

Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad

Romina Gamberale

Laboratorio de Inmunología, IIHema, Academia Nacional de Medicina

Recibido:

Recibido en: 10/08/2004

| Aceptado:

Aceptado en: 29/08/2004

Contacto: Romina Gamberale - rgamberale@hematologia.anm.edu.ar

Introducción

Los seres humanos nos encontramos expuestos continuamente a una gran cantidad de microorganismos potencialmente patógenos, sin embargo, sólo nos enfermamos en forma ocasional. Esto es así gracias a nuestro sistema inmune, el cual constituye un sistema muy eficiente de defensa contra la infección. Distintos tipos de células sanguíneas tales como, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, participan en la respuesta inmunológica. La estrategia de defensa contra la infección involucra distintas etapas: una etapa temprana, conocida con el nombre de inmunidad innata, y una etapa tardía denominada inmunidad adaptativa.

Los linfocitos B y T son los principales protagonistas de la respuesta inmune adaptativa y, a diferencia del resto de las células del sistema inmune, poseen en su membrana receptores antigénicos capaces de reconocer en forma específica pequeñas porciones del patógeno (para el caso de los linfocitos B) o células infectadas con los mismos (en el caso de los linfocitos T). Luego de este reconocimiento, pueden activarse, multiplicarse y diferenciarse en células efectoras capaces de defendernos contra ese microorganismo en particular. La estrategia utilizada en la inmunidad adaptativa para reconocer a la gran cantidad de microorganismos existentes, involucra a una inmensa variedad de linfocitos B y T, cada uno de los cuales porta en su superficie un receptor particular para el antígeno. Gracias a esta gran diversidad de receptores antigénicos, un individuo tiene la capacidad de desarrollar una respuesta inmune adaptativa contra la amplísima variedad de patógenos con los que puede encontrarse durante su vida.

En este artículo, veremos:

- ✓ Las características del receptor antigénico de los linfocitos B.
- ✓ Las etapas de maduración de los linfocitos B durante su desarrollo.
- ✓ Cómo es posible generar la gran diversidad de receptores antigénicos existentes.

¿Cómo es el receptor antigénico de los linfocitos B?

El receptor antigénico de los linfocitos B se denomina BCR (*B cell receptor*) y está constituido por una inmunoglobulina (Ig) asociada con un heterodímero formado por las

moléculas Igα e Igβ (**Figura 1**). La Ig que forma parte del BCR no es otra cosa que una molécula de anticuerpo anclada a la membrana. Mientras que esta molécula es la responsable del reconocimiento antigénico, la transducción de la señal al interior de la célula B se lleva a cabo por el heterodímero Igα-Igβ.

image009.gif

Figura 1: El BCR está constituido por una inmunoglobulina (Ig) de superficie y el heterodímero Igα-Igβ. La Ig esta constituida por dos cadenas pesadas (H) idénticas entre si, asociadas por puentes disulfuro y dos cadenas livianas (L) idénticas entre si, asociadas a las H por puentes disulfuro. Comparando un gran número de Ig, se observó que la porción amino-terminal de ambas cadenas es variable (V) y está involucrada en el reconocimiento del antígeno. Por el contrario, la porción carboxi-terminal de ambas cadenas es relativamente constante (C). En la figura se observan las cadenas H en color verde, las cadenas L en color amarillo y los dominios variables rayados.

¿Qué función cumplen los linfocitos B?

Aquellos linfocitos B que reconocen al antígeno específico a través del BCR, pueden activarse y proliferar originando un clon de células hijas, para diferenciarse posteriormente a plasmocitos (**Figura 2**). Estos últimos tienen la capacidad de secretar moléculas de Ig (anticuerpos), los cuales poseen la misma especificidad de la Ig que formaba parte inicialmente del BCR. Por lo tanto, los anticuerpos secretados podrán reconocer al microorganismo y reclutar una variedad de mecanismos efectores a fin de destruirlo.

image010.gif

Figura 2

Las distintas porciones constantes de la cadena pesada (CH) dan origen a los diferentes tipos de anticuerpos conocidos (IgM, IgG, IgE, IgA e IgD), y cada una de estas clases de Ig es particularmente eficiente en la activación de los distintos mecanismos efectores. Sin embargo, la Ig que forma parte del BCR no lleva a cabo esas funciones ya que se encuentra anclada en la membrana de la célula B, por lo tanto, solamente es capaz de reconocer al antígeno específico a través de la región variable.

ONTOGENIA de LINFOCITOS B

¿Dónde se originan los linfocitos B?

Los linfocitos B, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea a partir de un precursor común, denominado *stem cell* o **célula madre pluripotente hematopoyética (CMPH) (Figura 3)**. Dichas células tienen la capacidad de autorrenovarse y son, tal como su nombre lo indica, potencialmente capaces de dar lugar a distintos tipos celulares. En el hombre, las CMPH aparecen en el saco vitelino embrionario alrededor de la tercera semana de vida y, a medida que el feto se desarrolla, algunas de estas células migran al hígado. Recién al cuarto mes de vida fetal la médula ósea comienza a ser el sitio donde mayoritariamente ocurrirá la hematopoyesis. Si bien en los adultos la mayor cantidad de CMPH se encuentra en la médula ósea, estas células tienen la capacidad de migrar hacia la circulación, por lo que puede hallarse una pequeña proporción en sangre periférica.

A partir de las CMPH se generan dos tipos de progenitores con potencial pluripotente más acotado que se denominan: **progenitor mieloide**, el cual podrá diferenciarse en células de

estirpe mieloide (eritrocitos, plaquetas, monocitos y granulocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y **progenitor linfoide común** (PLC), a partir del cual se generarán los linfocitos B y T. ¿Cómo se decide si el PLC se diferenciará hacia el linaje B ó T? Hasta el momento no está del todo claro este punto, sin embargo, numerosas evidencias sugieren que la señalización a través de una molécula presente en la membrana de los PLC, denominada Notch1, induciría la diferenciación hacia el linaje T, mientras que la ausencia ó inhibición de esa señal favorecería la diferenciación B.

image011.gif

Figura 3

¿Dónde se desarrollan los linfocitos B?

Los linfocitos B se desarrollan mayoritariamente en la médula ósea pero culminan su maduración en el bazo. Su generación se produce en distintas etapas o pasos que deben ir completándose, uno a uno, en forma correcta para poder avanzar en el proceso de maduración. El concepto mismo de maduración linfocitaria implica la generación de un receptor antigénico particular para cada linfocito y su expresión en la membrana antes del ingreso del antígeno. Dado que existen miles de millones de linfocitos B distintos, cada uno de los cuales porta inmunoglobulinas de superficie con una especificidad única, un individuo posee una gran diversidad de inmunoglobulinas. Tal como veremos a continuación, en las primeras etapas del desarrollo linfocitario, los esfuerzos se centran en la generación de esta Ig y, si esto no es posible, el linfocito no continúa con su desarrollo y se ponen en marcha mecanismos que llevan a la muerte celular programada conocida como **apoptosis**, sin alcanzar la madurez.

¿Cómo es posible generar tanta diversidad de inmunoglobulinas?

Las inmunoglobulinas presentan muchísima diversidad. El número total de especificidades de anticuerpos disponibles en un individuo se conoce con el nombre de repertorio de anticuerpos o de inmunoglobulinas y en el ser humano, ese número, es por lo menos de cien mil millones. Antes de que se pudieran analizar directamente los genes que codifican para las Ig, existían dos teorías que intentaban explicar el origen de semejante diversidad. La TEORÍA DE LA LÍNEA GERMINAL postulaba que existía un gen distinto para cada cadena de Ig diferente y, por lo tanto, proponía que el repertorio de Ig era hereditario. Por el contrario, la TEORÍA DE LA DIVERSIFICACION SOMÁTICA postulaba que el amplísimo repertorio se generaba a partir de un conjunto de genes hereditarios que codifican para la porción variable de las Ig los cuales se modificaban de una manera particular en cada una de las células B. El clonado de los genes de las Ig reveló que, tal como proponía esta última teoría, la generación de diversidad se produce por rearrreglos del ADN que codifica para las porciones variables de las Ig durante el desarrollo de los linfocitos B.

Las cadenas H y L de las Ig están codificadas por distintos grupos de genes y, para cada una de las cadenas, existen varios fragmentos génicos involucrados en la generación de sus porciones variables. En las células que darán lugar a los linfocitos B, estos fragmentos génicos se rearreglan a través de un proceso que se conoce con el nombre de **recombinación somática** (Figura 4).

image013.jpg

Figura 4: Recombinación somática. La porción variable de la cadena L (V_L) se constituye por combinación de fragmentos denominados V (rojo) y J (amarillo), mientras que la región variable de la cadena H (V_H) involucra, además, fragmentos D (verde). Los fragmentos génicos presentes en el ADN en configuración germinal sufren el proceso de recombinación somática, dando lugar a una combinación única

de fragmentos V-J para la porción V_L y V-D-J para la región V_H en cada linfocito B.

Hasta aquí hemos visto de qué manera es posible que se constituya la porción variable de las cadena L y H pero, para simplificar, hemos presentado las cosas como si sólo existiera una copia de cada uno de los genes involucrados en el proceso de recombinación somática. En realidad, en el ADN en configuración germinal, existen múltiples copias de cada uno de los genes involucrados en este proceso y es la selección de un segmento u otro lo que hace posible la gran diversidad de regiones variables entre las distintas Ig. La unión entre los fragmentos recombinados (V_L - J_L ó V_H - D_H - J_H) es imprecisa, lo cual es una fuente extra de variabilidad para la porción variable de las Ig. Los rearrreglos del ADN que generan proteínas no funcionales se denominan "no-productivos" y suelen ser los más frecuentes. Para que un linfocito B pueda desarrollarse normalmente debe lograr un rearrreglo productivo de su Ig, de no ser así, no podrá continuar con su desarrollo y morirá por apoptosis.

Etapas de maduración de los linfocitos B

Tal como hemos mencionado anteriormente, las células B maduran mayoritariamente en la médula ósea. El desarrollo de los linfocitos B depende de la presencia de células estromales que actúan, no sólo como una red de sostén necesaria para que los linfocitos B continúen su desarrollo, sino también como fuente de factores de crecimiento críticos que estimulan la diferenciación y proliferación.

En el primer estadio de diferenciación, conocido con el nombre de estadio **pro-B**, los linfocitos poseen una capacidad limitada de auto-renovación. Durante este estadio es que se produce el rearrreglo de la cadena H de las Ig, el cual se lleva a cabo en dos etapas: primero se asocian los fragmentos D_H - J_H (pro-B temprano) y luego se une el fragmento V_H al D_H - J_H previamente rearrreglado (pro-B tardío). Tal como se observa en la **Figura 5**, la asociación D_H - J_H se produce en ambos cromosomas. Por el contrario, la unión del fragmento V_H al D_H - J_H se intentará primeramente en un cromosoma y en caso de no ser exitoso, se intentará rearrreglar el segundo cromosoma. Este fenómeno se conoce con el nombre de **exclusión alélica** y garantiza que sólo se exprese la cadena H de uno de los dos alelos del genoma.

image014.gif

Figura 5

La ausencia de rearrreglos exitosos de la cadena H lleva a la apoptosis del linfocito B. El rearrreglo productivo de la porción V_H permite la expresión en la membrana de una cadena pesada m (H_m) asociada con dos proteínas producidas por el linfocito que están unidas en forma no covalente constituyendo una cadena liviana sustituta (L_s). El ensamblado de la cadena H rearrreglada a la cadena L_s y su asociación al heterodímero $Ig\alpha Ig\beta$ en la membrana del linfocito constituye el pre-BCR. La presencia del pre-BCR en la membrana caracteriza el siguiente estadio de maduración denominado **pre-B**, en donde los linfocitos finalizan con los rearrreglos de la cadena H, realizan varios ciclos de proliferación y comienzan posteriormente a rearrreglar la cadena L. De esta manera, cada una de las células hijas de la progenie que poseen genes de cadena H ya rearrreglados recombinan en forma independiente los fragmentos de la porción variable de la cadena L, aumentando nuevamente la diversidad. Para que todo esto sea posible, se necesita la transducción de señales de sobrevivencia del pre-BCR. Si bien hasta el momento no está claro qué es lo que gatilla la transducción de la señal a través de dicho receptor, existen evidencias que indican que la proteína quinasa Btk está involucrada. En este sentido, los pacientes que presentan mutaciones en dicha proteína (enfermedad de Bruton) poseen los linfocitos arrestados en el estadio pro-B.

Los rearreglos de la porción variable de la cadena L también están gobernados por el fenómeno de exclusión alélica e involucran la asociación de fragmentos V_L y J_L . Existen dos tipos distintos de cadena L: la cadena liviana kappa (Lk) o la lambda (Ll). Primeramente se intentará un rearreglo productivo de la cadena Lk en uno de los cromosomas y, en los casos en que no se consiga, se procederá a intentar rearreglar esa misma cadena en el otro cromosoma. Si estos intentos no fueran exitosos, comenzarán los rearreglos de la cadena Ll, primero en un cromosoma y luego en el otro. Normalmente, un 65% de linfocitos B logra un rearreglo exitoso de cadena Lk, mientras que el restante 35% presenta rearreglos productivos de la cadena Ll. No existen linfocitos con rearreglos no productivos de cadena L ya que éstos no son viables y mueren por apoptosis.

Una vez que los genes de la cadena L son rearreglados exitosamente, la cadena L comienza a sintetizarse y se combina con la cadena Hm a fin de formar la molécula de IgM. Dicha molécula se expresará en la membrana junto con el heterodímero Igα-Igβ constituyendo el BCR de clase IgM característico del estadio **B inmaduro**.

En las etapas de maduración de los linfocitos B que hemos visto hasta el momento lo crucial es generar rearreglos productivos de los genes de cadena H y L que permitan la expresión de una molécula de Ig en la membrana. Aquellas células que logran generar su receptor antigénico y expresarlo pueden avanzar a la siguiente etapa de maduración, en donde los mecanismos de control cambian el foco de atención hacia la especificidad del BCR. Es decir que, una vez que el linfocito alcanza el estadio B inmaduro y expresa el BCR en la membrana, dicho receptor será evaluado en función de su capacidad de reconocer antígenos presentes en el ambiente del órgano linfático primario. La finalidad de esta "evaluación" es controlar a aquellos linfocitos cuyos BCR pueden reconocer moléculas propias, los cuales serían potencialmente peligrosos ya que podrían generar respuestas de tipo autoinmunes. Este proceso de "evaluación" se conoce como inducción de **tolerancia central**. La especificidad y la avidez del receptor por esos antígenos determinará el camino a seguir por el linfocito: sobrevivir y continuar madurando, o morir por apoptosis sin alcanzar la madurez.

Inducción de tolerancia central de linfocitos B

Los linfocitos B inmaduros que no reciban señal alguna a través de su BCR en la médula ósea, son capaces de salir del órgano para continuar con su proceso de maduración en el bazo. Por el contrario, aquellos linfocitos B inmaduros capaces de reconocer antígenos propios en la médula ósea son considerados peligrosos y "controlados" a través de diversos mecanismos dependiendo de la intensidad de la señal recibida por el BCR. Es así, que los que reciben una señal intensa a través del BCR morirán por apoptosis en la médula ósea. Antes de morir, al linfocito B inmaduro se le da la oportunidad de reemplazar el BCR autorreactivo por otro que no lo sea, a fin de evitar la muerte por apoptosis. Este proceso se conoce con el nombre de **edición del receptor**. Si el nuevo BCR generado no es autorreactivo, el linfocito B inmaduro no entra en apoptosis y sale de la médula ósea para continuar su proceso de maduración. Si los distintos intentos de "editar" el BCR continúan generando un receptor autorreactivo, la célula morirá por apoptosis en la médula ósea.

Por otro lado, aquellos linfocitos B inmaduros que en la médula ósea reciban señales débiles a través de su BCR, serán inactivados y entrarán en un estado permanente de no-respuesta, también denominado **anergia**. Estos linfocitos autorreactivos abandonan la médula ósea pero, al no ser capaces de activarse en la periferia, mueren relativamente pronto.

Vale la pena mencionar que, dado que no todos los antígenos propios pueden alcanzar la médula ósea a fin de protagonizar la inducción de tolerancia central B, muchos de los linfocitos B que continúan con su proceso de maduración poseen BCR capaces de interactuar

con moléculas propias. Dichos linfocitos son controlados en la periferia, a través de mecanismos de inducción de **tolerancia periférica**.

Maduración periférica de linfocitos B

Del total de linfocitos B inmaduros que se genera diariamente sólo un pequeño porcentaje logra salir de médula ósea y alcanzar el bazo, donde continúan con su proceso de maduración. ¿Por qué se generan tantos linfocitos B inmaduros y sólo algunos sobreviven? Todavía esta pregunta sigue sin tener una respuesta clara pero probablemente, la mayoría de los linfocitos B inmaduros sean seleccionados negativamente en la médula ósea durante la inducción de tolerancia central debido a que sus BCR son capaces de reconocer moléculas propias. Sólo aquellos linfocitos B inmaduros, que sobrevivan a la inducción de tolerancia central, saldrán de la médula ósea hacia el bazo, el órgano donde culminarán su maduración. En este estadio los linfocitos B, que se encuentran en la periferia en un estado de transición entre el estadio B inmaduro y maduro, reciben el nombre de linfocitos **B transicionales (BTr)**. Dentro de esta población de linfocitos pueden diferenciarse dos subpoblaciones bien definidas, BTr de tipo 1 (BTr1) o de tipo 2 (BTr2), que se encuentran en el bazo ubicadas en distintos lugares anatómicos.

Durante el estadio BTr1, los BCR de dichos linfocitos también son "controlados" y sufren un proceso de selección negativa si reciben señales a través de su BCR para reconocer moléculas propias. A través de este mecanismo de inducción de tolerancia periférica, nos aseguramos que los linfocitos B autorreactivos que han sobrevivido a la inducción de tolerancia central en la médula ósea no continúen su desarrollo y mueran por apoptosis en el bazo. Posteriormente, aquellos sobrevivientes, darán lugar a los BTr2, los cuales aparentemente necesitan recibir señales de sobrevida a través de su BCR, aún no bien definidas, para alcanzar el estadio de **B maduro**.

Numerosas evidencias demostraron que es necesaria además la presencia de ciertos factores de sobrevida, tales como la citoquina BAFF, para la transición de los linfocitos BTr1 hacia el estadio BTr2 y B maduras. Una vez que los linfocitos han alcanzado su madurez, co-expresan en su membrana BCR de tipo IgM e IgD, sin embargo presentan una única especificidad dada por la porción variable de las *Igs*, que es idéntica. Esto se explica gracias a que una misma porción VH generada por recombinación somática puede asociarse con los genes C μ (para dar la IgM) ó C δ (para dar la IgD).

Conclusiones

Los linfocitos B, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea a partir de un precursor común. Existen miles de millones de linfocitos B distintos entre sí, cada uno de los cuales expresa en su membrana un receptor antigénico particular. La naturaleza se las ha ingeniado para generar semejante diversidad de receptores utilizando sólo un conjunto de genes, los cuales son rearrreglados en forma distinta en cada uno de los linfocitos B en desarrollo.

Debido a cómo se generan las inmunoglobulinas, una vez que el BCR puede ser expresado en la membrana, necesariamente deben existir mecanismos de control que evalúen la especificidad del mismo. Si bien durante la ontogenia de linfocitos B la mayoría de las células mueren por apoptosis antes de alcanzar la madurez, este proceso, lejos de ser un gasto innecesario de energía, mantiene el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad. El proceso de generación de las inmunoglobulinas nos asegura la gran diversidad necesaria para estar protegidos contra la amplísima variedad de microorganismos existentes, sin embargo esta situación acarrea conjuntamente la aparición de rearrreglos capaces de interaccionar con

moléculas propias. Es por ello que existen numerosos mecanismos de control para evaluar la especificidad de las inmunoglobulinas generadas, a fin de evitar la aparición de fenómenos autoinmunes.

Aquellos linfocitos que sobreviven a los mecanismos de control y alcanzan el estadio B maduro, co-expresan en su membrana BCR de tipo IgM e IgD, los cuales son específicos para antígenos que aún no conocen, por lo que también reciben el nombre de linfocitos B vírgenes. Dichas células comienzan un tráfico linfocitario en busca del antígeno para el cual son específicas y, aquellas que lo encuentren, podrán activarse, proliferar y diferenciarse a células productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos tendrán la capacidad de reconocer al antígeno específico y reclutar distintos mecanismos efectores a fin de destruirlo.

Agradecimientos:

A la Dra. Mirta Giordano, por su crítica revisión del manuscrito.

Referencias.

Tonegawa S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302:575.

D Zipori , 1992. The renewal and differentiation of hemopoietic stem cells. *FASEB J.*, 6:2691.

Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *Journal Experimental Medicine*, 177:999.

E Beutler, M Lichtman, B Collier and T Kipps. 1995. *Williams Hematology*. Fifth edition. Mc Graw Hill, New York, p211.

Sandel PC, Monroe JG., 1999. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*, 10:289.

Marcel Batten, Joanna Groom, Teresa G. Cachero, Fang Qian, Pascal Schneider, Jurg Tschopp, Jeffrey L. Browning, Fabienne Mackay, 2000. BAFF Mediates Survival of Peripheral Immature B Lymphocytes. *Journal Experimental Medicine*, 192:1453.

Richard R. Hardy, Yoko Hayakawa, 2001. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 19:595.

Charles Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik, 2001. *Immuno Biology. The immune system in health and disease*. 5th edition, Garland Publishing.

Stephen B. Gauld, Joseph M. Dal Porto, John C. Cambier, 2002. B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles in Cell Development and Disease. *Science*, 296:1641.

Freddy Radtke, Anne Wilson and H Robson MacDonald, 2004. Notch signaling in T- and B-cell development. *Current Opinion in Immunology*, 16:174.

Antonius G. Rolink, Jan Andersson, Fritz Melchers, 2004. Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunological Reviews*, 197:41.

Thomas T. Su, Beichu Guo, Bo Wei, Jonathan Braun, David J. Rawlings, 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunological Reviews*, 197:161.

Mila Jankovic, Rafael Casellas, Nikos Yannoutsos, Hedda Wardemann, Michel C. Nussenzweig, 2004. Rags and regulation of autoantibodies. *Annual Review of Immunology*, 22:485.

