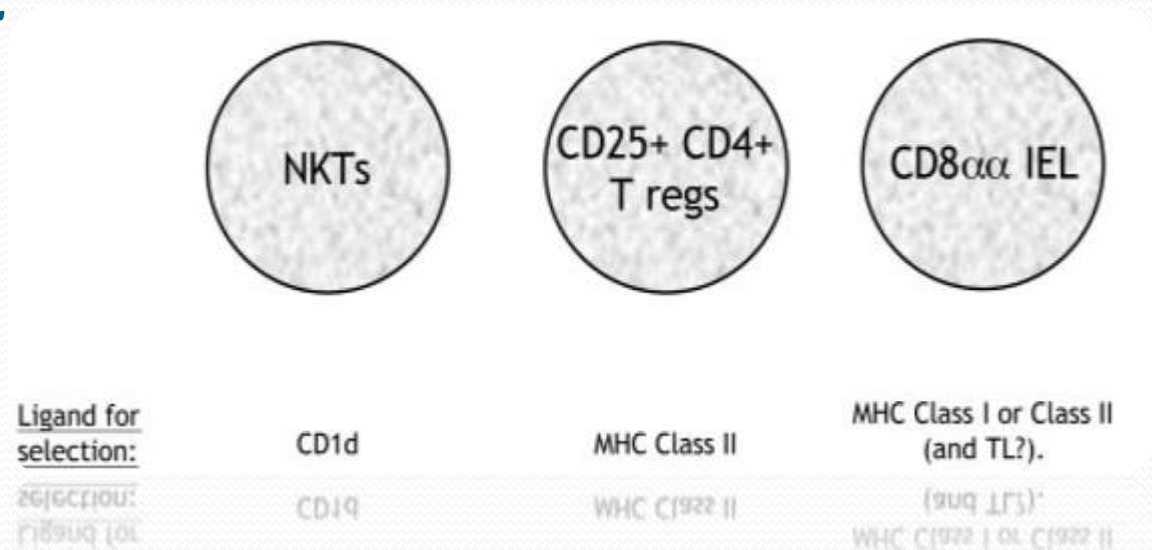
Linfocito T maduro:

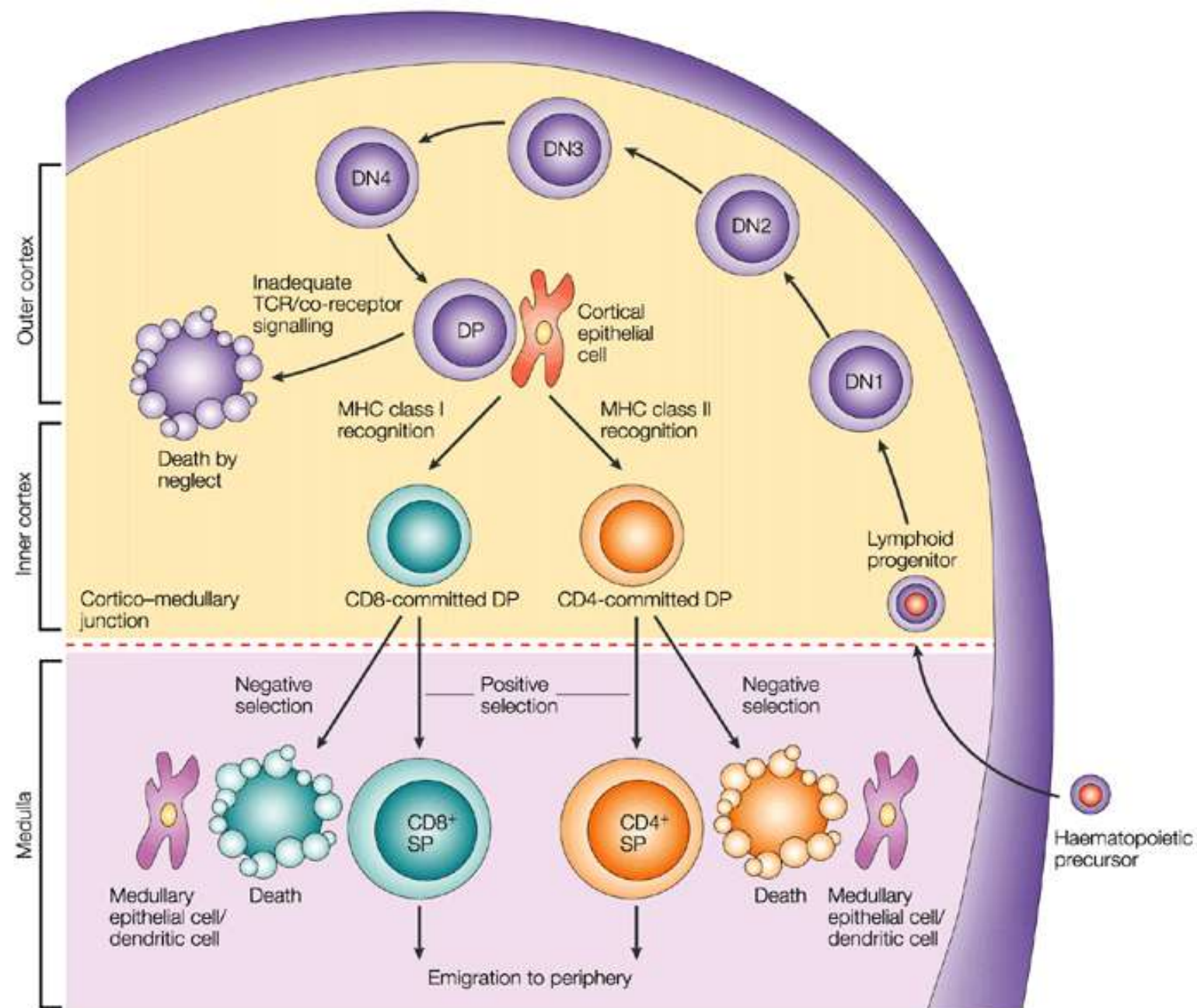


Ontogenia de linfocitos: DESARROLLO DE CÉLULAS T REGULADORAS

- Selección positiva por agonista

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

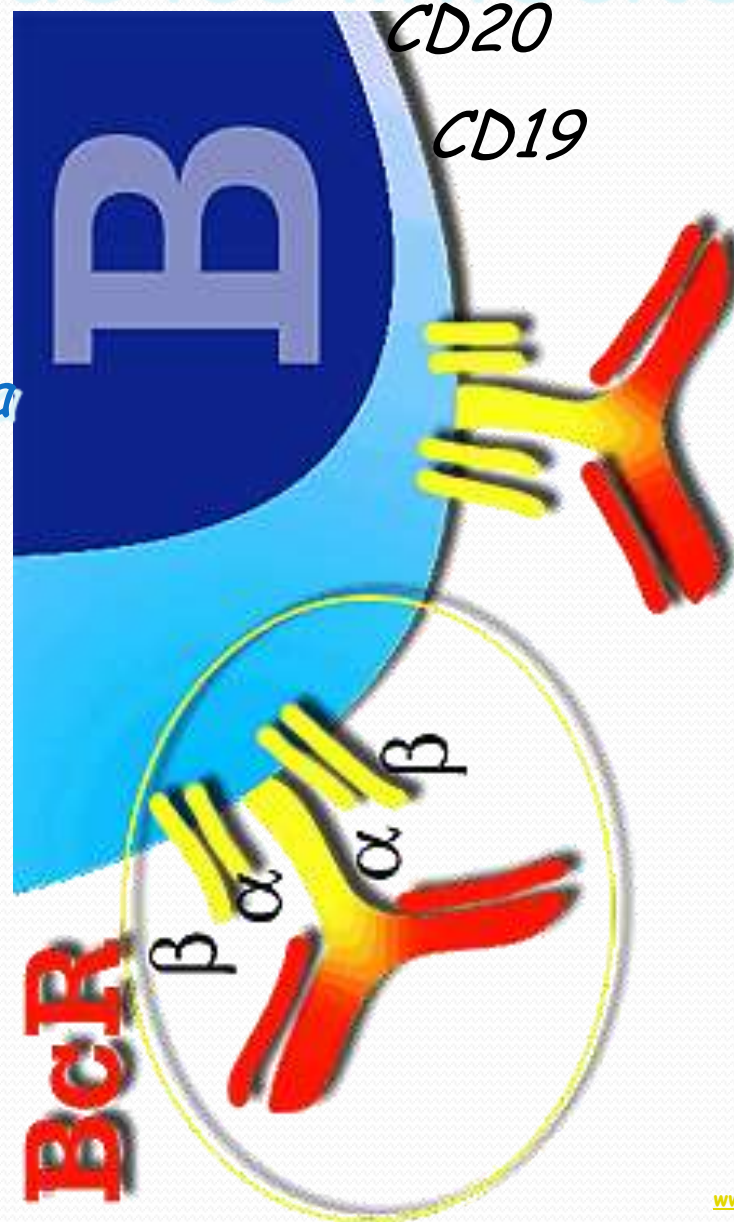




Ontogenia de los linfocitos B

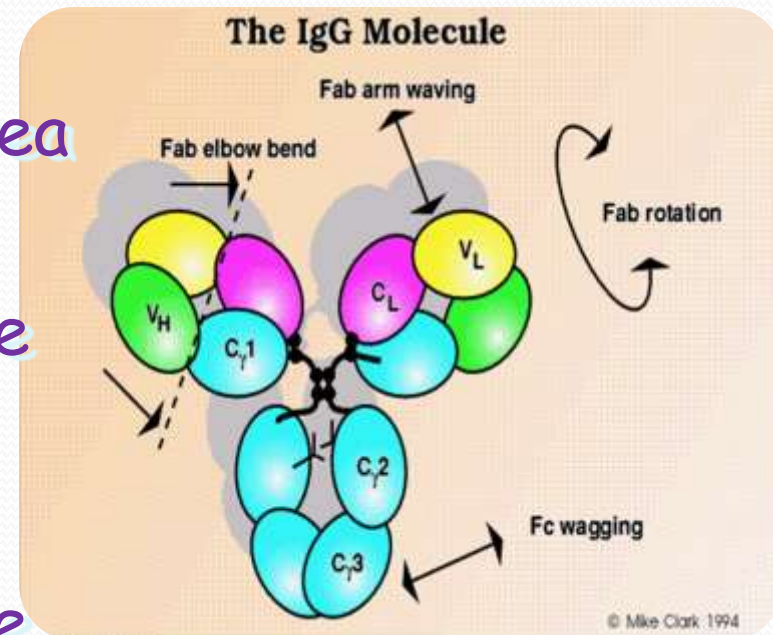
BCR:

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

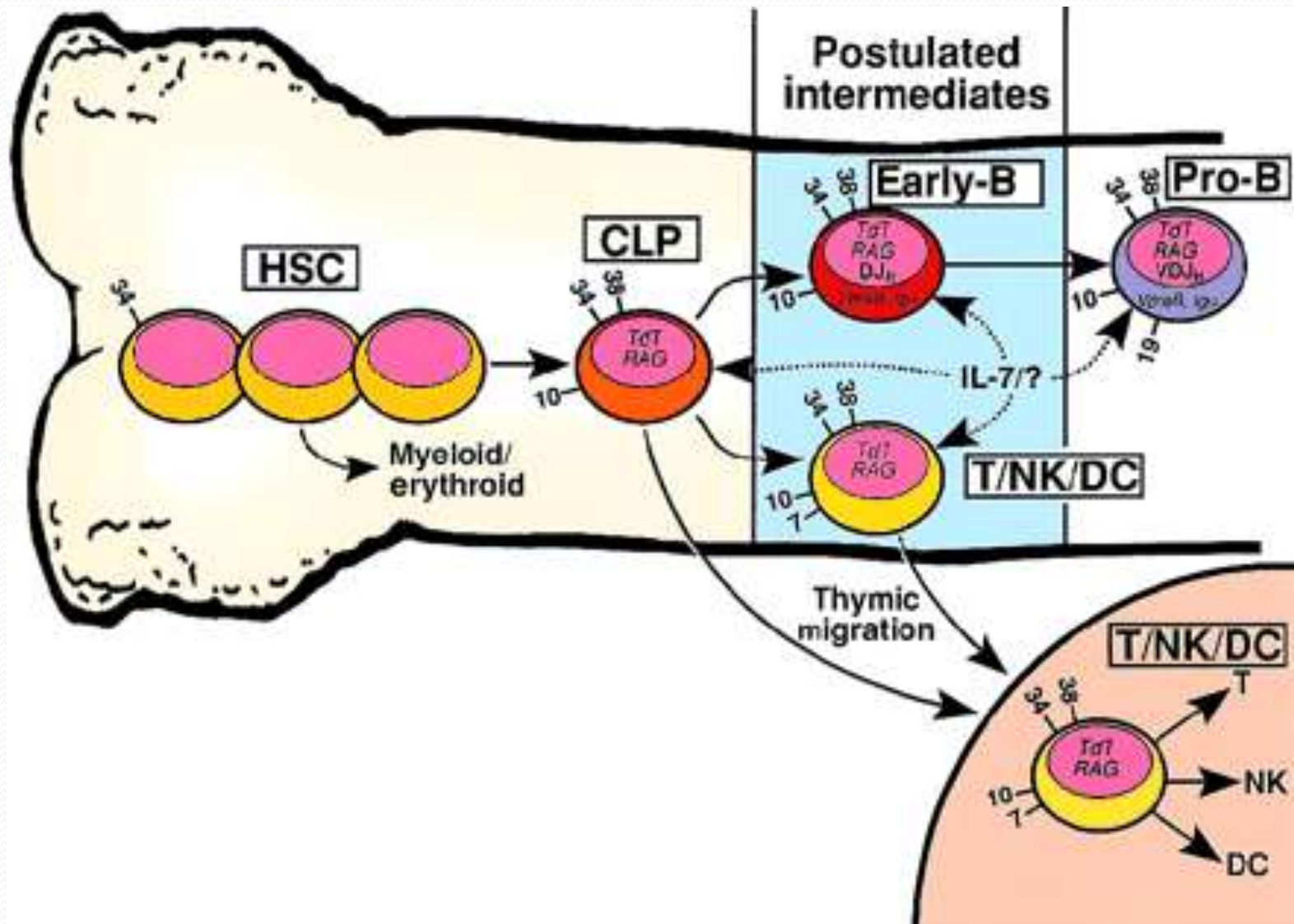


Ontogenia de linfocitos B

- 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



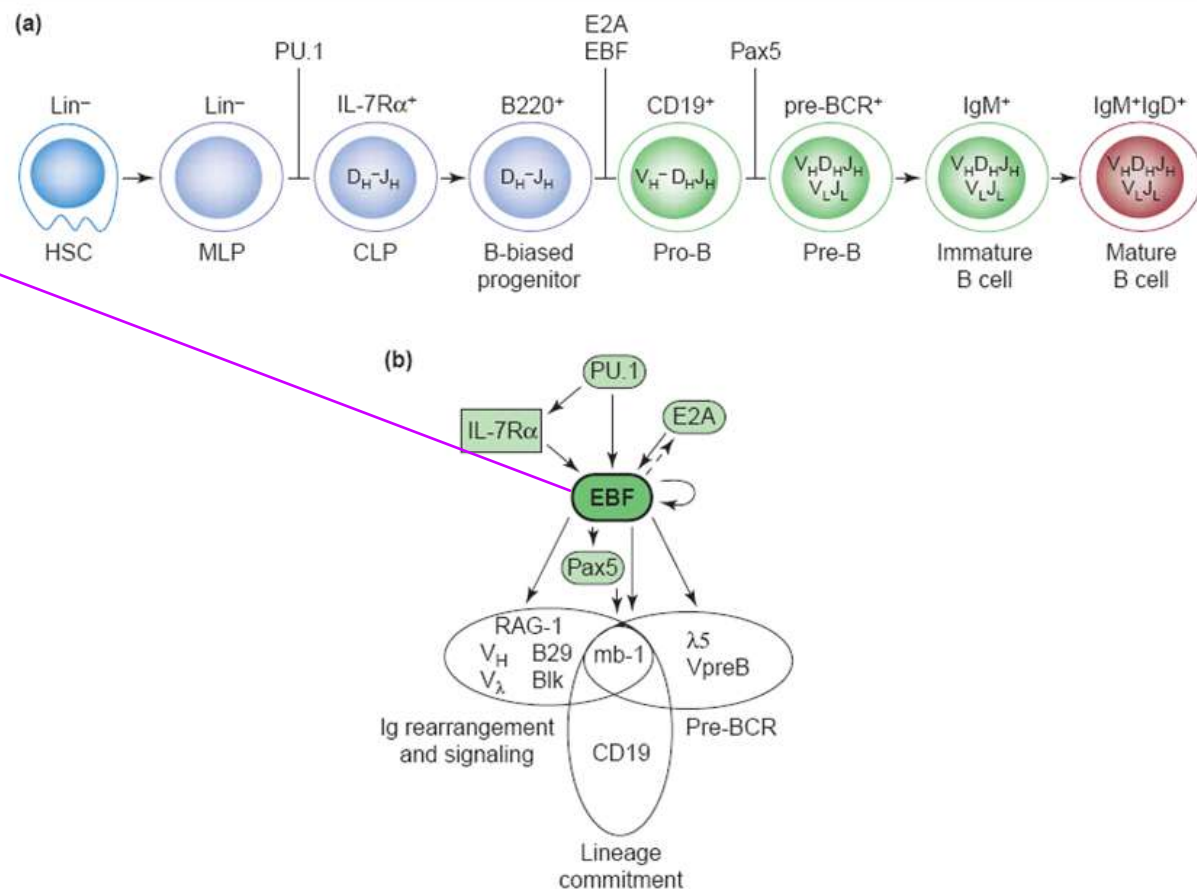
Ontogenia: LINFOCITOS B

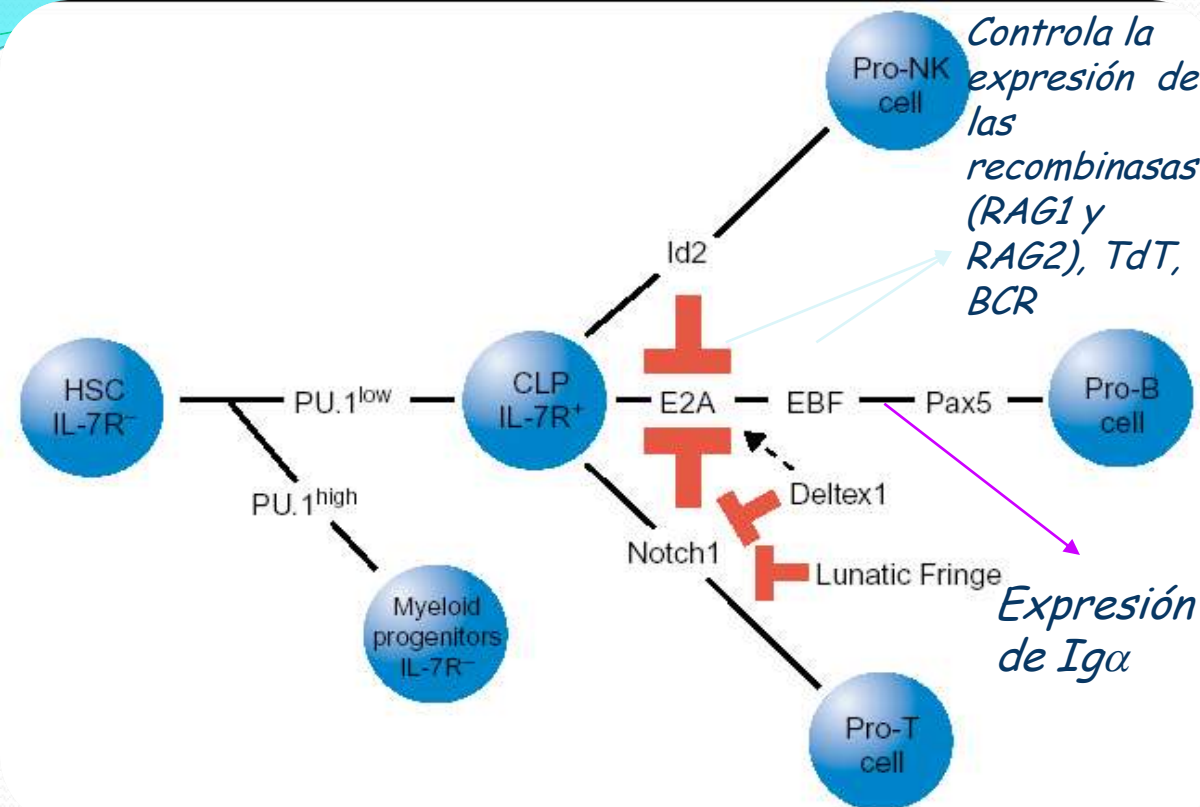


Ontogenia de linfocitos B

Regula el acceso de la maquinaria de recombinación del DNA

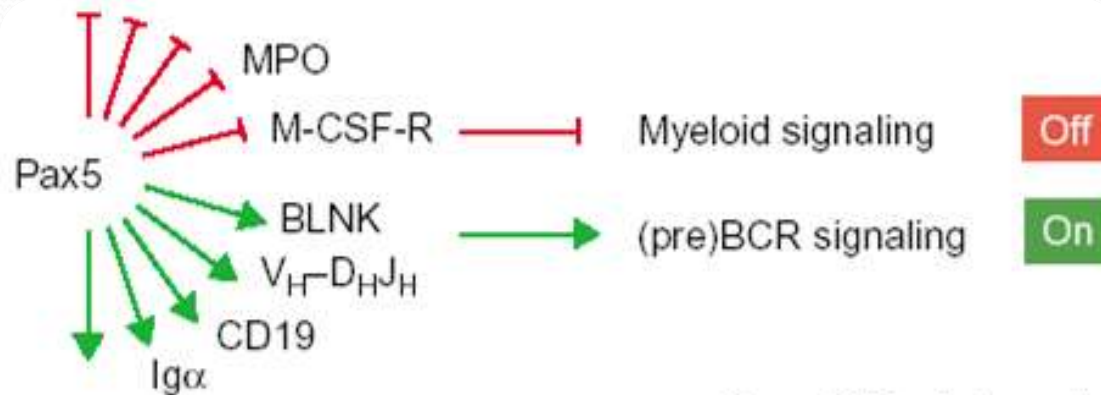
IKAROS, contribuye accesibilidad a la cromatina y en la identidad de linfocitos B





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

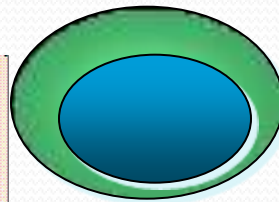
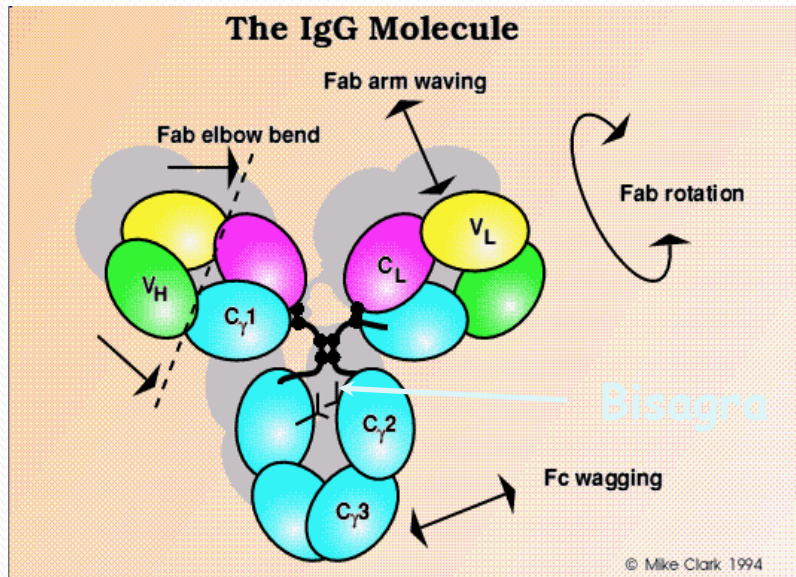
- Ratones *Pax5*^{-/-} se arresta el desarrollo de los linfocito B (pro-B)
- Suprime expresión de M-CSFR y Notch-1
- Media expresión de CD19
- Requerido para el reordenamiento IgH
- De los 32 genes inducidos por Pax5, 15 son exclusivos de Linfocito B



Ontogenia de Linfocitos B

pro-B:

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

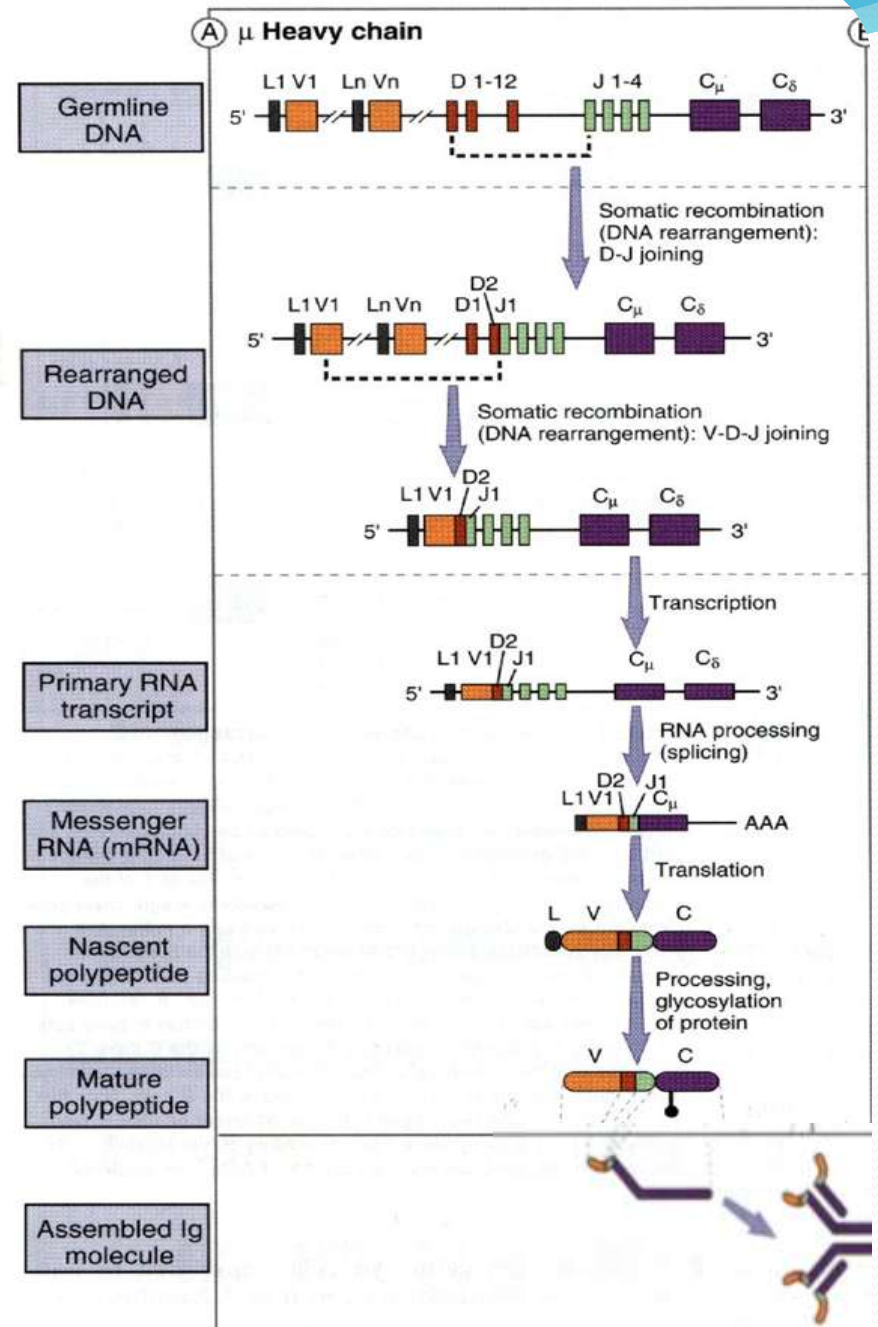


IL-7R
IL-3R

Reordenamiento de los genes que codifican para las inmunoglobulinas

Dos alelos:

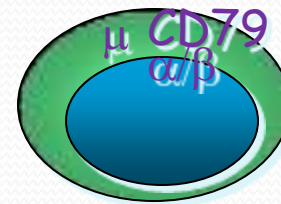
el reordenamiento exitoso de uno de ellos inhibe el reordenamiento del otro: EXCLUSIÓN ALÉLICA



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:

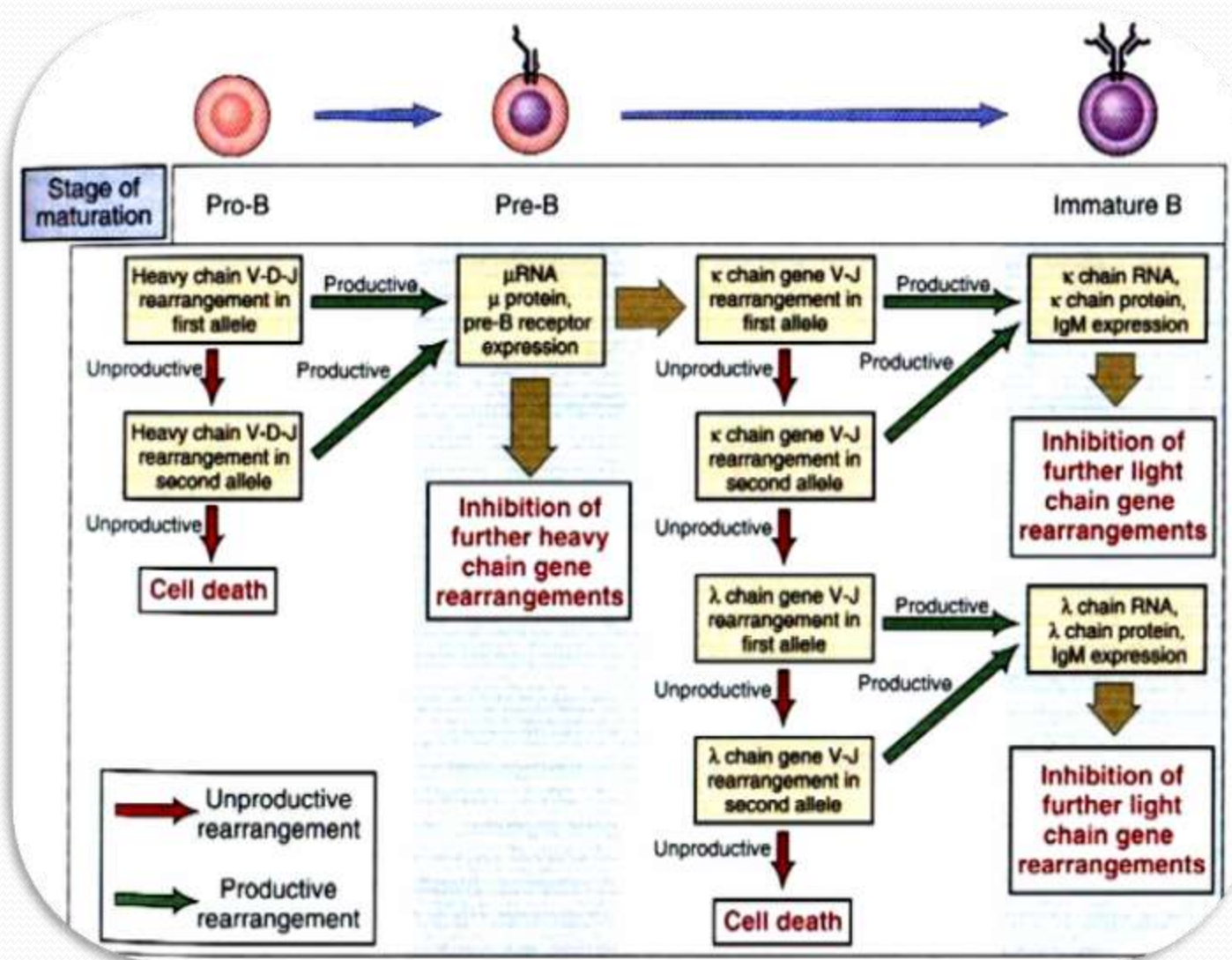


Linfocito B IgM/IgD maduro:



Ontogenia de Linfocitos B

- Cadena pesada μ
- Cadenas liviana:
 - κ
 - λ



Ontogenia:

LINFOCITOS, mecanismos de selección

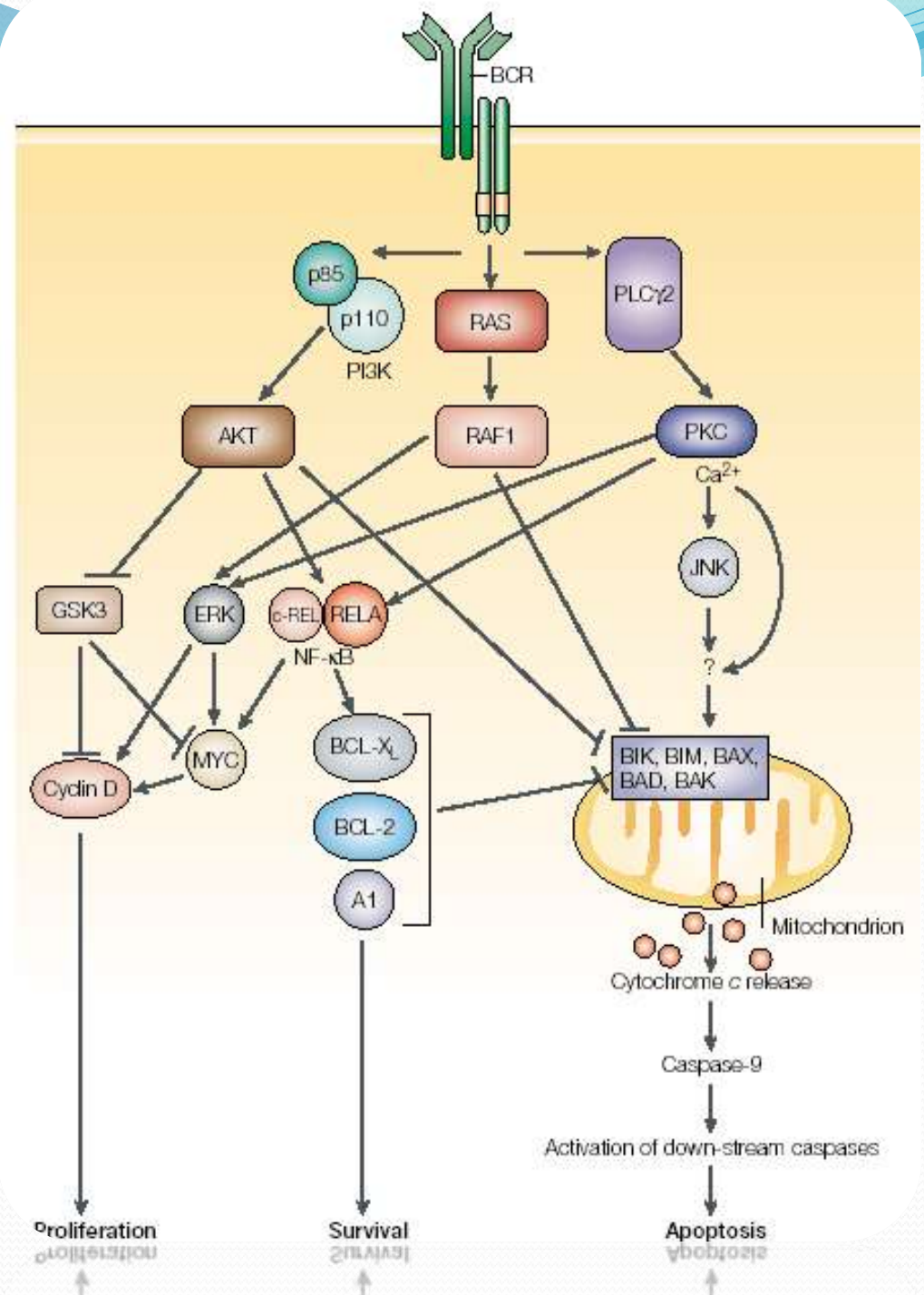
Selección positiva

Selección negativa:

- Muerte
- Anergia
- Re-edición del BCR

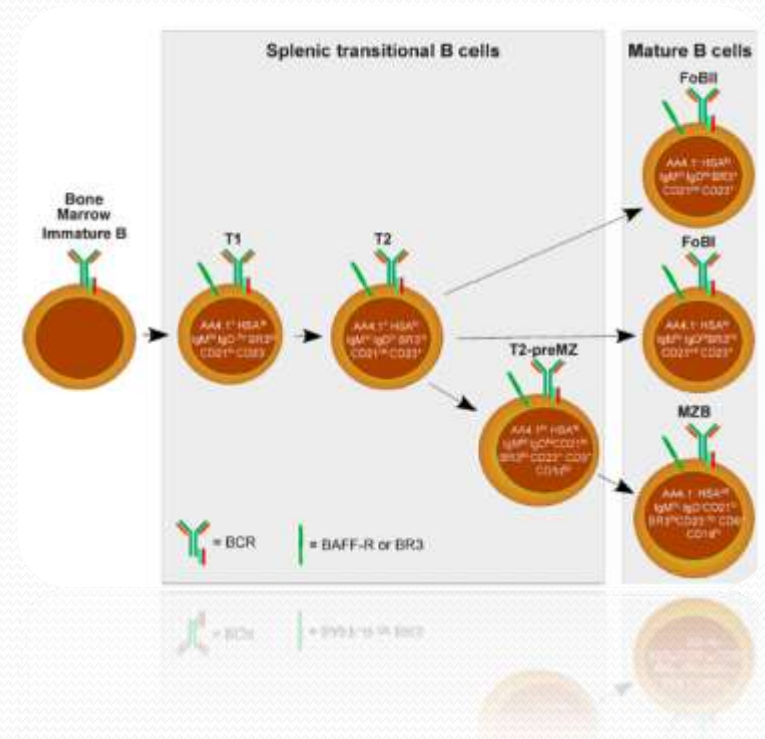
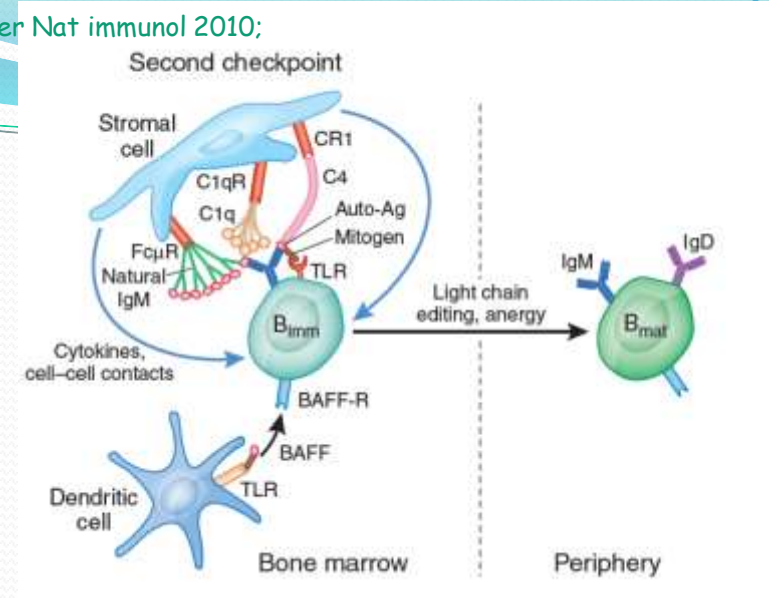
Escape de la selección negativa por cambio de la especificidad antigénica

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



Ontogenia: LINFOCITO B

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



T2 se hace mas resistente a la apoptosis

Ontogenia: LINFOCITO B

○ Tres poblaciones:

• Folicular (B-2):

- Se ubican folículos linfoides y una porción en MO

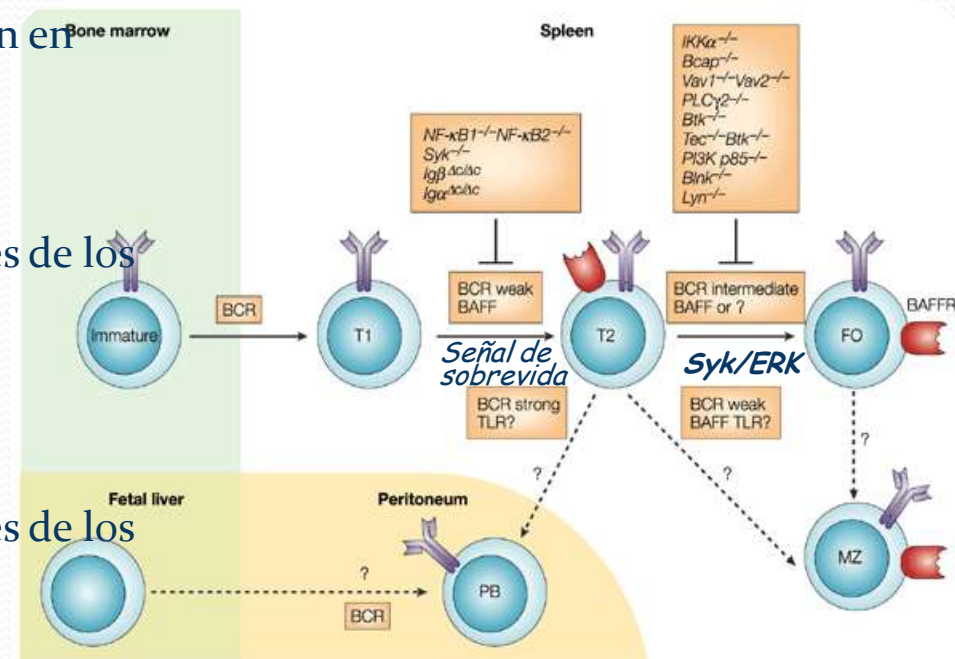
- T-dependiente

○ Zona Marginal (B-1b?)

- Depende de la activación mediada a través de los receptores Toll?
- Considerada de la inmunidad innata

○ Peritoneal (B-1a)

- Señales fuerte del BCR
- Depende de la activación mediada a través de los receptores Toll
- Fenotipo de células anérgicas



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.

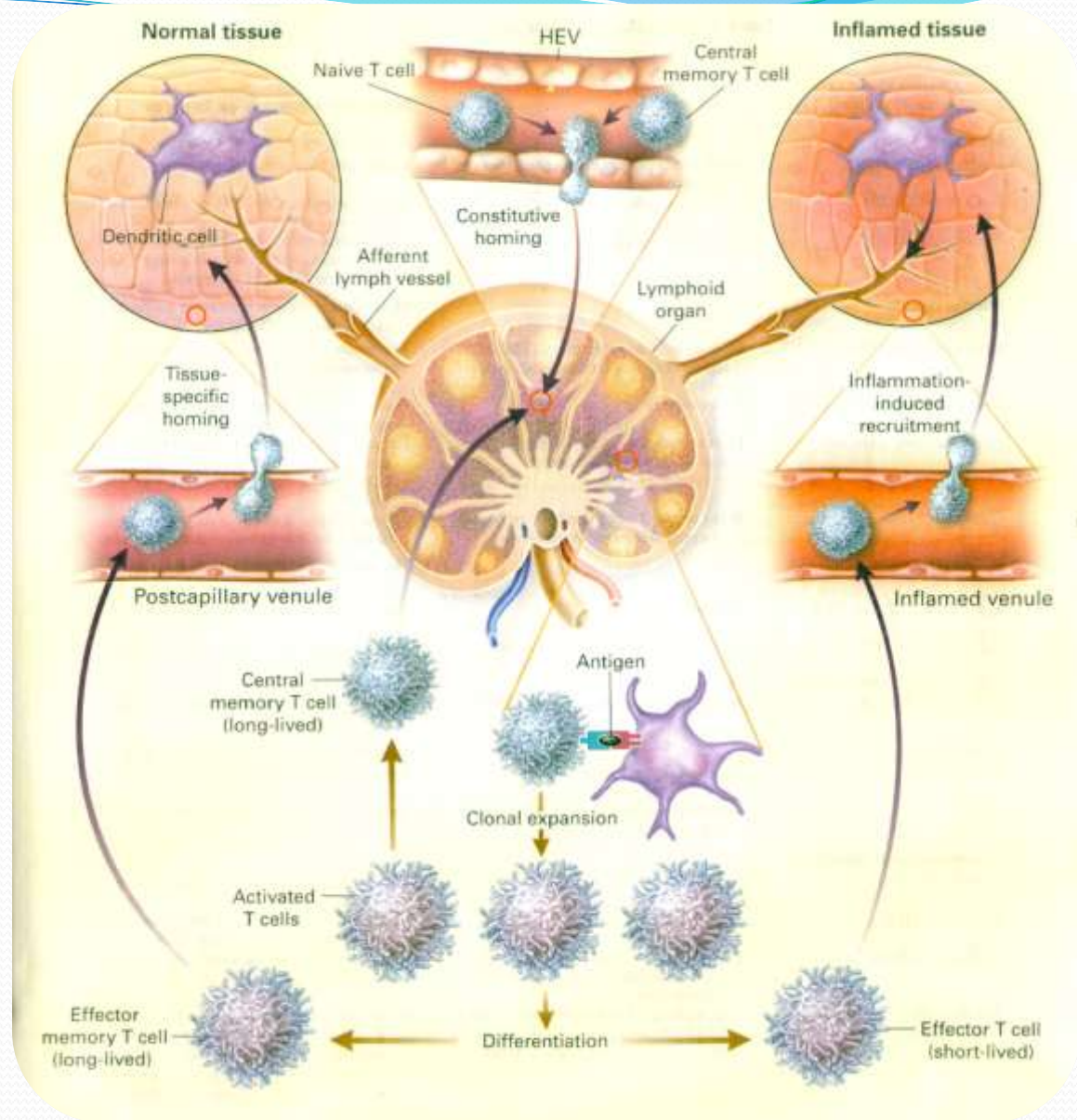
MR = mature recirculating B cells.

MZ = marginal zone B cells.

MZ = marginal zone B cells.

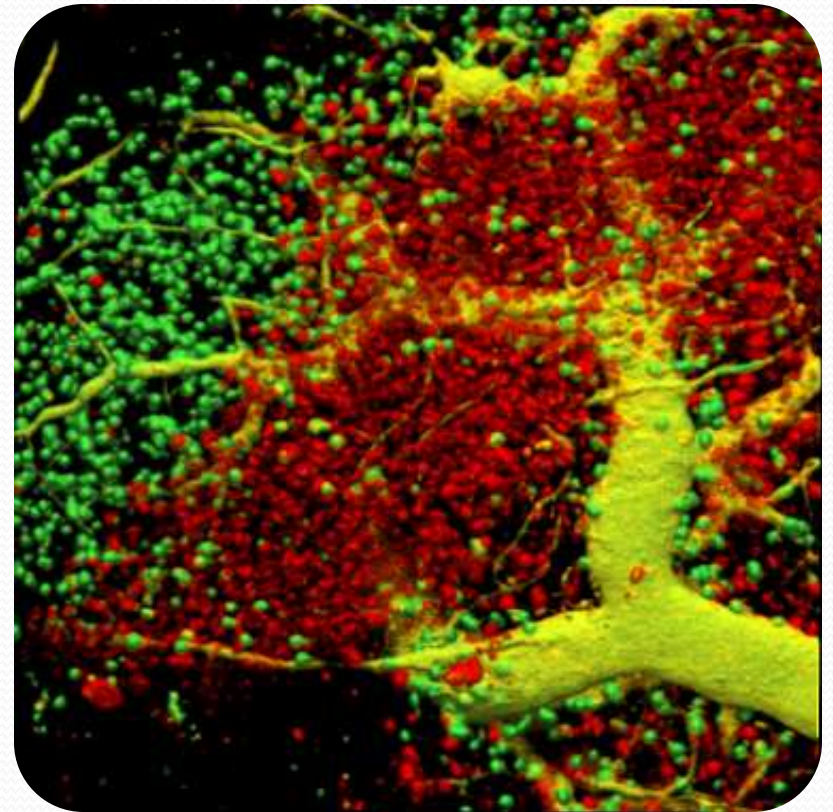
MZ = marginal zone B cells.

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



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

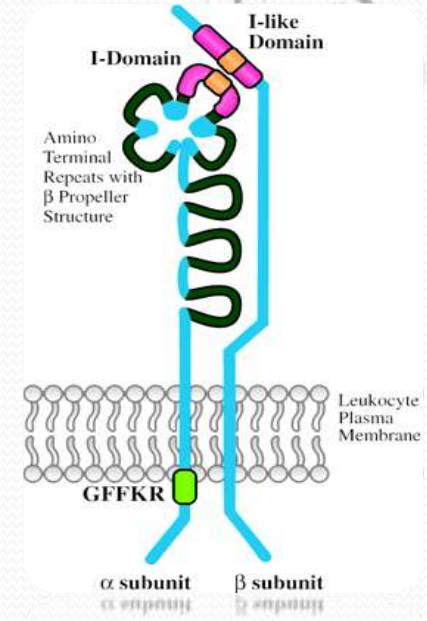
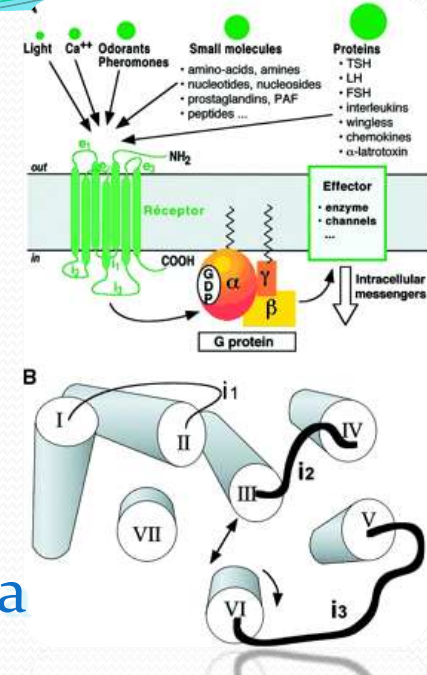
- Qué determina esta distribución y tráfico diferencial?
 - Expresión y activación diferencial de receptores de quimiocinas y de integrinas
- Interacciones entre las células endoteliales, la matriz extracelular, quimokinas y las moléculas de adhesión



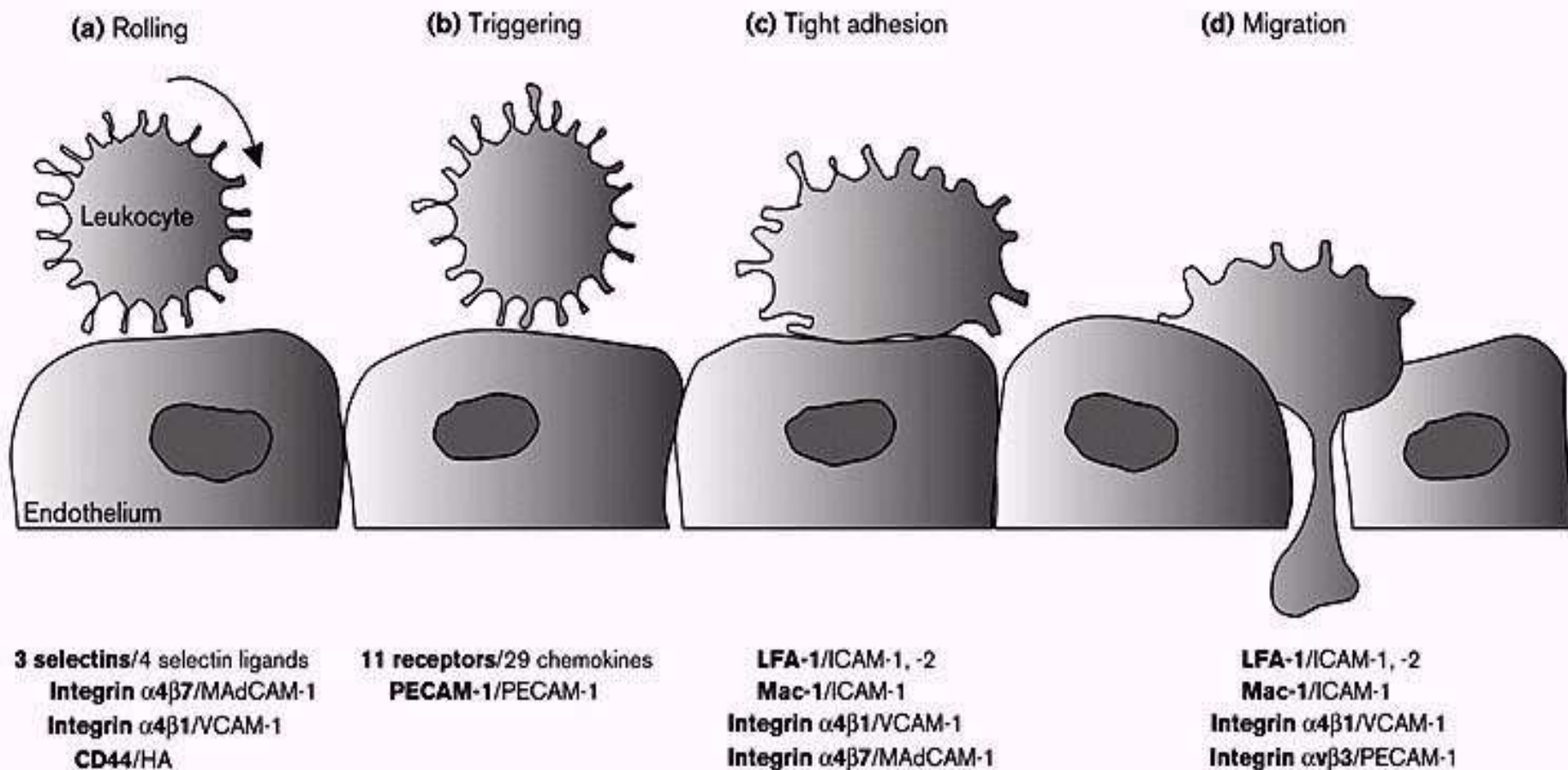
Migración de leucocitos:

ELEMENTOS QUE PARTICIPAN

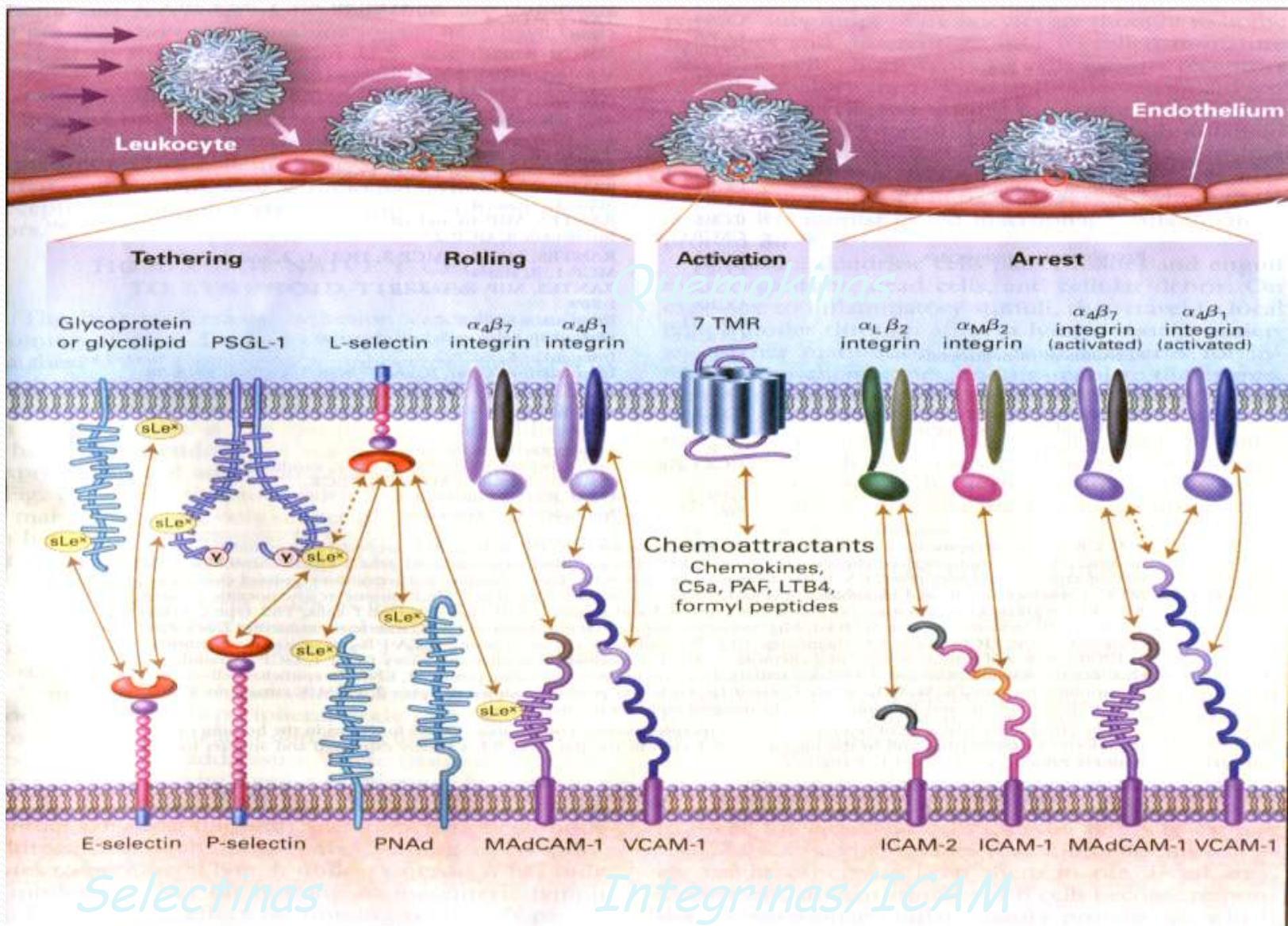
- Quemokinas y sus receptores
 - Interleukinas con capacidad quimiotáctica
- Integrinas
- Cadherinas
- Selectinas
- ICAM



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

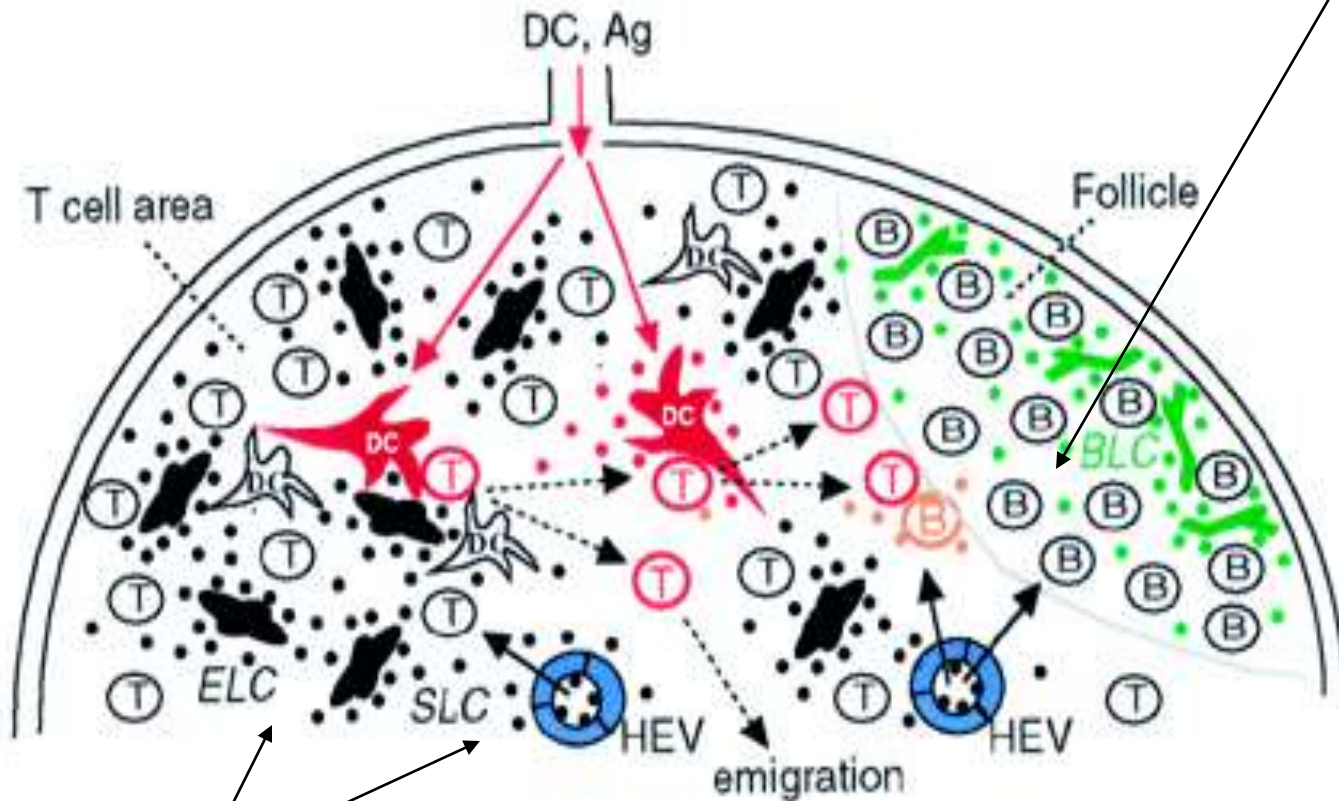


Recirculación de linfocitos



Migración celular: QUEMOKINAS

CXCR5: expresado sobre Th, permitir interacción con células B



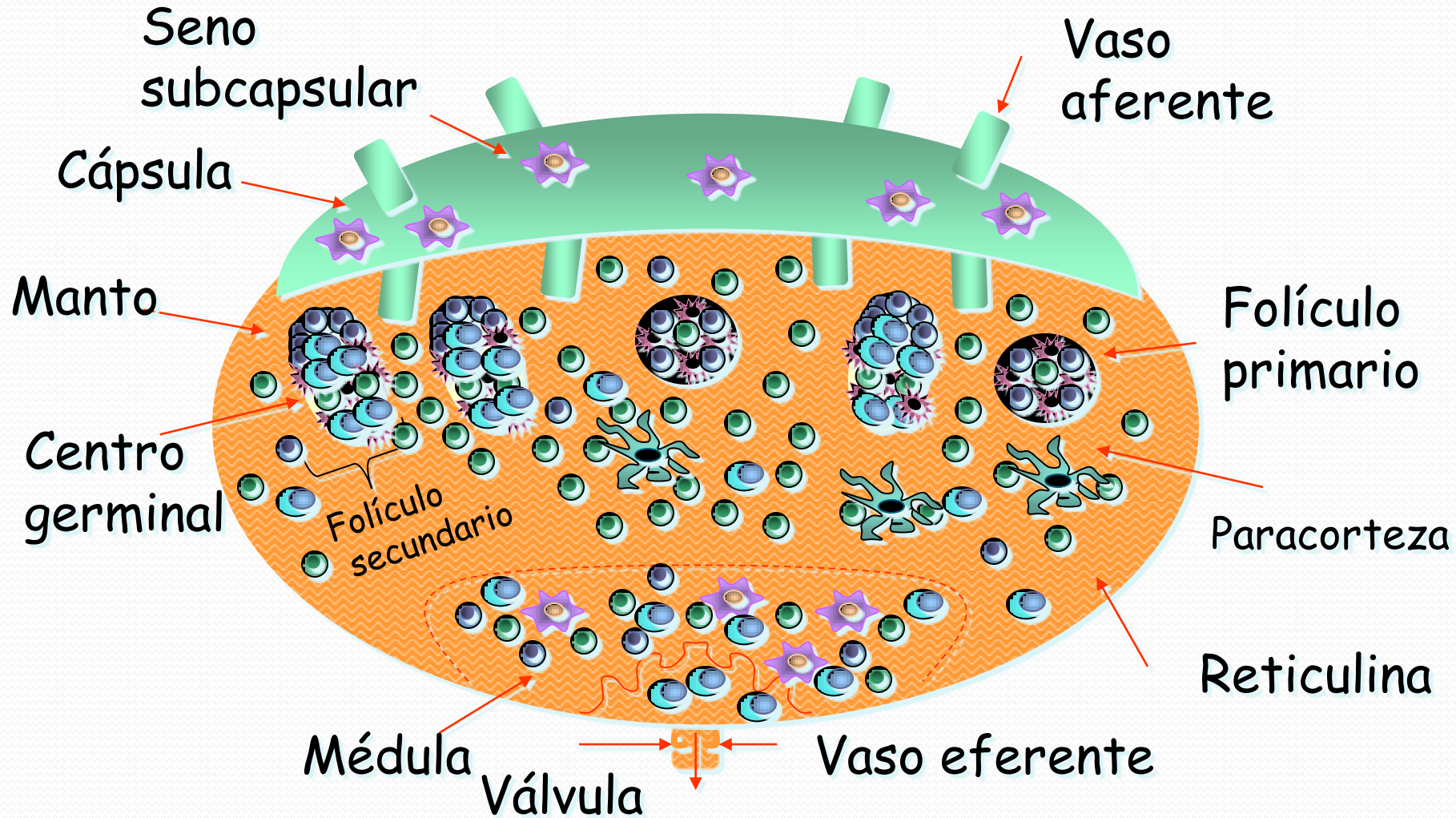
•Durante la activación inicial los linfocitos pierden el receptor CCR7 y adquieren otros, lo que le permite salir hacia los tejidos inflamados

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

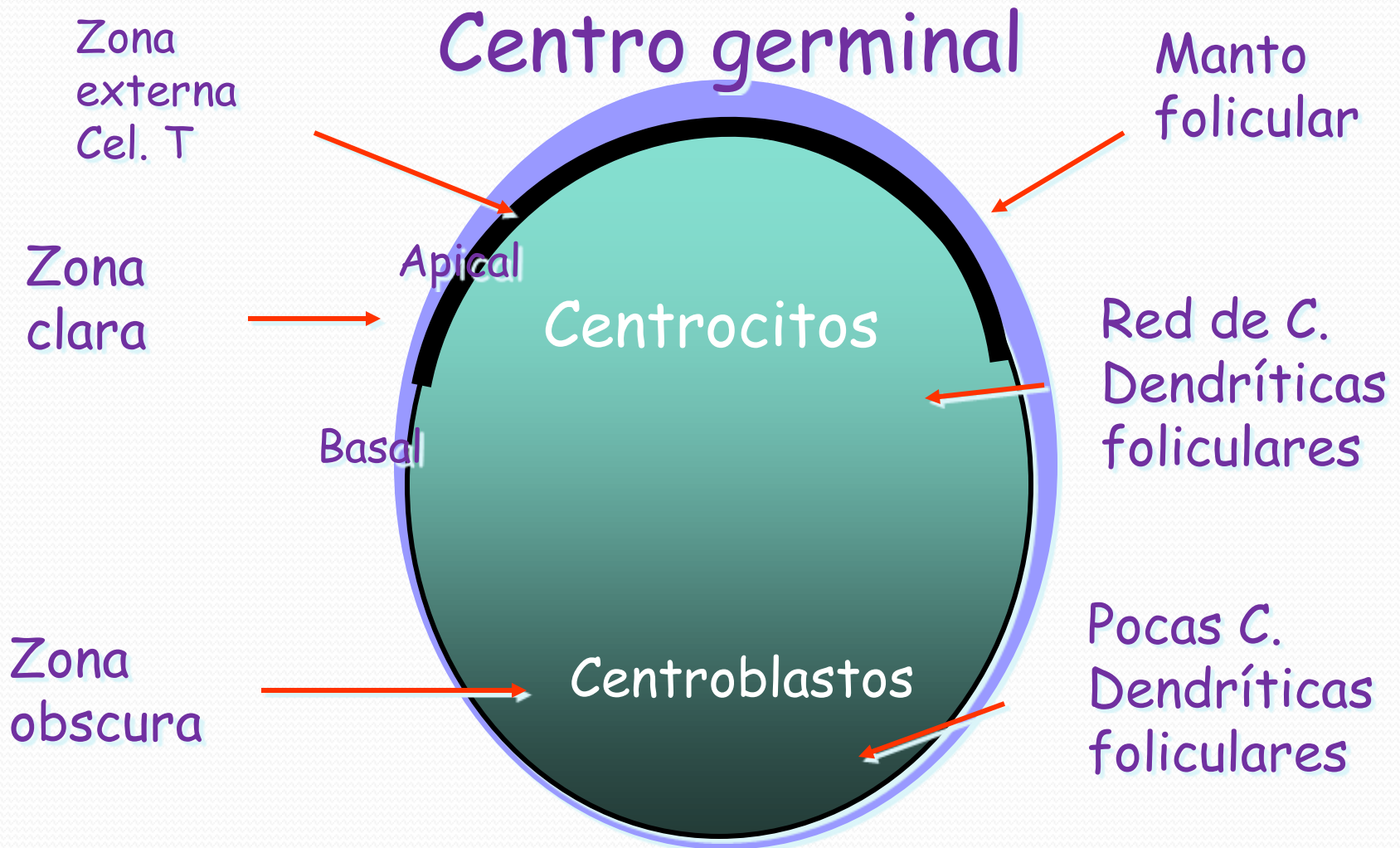
Órganos secundarios

- 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

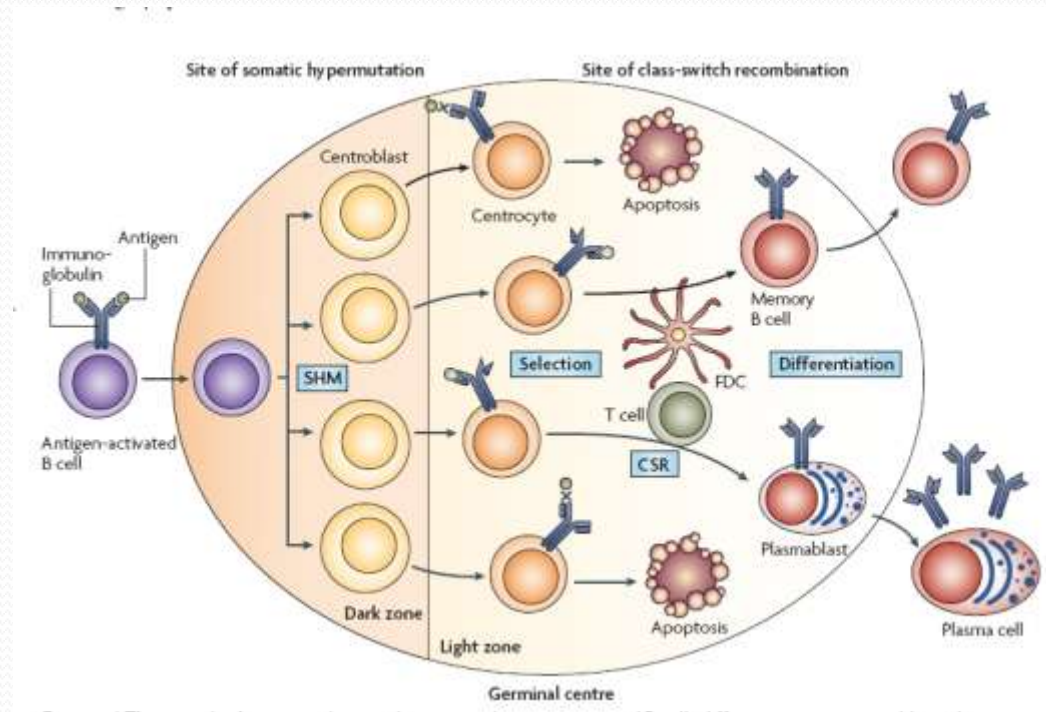


Órganos secundarios: Folículo secundario



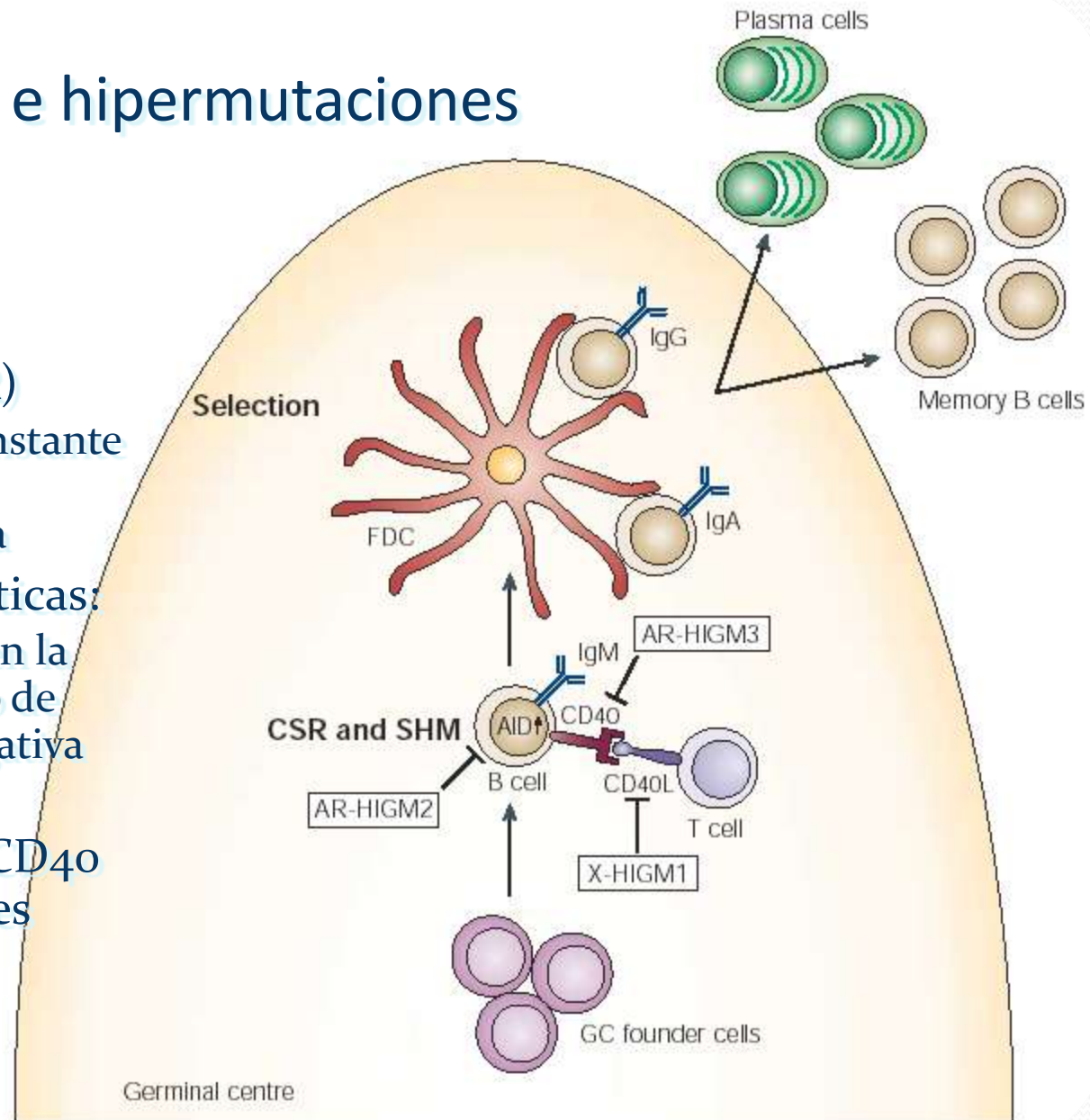
Órganos secundarios: Folículo secundario

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



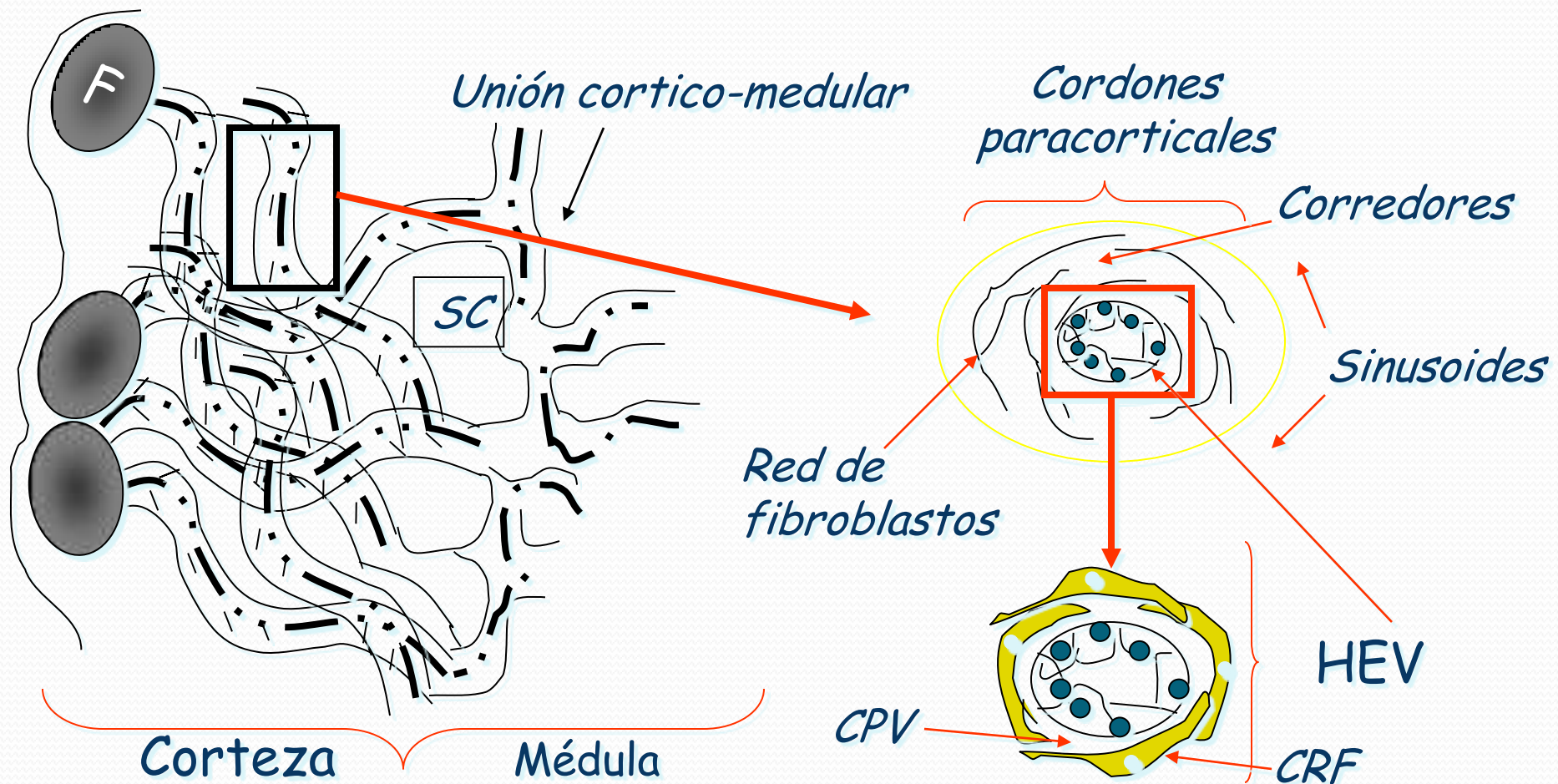
Ontogenia: CSR e hipermutaciones somáticas

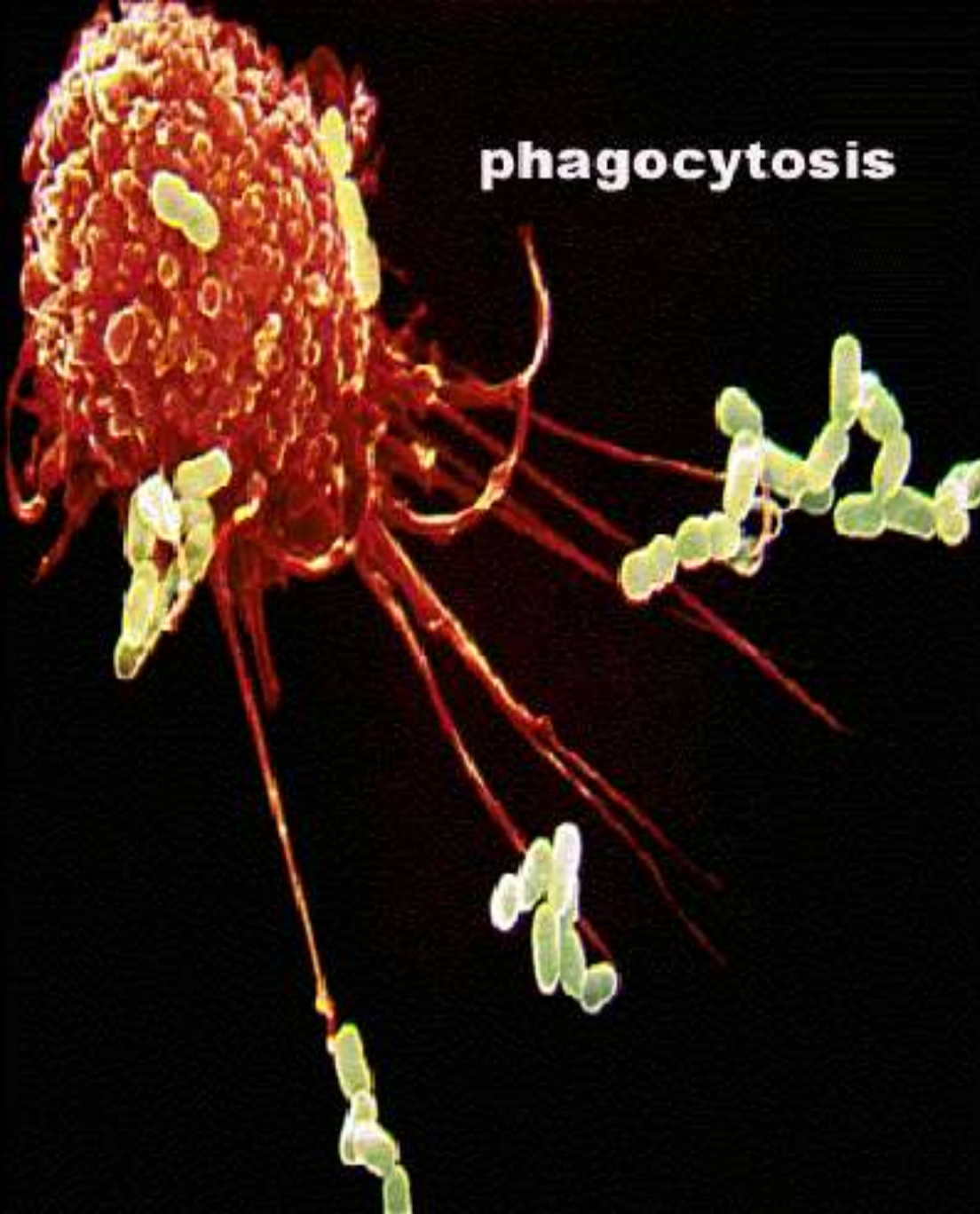
- ▶ Cambio de isotipo (CSR)
 - Cambio de la región constante conservando la misma especificidad antigénica
- ▶ Hipermutaciones somáticas:
 - Introduce mutaciones en la región variable, seguido de selección positiva o negativa
- ▶ Ambos activados por la interacción entre BCR/CD40 en los centros germinales



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