

*ESTRUCTURACIÓ DE LA RESPOSTA B A LES
MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE*

*MEMÒRIA DE LA TESI PRESENTADA PER A OBTENIR EL GRAU DE DOCTOR EN
CIÈNCIES BIOLÒGIQUES PER LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.
BELLATERRA, GENER 2004*

Ma del Pilar Armengol i Barnils

1.2.2 Tolerància T perifèrica

Per complementar el fenomen de tolerància T central al timus i per intentar eliminar l'autoreactivitat en perifèria, s'han establert una sèrie de mecanismes perifèrics (*figura 1*), alguns dels quals no eliminen les cèl·lules però els impedeixen participar en una resposta immunològica.

1.2.2.1 Ignorància immunològica

És un terme que es va utilitzar a partir de l'evidència de que cèl·lules específiques d'antígens propis no toleritzades en el timus ignoraven l'esmentat antigen i no responien en contra. Hi ha dos conceptes que explicarien aquesta manca de resposta: *l'accessibilitat a l'antigen* i *l'afinitat del TCR pel complex MHC/pèptid propi*. Pel que fa a l'accessibilitat a l'antigen, se sap que antígens segrestats o que s'expressen restringidament en determinats teixits, són més ignorats que toleritzats. A més, s'ha demostrat que les cèl·lules T "naïve" estan excloses de la circulació pels teixits perifèrics⁷¹, i que migren de la sang als teixits limfoides perifèrics de forma que la probabilitat de reconeixement d'un autoantigen restringit es veu molt reduïda⁷². El segon concepte es refereix a que les cèl·lules T naïve requereixen més afinitat per l'antigen i més nombre de senyals de coestimulació per a que s'activin, cosa que fa que la probabilitat d'activació es redueixi i no tingui lloc la resposta contra l'autoantigen.

1.2.2.2 Deleció de cèl·lules T madures

Hi ha diversos mecanismes d'eliminació de cèl·lules T madures que conduïxen a la mort cel·lular per apoptosi i que tenen en comú el sistema CD95/CD95L (Fas/FasL) expressat en les cèl·lules T activades. El funcionament d'aquest sistema té lloc tant en condicions fisiològiques (manteniment de l'homeostasi) com a mecanisme de tolerància perifèrica⁷³ i es produeix quan s'ha d'aturar l'expansió de les cèl·lules T en una resposta immunològica normal (AICD, mort cel·lular induïda per activació). També s'activa aquest mecanisme quan les cèl·lules T naïve són activades ineficientment⁷³. Un darrer sistema per l'eliminació de cèl·lules T madures és l'expressió constitutiva de CD178 (CD95L, FasL) en epitelis d'òrgans immunològicament privilegiats^{74,75} que permet l'eliminació de cèl·lules T específiques d'autoantígens. S'han descrit alteracions en aquest mecanisme com a responsables de la mort per apoptosi de cèl·lules epitelials en algunes malalties d'etiologia autoimmunitària com la tiroïditis de Hashimoto⁷⁶ o el model animal de diabetis insulino-dependent⁷⁷, de forma que en presència de citocines com IL-1 β , s'indueix l'expressió de CD95 en el propi epiteli. Malgrat la descripció inicial, la poca consistència dels reactius utilitzats no ha permès reproduir aquests resultats.

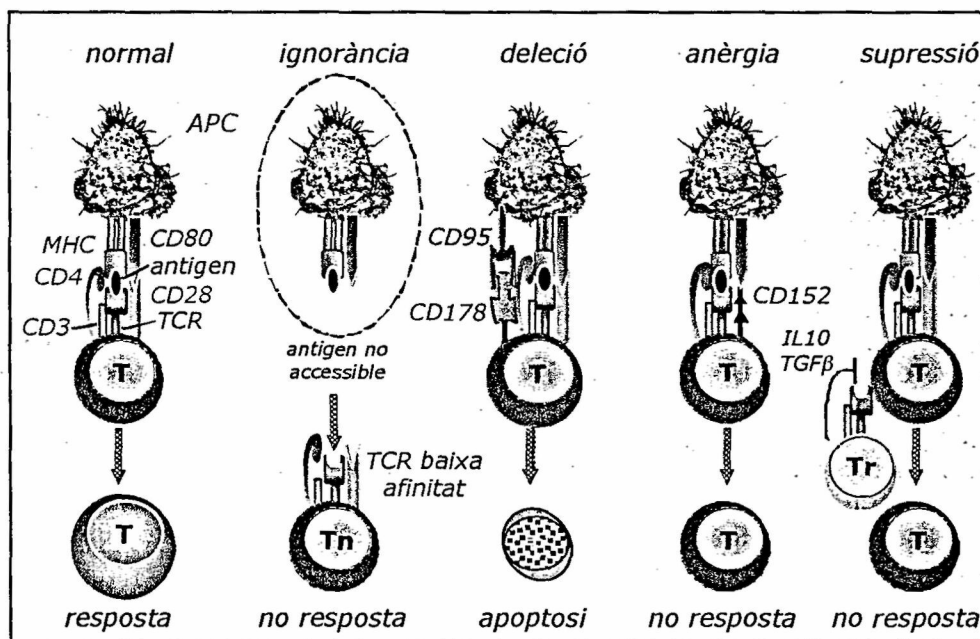
1.2.2.3 Anèrgia immunològica

És l'absència mantinguda de resposta que té lloc quan alguns dels requeriments essencials per a l'activació de les cèl·lules T no es dona (absència de molècules coestimuladores⁷⁸, citocines⁷⁹, baixos nivells d'expressió del TCR⁸⁰, etc). Donat que en condicions normals els teixits no estan especialitzats en l'expressió d'aquestes molècules, els limfòcits T que han reconegut el complex MHC-pèptid, queden en un estat de manca de resposta⁸¹. En aquest procés juguen un paper important les cèl·lules dendrítiques que podrien toleritzar cèl·lules T per presentació per molècules de HLA de classe I d'autoantígens capturats d'altres cèl·lules (*cross presentation*). S'ha hipotetitzat que això ho explicaria l'estat relativament immadur d'aquestes dendrítiques donat que les DCs immadures estimulades amb anti-CD40⁸² (promou la maduració de les DCs) o amb anti-OX40⁸³ es pot revertir la inducció d'anèrgia. La cross presentació depèn de la concentració de l'autoantigen⁸⁴: si s'expressa a baixos nivells, és mínima i permet que les cèl·lules autoreactives romanguin en el repertori T, mentre que si es donen fenòmens com la necrosi tissular o el desenvolupament de tumors, la concentració antigènica és molt superior, cosa que permet la tolerització.

1.2.2.4 Cèl·lules immunoreguladores

S'han descrit com a cèl·lules T reguladores (Treg)⁸⁵ les que tenen un fenotip CD4⁺CD25⁺, són productores de TGFβ, la seva activació és depenent d'antigen però no ho és el seu mecanisme d'acció. Juguen un paper important en l'impediment de l'expansió de les cèl·lules potencialment autoreactives. Solen originar respostes de tipus Th2 mitjançant la secreció de citocines (IL-4 i IL-10) que suprimeixen el desenvolupament de les cèl·lules Th1 que generalment afavoreixen la progressió de la malaltia⁸⁶. Sembla que en alguns casos la generació d'aquestes cèl·lules està directament dirigida pels autoantígens perifèrics. La seva existència explicaria l'aparició de malalties autoimmunitàries espontànies després de timentomia neonatal en rates i ratolins^{87,88} i com aquesta es corregeix mitjançant la infusió de cèl·lules T memòria amb fenotip regulador.

Fig. 1 Mecanismes de tolerància perifèrica a les cèl·lules T. Diferents situacions en les que no té lloc una resposta immunitària normal per a) manca d'accessibilitat a l'antigen o presència de cèl·lules T pre-immunes amb TCR de baixa afinitat que requereixen més dosi antigènica per respondre; b) expressió en la cèl·lula T de molècules involucrades en la mort cel·lular per apoptosi en presència del seu lligand en la cèl·lula presentadora d'antigen; c) manca de segons senyals i d) inhibició o supressió de la resposta per alliberament de citocines supressores. APC, cèl·lula presentadora d'antigen; Tn, cèl·lula T pre-immune; Tr, cèl·lula T reguladora.



1.2.3 Ontogènia i tolerància B central

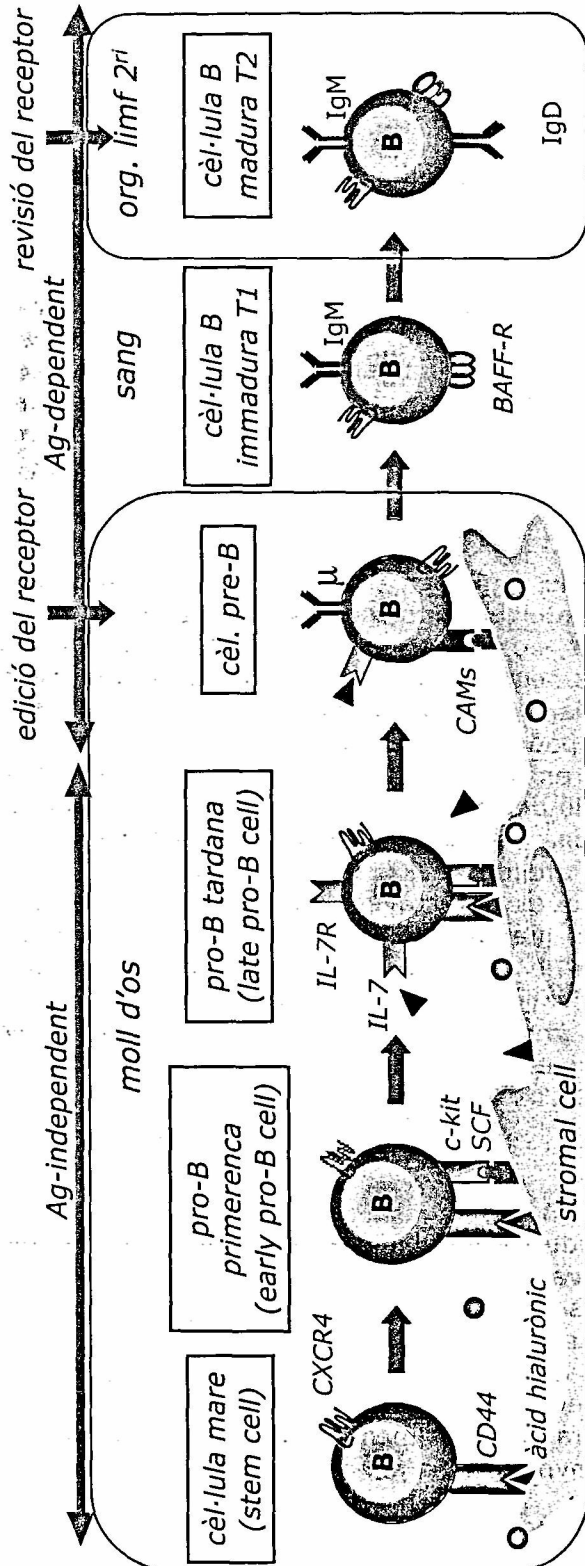
Als mamífers, les cèl·lules B es generen contínuament en el moll d'os a partir d'una cèl·lula mare precursora. Cada cèl·lula B expressa un sol tipus de cadenes pesades i lleugeres, de forma que el receptor que es genera té una única especificitat. El repertori d'anticossos (Acs) en un individu sà (al voltant de 10^{11} molècules d'anticossos diferents) està format majoritàriament per anticossos contra antígens aliens encara que n'hi ha que poden reconèixer antígens propis. La presència d'autoanticossos pot ser tant la causa directa de moltes malalties autoimmunitàries com una de les conseqüències. Hi ha diversos mecanismes per reduir les cèl·lules B autoreactives del repertori B, tant a nivell central al moll de l'os, com a nivell perifèric als òrgans limfoides secundaris.

La diferenciació de les cèl·lules B immadures al moll d'os es pot dividir principalment en els quatre passos de la *figura 2* en els que cadascun sembla regulat pel producte de l'anterior. Els tres primers són dependents del context en el que tenen lloc, donat que en absència de les cèl·lules estromals del moll d'os, les cèl·lules B no es diferencien.

Els primers precursors cel·lulars destinats a diferenciar-se cap a cèl·lula B són les cèl·lules **pro-B primerenques** (*early pro-B*) en les quals encara no ha tingut lloc el procés de reordenament dels gens de les immunoglobulines (Igs) però que poden ser identificades com a precursoras de les cèl·lules B en funció de l'expressió en superfície d'altres molècules (CD19, CD38, CD45R, el factor de transcripció Pax-5). En aquest estadi, els precursors de les cèl·lules B, mitjançant l'expressió de CD44 i de CXCR4, estan en contacte amb l'àcid hialurònic i amb la quimiocina CXCL12 que expressen les cèl·lules estromals⁸⁹. Aquestes alliberen factors de creixement i de diferenciació com CD44 que estimula la proliferació de les *early pro-B* via l'expressió de c-kit. La diferenciació de les *early pro-B* dona lloc a les cèl·lules **pro-B tardanes** (*late pro-B*), en les que té lloc el reordenament (en els dos cromosomes) dels dominis D i J de les cadenes pesades de les Igs. Donat que no es pot expressar per sí sola en superfície la cadena pesada de les Igs, les cèl·lules pre-B produeixen dues proteïnes amb estructura immunoglobulina que alhora formen la cadena lleugera "suplantadora" (*surrogate light chain*) $\lambda 5/VpreB$. En aquest moment apareixen en superfície receptors del factor de creixement IL-7, que també és secretat per les cèl·lules estromals i que juga un paper important en la proliferació i la supervivència de les *late pro-B*, a la vegada que es manté la secreció de la quimiocina CXCL12. A partir d'aquest moment, c-kit es regula negativament i les cèl·lules B deixen de mantenir contacte directe amb les estromals. Quan els dominis V_H i DJ_H s'han reordenat (només en un sol cromosoma), té lloc el reordenament de les cadenes lleugeres (primer la cadena kappa (κ) i després la cadena lambda (λ) si és necessari). En aquest moment s'expressa en superfície una Ig completa que serà alhora el receptor de la cèl·lula B (BCR) i ja es pot parlar de cèl·lula B immadura o **cèl·lula pre-B**. A més, en superfície es troba una isoforma transmembrana de la tirosin-fosfatasa (la CD45R) i altres molècules (CD19, MHC de classe II i CD40) que juguen un paper important en l'activació de les cèl·lules B madures per part de les cèl·lules T helper. Durant el procés de reordenament són actius els gens RAG1 i RAG2 (recombination activating genes) que actuen sincrònicament en els processos de recombinació i TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) que catalitza l'addició de nucleòtids. És a partir d'aquest moment que comença el procés de , mitjançant el qual aquelles cèl·lules que reconeixen antígens propis en el microambient del moll d'os seran eliminades per evitar processos d'autoreactivitat. En pocs dies, les cèl·lules B immadures esdevindran cèl·lules B que expressen en superfície IgM^{alt} i IgD^{baix} a més dels marcadors ja esmentats i migraran cap al teixits limfoides perifèrics. En aquest estadi les cèl·lules B perden la capacitat de resposta enfront CXCL12^{40,90,91}.

A nivell de moll d'os, les cèl·lules B autoreactives poden ser silenciades o eliminades del repertori per diferents mecanismes en funció de que els autoantígens reconeguts siguin multivalents de superfície cel·lular o solubles.

Fig. 2 Esquema dels estats de diferenciació de les cèl·lules B. Els estats de diferenciació s'han definit en funció de diversos paràmetres fonamentals (maarcats en negreta) com el reordenament dels segments gènics de les cadenes de les pesades i lleugeres de les immunoglobulines, la presència o absència de determinats marcadors de superfície cel·lular i l'expressió dels enzims Tdt i RAG. "++" indica un augment d'expressió de la molècula en qüestió respecte l'estadi anterior.



línia germinal	reorden. DJ _H	reorden. VDJ _H	reorden. VJ _L	sIgM	sIgM sigD
CD45R	CD45R	CD45R	CD45R	CD45R	CD45R
CD10	MHC classe II	MHC classe II	MHC classe II	MHC classe II	MHC classe II
CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19++
CD38	CD24	CD24++	CD24++	CD24++	CD24
CD43	CD38	CD38	CD38	CD40	CD40
	CD40	CD40	CD40	CD20	CD20
	CD43	CD43	CD40	CD21	CD21
	RAG1/2	RAG1/2	RAG1/2	CD23	CD23
	Tdt	Tdt	λ5/VpreB	CD24	CD24
	λ5/VpreB	λ5/VpreB	λ5/VpreB		
CXCR4	CXCR4	CXCR4	CXCR4	BAFF-R	BAFF-R
				CXCR4	CXCR4

1.2.3.1 Deleció clonal de cèl·lules B immadures

Es va demostrar en ratolins transgènics en els que s'expressava una immunoglobulina IgM de superfície que reconeixia el MHC de classe I autòleg^{92,93}. En el moll d'ós dels animals es trobava un nombre normal de cèl·lules en estadi pre-B però no es desenvolupaven mai les cèl·lules B madures autoreactives. La majoria d'aquestes cèl·lules morien per apoptosi al moll d'ós i no arribaven mai a formar part de la població B madura circulant⁹².

1.2.3.2 Anèrgia immunològica

Es va observar a partir d'estudis similars als anteriors utilitzant dobles transgènics en els que s'expressava per una banda la proteïna soluble HEL (*hen egg-white lysozyme*) i per l'altra les dues cadenes d'un anticòs que reconeixia HEL⁹⁴. Les cèl·lules B maduraven però eren incapaces de respondre contra l'antigen i restaven en un estat d'anèrgia probablement per la manca de col·laboració de les cèl·lules T i per que el senyal via reconeixement pel seu BCR era molt dèbil, cosa que les feia altament susceptibles a la mort cel·lular mediada per CD95 quan presentaven antigen a cèl·lules T col·laboradores específiques. Per una altra banda també s'ha demostrat que quan se suministra ajut T a cèl·lules B anèrgiques que reconeixen DNA de doble cadena (dsDNA, autoantigen del lupus eritematós sistèmic), incrementa substancialment la producció d'autoanticossos⁹⁵.

1.2.3.3 Edició o correcció del receptor

Tant en els models transgènics com en les cèl·lules B normals, és conegut que la generació de receptors que reconeixen proteïnes autòlogues per la combinació de les cadenes pesades reordenades i les cadenes, no se segueix d'una deleció clonal sinó que té lloc un segon reordenament (reordenaments secundaris) de les cadenes lleugeres endògenes del BCR, de forma que pot variar l'especificitat de reconeixement inicial i les cèl·lules B que perden l'autoreactivitat poden ser recuperades. Aquest sistema de correcció de l'autoreactivitat⁹⁶ que té lloc en la transició de cèl·lula pro-B a cèl·lula B immadura, es coneix com edició o correcció del receptor i es va demostrar generant un ratolí H-2K^b transgènic que expressava una IgG específica de la molècula d'MHC de classe I H-2K^k i que reconeixia amb baixa afinitat H-2K^b. Quan es creuava amb ratolins H-2K^k o H-2K^b, les cèl·lules B transgèniques detectaven l'antigen rellevant no eren eliminades clonalment al moll d'ós sinó que aturaven la seva maduració fins que modificaven l'especificitat del seu receptor de superfície. El rol dels enzims RAG en els reordenaments secundaris o l'efecte derivat d'una recombinació a l'atzar estan per demostrar, però hi ha dades d'experiments *in vitro* que demostren la reinducció de RAG i recombinacions posteriors a un reconeixement antigènic via BCR en cèl·lules B transgèniques immadures derivades de moll d'ós^{97,98}.

1.2.4 Tolerància B perifèrica

En el procés de migració dels limfòcits B del moll d'ós cap als òrgans limfoides secundaris, les cèl·lules B encara immadures passen per dos estadis transicionals coneguts com: **T1 o cèl·lules de nova formació** i **T2 o cèl·lules naïve pre-madures**⁹⁹. En realitat hi ha molt poques cèl·lules immadures que aconseguen fer aquesta transició¹⁰⁰ (entre el 10-30%) que se sap que *in vitro* és controlada per BAFF (*B-cell-activating factor family*)¹⁰¹. La mida del compartiment de cèl·lules B en estadi transicional és variable i pot ser alterada per immunitzacions i infeccions, mentre que la de la població de B madures a la que donaran lloc finalment és estable. En tot cas, és en els òrgans limfoides secundaris on es desenvolupen els principals processos responsables de la tolerància B perifèrica.

1.2.4.1 Òrgans limfoides secundaris

1.2.4.1.1 Definició, distribució i estructura general

Els teixits limfoides secundaris (o perifèrics) són els llocs on s'inicia i es desenvolupa la resposta dels limfòcits als antígens i està organitzat en compartiments connectats que inclouen els ganglis limfàtics, la melsa, el teixit limfàtic associat a mucoses (MALT, que inclou les amígdales, els teixits limfoides associats als bronquis, GALT) i les plaques de Peyer. A més a més, trobem agregats poc estructurats de leucòcits localitzats en zones estratègiques d'entrada d'antígens estranys a l'organisme com els teixits connectius, en els tractes gastrointestinal, genitourinari i respiratori. Els òrgans limfoides secundaris contribueixen a mantenir la tolerància a antígens propis mitjançant processos de selecció negativa destinats a eliminar o silenciar cèl·lules B^{102,103} i T madures¹⁰⁴ que han escapat a la tolerància central.

Cada teixit limfoide té una arquitectura única, però tots ells comparteixen algunes característiques comunes. En general, els limfòcits T i B es troben segregats en dues àrees. L'àrea rica en cèl·lules T conté poques cèl·lules B i un nombre elevat de cèl·lules dendrítiques que són la font antigènica. Les àrees B contenen fol·licles primaris en els que tenen lloc les respostes immunològiques dependents de cèl·lules T i és on es desenvolupa el repertori final de les cèl·lules B madures. En aquests òrgans s'organitzen microambients dinàmics de diferenciació de cèl·lules B (centres germinals, GCs) que apareixen transitòriament en els fol·licles primaris durant la resposta immunològica¹⁰⁵. D'acord amb la compartimentalització, la segregació cel·lular i l'abast d'antigen, s'ha proposat que la localització geogràfica, la dosi i el moment d'exposició a l'antigen són les variables que determinen l'eficiència de la resposta⁷¹.

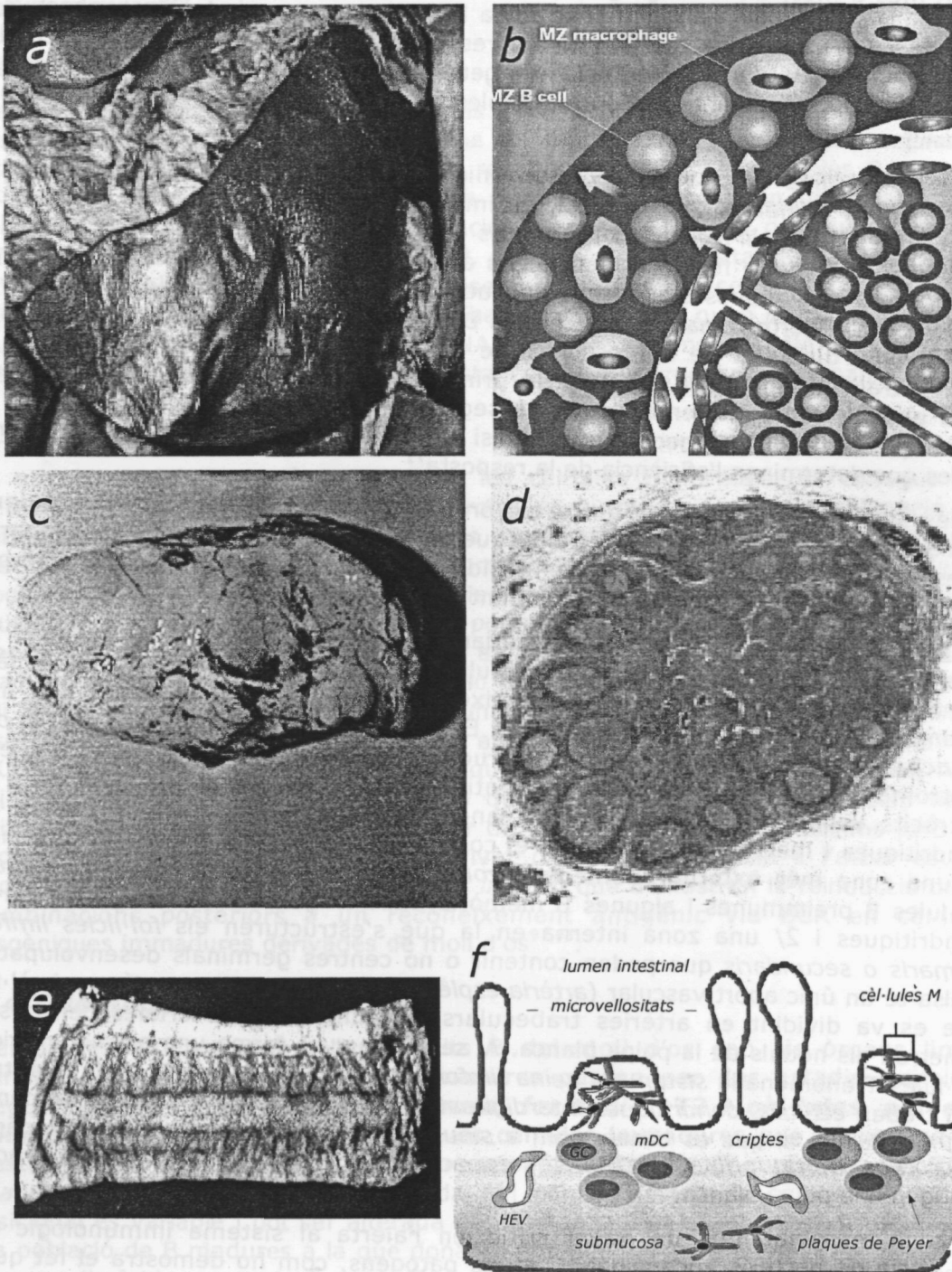
Tot i les similituds estructurals entre els òrgans limfoides secundaris, hi ha algunes particularitats que els fan ser únics. Donat que en la present tesi doctoral es compararan algunes estructures generades a les tiroides amb els nòduls limfoides i amb les amígdales palatines, en comentarem breument l'estructura:

- *La melsa:* és el teixit limfoide secundari més gran en l'home (s'hi troben el 25% dels limfòcits madurs), també és encapsulat però, a diferència dels nòduls limfàtics, les trabècules travessen i es distribueixen per tot l'òrgan, de forma que no es distingeix escorça de medul·la (figura 3). Està format per la *polpa vermella* i la *polpa blanca*. La polpa vermella té una estructura reticular composta per cèl·lules de l'estroma, macròfags i cèl·lules plasmàtiques i constitueix el principal filtre dels eritròcits vells o alterats. La polpa blanca, formada per *limfòcits T i B*, cèl·lules dendrítiques i macròfags, representa el compartiment limfoide organitzat que inclou: 1/ una zona més externa anomenada *zona marginal esplènica (SMZ)* formada per cèl·lules B preimmunes i algunes B memòria, macròfags de zona marginal i cèl·lules dendrítiques i 2/ una zona interna en la que s'estructuren els *fol·licles limfoides primaris o secundaris* que poden contenir o no centres germinals desenvolupats. La melsa té un únic aport vascular (*artèria esplènica*) pel qual arriben antígens i cèl·lules, que es va dividint en artèries trabeculars i finalment en arterioles centrals que penetren els nòduls de la polpa blanca. Al seu voltant es forma una estructura rica en cèl·lules T anomenada *sistema o veina limfoide periarteriolar (PALS)* en la qual també s'hi troben *cèl·lules dendrítiques interdigitants*. L'arteriola central després de penetrar el PALS forma el que es coneix com a *sinus marginal* al qual s'associa una capa de *macròfags metal·lofíl·lics (MOMA-1⁺)* especialitzats en la regulació de l'entrada de l'antigen a la polpa blanca.

La zona marginal juga un paper crític en l'alerta al sistema immunològic de la presència de bacteris encapsulats i altres patògens, com ho demostra el fet que els individus i animals asplènics són molt susceptibles a determinades infeccions bacterianes i els nadons tenen una baixa capacitat d'establir una resposta d'anticossos

contra polisacàrids bacterians que correlaciona amb l'aparició tardana de les cèl·lules B de zona marginal durant l'ontogènia¹⁰⁶.

Fig. 3 Aspecte exterior i estructura interna de: a-b) melsa humana, c-d) gangli limfàtic mesentèric i e-f) plaques de Peyer. Les imatges a, c i d han estat adaptades del text "Malignant catarrhal fever", vol 5.



- Els ganglis limfàtics: són petits òrgans *encapsulats* reniformes, situats en els trajectes dels vasos limfàtics regionals que permeten que la *limfa* que drena el teixit passi al seu través (*figura 3*). La càpsula de teixit conjuntiu que els recobreix emet *trabècules* de longitud variable cap al seu interior de forma que permet distingir una zona d'*escorça* i una zona de *medul·la*. La limfa ingressa al gangli via *vasos aferents* que travessen la càpsula i drenen l'interior d'un petit espai anomenat *sinus subcapsular*. Travessant l'*escorça*, passa a la *medul·la* pels *sinus medul·lars* delimitats pels *cordons medul·lars* i es reuneix a l'hili del gangli on neix un *vas eferent* pel qual la limfa l'abandona i torna a circulació. La zona de l'*escorça* interior, anomenada *paracortical*, té un dimàmetre de 100-1000 μ m i està constituïda per una àrea rica en cèl·lules T sense estructura definida i per una àrea rica en cèl·lules B que constitueix els *fol·licles limfoides primaris* (*primordis* quan no hi ha hagut estimulació prèvia) i que està altament organitzada. A partir dels fol·licles limfoides primaris es generen els *fol·licles secundaris* que contenen *centres germinals*. En la zona rica en cèl·lules T s'hi troben *cèl·lules dendrítiques* responsables de l'activació i maduració de les cèl·lules T a través de la presentació antigènica d'antígens T-èspecífics. De forma similar, a l'àrea fol·licular B es troben cèl·lules d'origen no limfoide (*cèl·lules dendrítiques fol·liculars*) capaces de mantenir immunocomplexos en la seva superfície mitjançant receptors especialitzats. La composició cel·lular dels cordons medul·lars és sensiblement diferent a la de l'*escorça*, de forma que majoritàriament estan formats per *macròfags* i *cèl·lules plasmàtiques*.

- El teixit limfoide associat a mucoses o MALT: que inclou les *plaques de Peyer*, *BALT*, *GALT* i d'altres (*figura 3*), té una estructura similar a la dels nòduls limfàtics, amb àrees T i B diferenciades i presència de fol·licles limfoides primaris i secundaris, però difereix en que l'arribada de l'antigen té lloc a través de l'epiteli, en el qual poden haver cèl·lules epitelials especialitzades en el transport antigènic (cèl·lules M a les plaques de Peyer).

1.2.4.1.2 Els endotelis, les molècules d'adhesió, les quimiocines i el homing dels leucòcits

La recirculació dels leucòcits cap als llocs d'inflamació i cap als òrgans limfoides secundaris està controlada per tal d'assegurar el reclutament i l'arribada als diferents teixits¹⁰⁷. Com ja hem comentat, l'extravassació dels leucòcits, que involucra interaccions entre un gran nombre de molècules d'adhesió cel·lular, es dona a través de regions de l'endoteli vascular de les vècules postcapilars de diversos òrgans limfoides. S'anomenen *vècules d'endoteli alt*¹⁰⁸ (HEV, *high endothelial venules*) i estan formades per cèl·lules endotelials especialitzades activades que presenten una morfologia cuboidal, unides entre elles per juncions interendotelials i la característica principal de les quals és la capacitat d'adhesivitat pel limfòcits. El desenvolupament i manteniment de les HEVs en els òrgans limfoides estan influenciats per citocines produïdes en resposta a la captura d'antígens (les HEVs no es desenvolupen en animals que creixen en ambients lliures de patògens), encara que també hi intervenen elements constitutivament expressats. El patró divers de molècules d'adhesió que expressen inclou E- i P-selectines, mucines i molècules de la família de les Igs. Algunes d'aquestes molècules d'adhesió tenen una distribució específica de teixit i s'anomenen *adressines vasculares* (VAs) donat que serveixen per dirigir l'extravassació de diferents poblacions de limfòcits recirculants a determinats òrgans limfoides. Així, les HEV dels nòduls limfàtics perifèrics expressen bàsicament PNA_d glicosilada i CD50 de tal forma que permeten una arribada tant dels limfòcits naïve com memòria via la unió L-Selectina/PNA_d i la unió LFA-1 i CD50. De forma similar, l'arribada a les HEVs dels nòduls limfàtics mesentèrics està dirigida per les mateixes interaccions i també pel reconeixement $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1, tant altament glicosilat com no. A les plaques de Peyer, MAdCAM-1 és l'únic lligand de les L-Selectines i sembla que el seu paper principal és reclutar la població $\alpha 4\beta 7$ naïve. També podria contribuir a l'extravassació ineficient de cèl·lules T memòria/efectores perifèriques.

A més de molècules d'adhesió, les HEVs també sintetitzen i secreten al seu entorn quimiocines (*figura 4*), les més importants de les quals des del punt de vista de la generació dels fol·licles limfoides són CCL21¹⁰⁹ i CCL19¹⁰⁹, que es comentaran al següent apartat. Els diferents patrons de recirculació de les poblacions limfocitàries estan dirigits per les interaccions entre molècules d'adhesió i per les interaccions quimiocina/receptor.

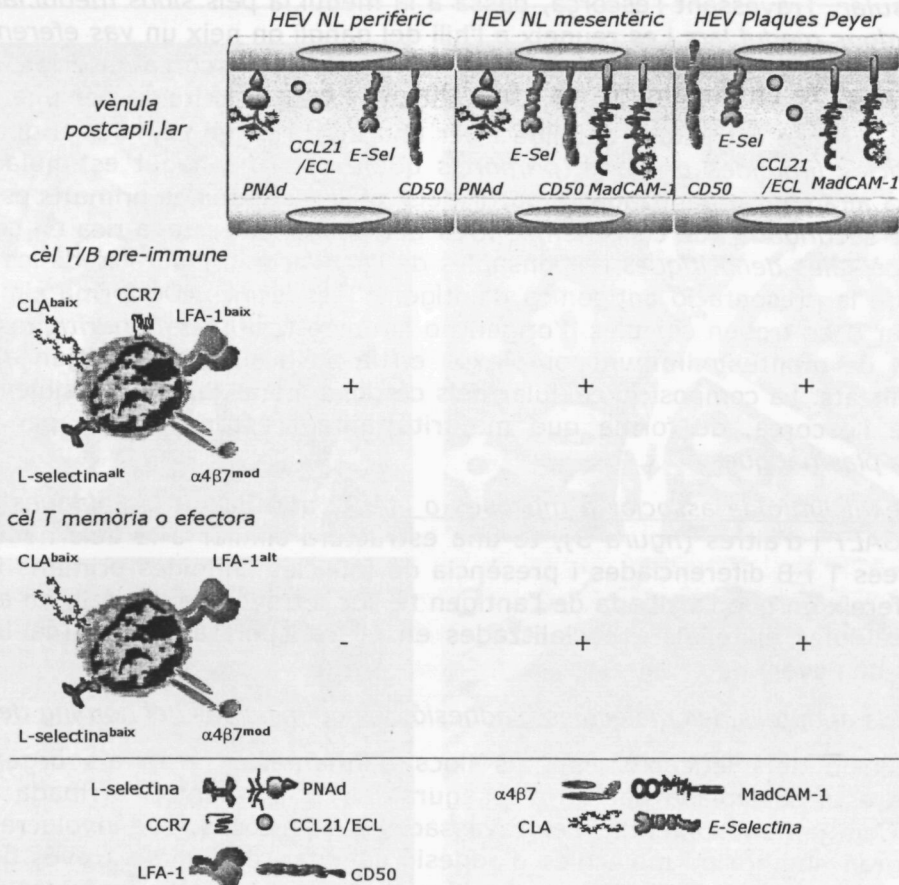


Fig. 4 Patró d'expressió diferencial d'algunes molècules d'adhesió involucrades en l'arribada dels limfòcits T pre-immunes i T memòria o efectores a les vècules d'endoteli alt (HEV) dels nòduls limfàtics perifèrics, mesentèrics i Plaques de Peyer. "+" indica capacitat de migració; PNAd, adreines de nòdul limfàtic perifèric; CLA, cutaneous-associated lymphocyte antigen; LFA, lymphocyte-associated molecule. A la part inferior de la figura es mostren les molècules d'adhesió i les quimiocines amb els seus lligands naturals.

Tenint en compte totes les molècules i estructures involucrades, el procés l'extravassació dels leucòcits (entre ells els limfòcits) es pot dividir en múltiples passos seqüencials (multistep process)¹¹⁰ anomenats: 1/ **enganxament** (*tethering*) i **rodolament** (*rolling*), 2/ **activació** per estímuls quimioatracients, 3/ **aturada i adhesió** i 4/ **transmigració** (*figura 5*). En l'*enganxament*, la interacció d'alta afinitat dels leucòcits amb les HEVs comença com a conseqüència d'una inflamació^{111,7} a través de l'expressió de selectines (L-selectina i/o E- i P-selectins) a la cara luminal de l'endoteli. Aquestes s'uneixen intermitentment amb les glicoproteïnes, provocant l'enganxament i posterior rodolament a favor del flux sanguini. La unió que provoquen és intermitent i, en absència de senyal continuat, la cèl·lula atura el rodolament i es desprèn. En aquest context, els factors

quimiotàctics expressats de forma permanent en l'endoteli o com a conseqüència de la presència de molècules involucrades en la resposta inflamatòria (IL-8, CCL4, PAF (*platelet-activating factor*), C5a, C3a, pèptids N-formil, etc), provoquen el reconeixement per part dels seus receptors i la senyalització d'activació via proteïna G. De forma similar actuen algunes quimiocines homeostàtiques com CCL21 i CCL22. El senyal induïx un canvi conformacional, l'activació i el clustering de les integrines prèviament formades en els leucòcits, que augmenta la seva afinitat de reconeixement dels lligands vasculars i permet l'adhesió ferma dels leucòcits a l'endoteli¹¹². El fenomen d'adhesió aparentment requereix la presència d'un nombre mínim de receptors de quimiocines per cèl·lula molt superior al necessari per induir quimiotaxi, per tant, la detecció de receptors de quimiocines en la superfície dels leucòcits no implica l'habilitat de l'esmentat leucòcit per adherir-se a l'endoteli vascular¹¹³. Finalment, certes interaccions, algunes d'elles homotípiques (com CD34 amb ell mateix) contribueixen a la migració trans-endotelial dels leucòcits. De forma equivalent, els limfòcits actuen amb fases similars per tal de facilitar la seva arribada als òrgans limfoides secundaris.

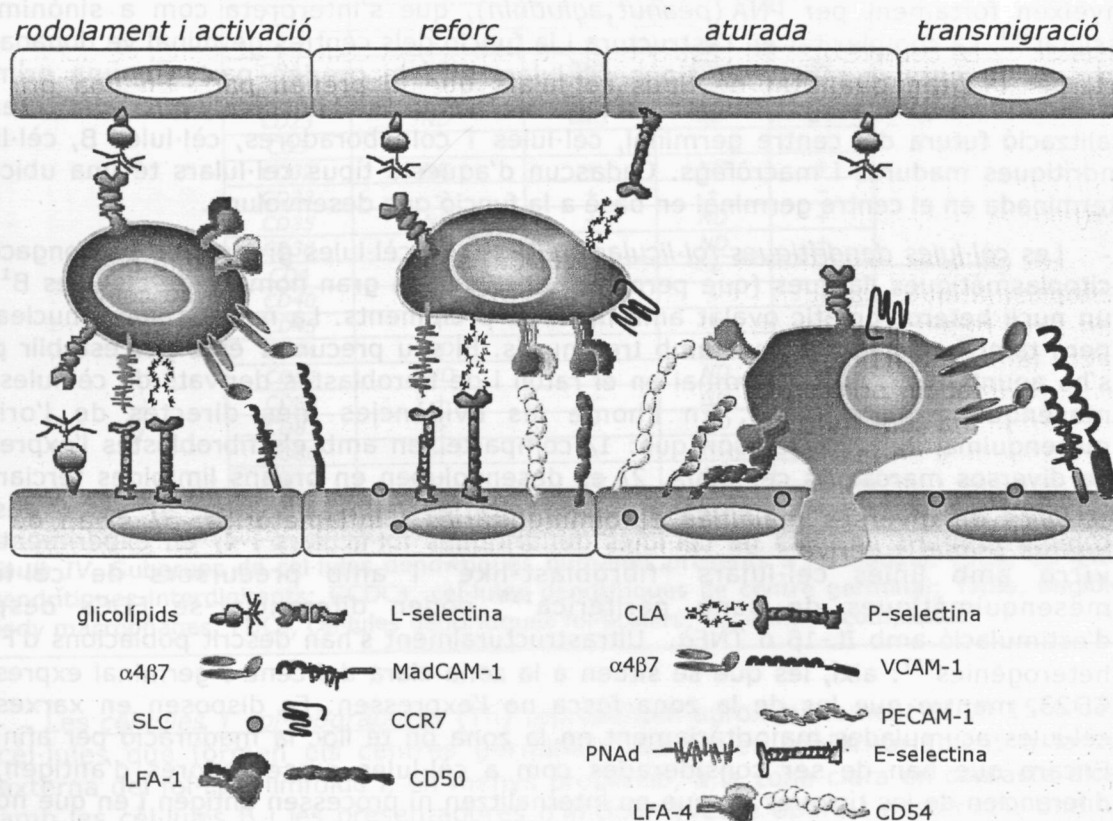


Fig. 5 Passos seqüencials classificats en rodolament i activació, reforç, aturada i transmissió que determinen la transmissió dels limfòcits. En cadascun dels apartats s'indiquen les molècules d'adhesió, quimiocines i receptors corresponents involucrats.

1.2.4.1.3 El fol·licle limfoide secundari i el centre germinal

Durant una resposta immunològica dirigida per antigen i mediada per cèl·lules T, és conegut que les cèl·lules B perifèriques madures s'enfronten a dos processos de control (*checkpoints*): 1/ mantenir-se com a cèl·lula B de baixa afinitat o diferenciar-se totalment a cèl·lula plasmàtica i 2/ sobreviure o entrar en apoptosi.

El primer punt de control sobre la diferenciació de les cèl·lules B naïve IgM⁺ té lloc després de l'activació, en la que les cèl·lules B poden madurar a cèl·lules plasmàtiques per tal de produir anticossos de baixa afinitat. De forma similar, en una segona etapa, després de la reacció de centre germinal, les cèl·lules B madures han de seleccionar entre el pas a cèl·lula plasmàtica d'alta afinitat productora d'IgG o el pas a cèl·lula B de memòria. I finalment, i contràriament a les dues situacions anteriors, l'activació de les cèl·lules B memòria condueix a la producció d'anticossos d'alta afinitat, però a la vegada intenta prevenir l'acumulació crònica de clons de cèl·lules B memòria vells (produïts per estimulacions repetides). La situació en la que els centres germinals juguen un paper principal és la segona, ja que aquestes estructures permeten la diversificació del repertori de cèl·lules B. Aquest procés porta implícit el perill de generar nous clons B autoreactius.

Estructura i composició

Aparentment, els centres germinals (CGs) no constitueixen àrees de tràfic, sinó que, en general, les cèl·lules B que els formen són una població no migratòria de cèl·lules que es tenyeixen fortament per PNA (*peanut agglutinin*), que s'interpreta com a sinònim de sessilitat¹¹⁴. La complexitat en l'estructura i la funció dels centres germinal ve donada, en part, per la gran quantitat de tipus cel·lulars que hi prenen part. En una primera classificació es poden agrupar en: cèl·lules dendrítiques fol·liculars, que defineixen la localització futura del centre germinal, cèl·lules T col·laboradores, cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques madures i macròfags. Cadascun d'aquests tipus cel·lulars té una ubicació determinada en el centre germinal en base a la funció que desenvolupa.

- Les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDCs) són cèl·lules grans amb perllongacions citoplasmàtiques llargues (que permeten abraçar un gran nombre de cèl·lules B¹¹⁵) i un nucli heterocromàtic ovalat amb nuclèols prominents. La majoria són binucleades però també se n'han descrit amb tres nuclis. El seu precursor està per establir però s'ha apuntat un origen estromal en el ratolí i de fibroblastes derivats de cèl·lules del mesènquima en humans. En l'home les evidències més directes de l'origen mesenquimal de les FDCs són que: 1/ comparteixen amb els fibroblastes l'expressió de diversos marcadors cel·lulars, 2/ es desenvolupen en òrgans limfoides terciaris o ectòpics en diverses malalties autoimmunitàries i inflamatòries, 3/ s'han descrit tumors primaris derivats de cèl·lules dendrítiques fol·liculars i 4/ en experiments *in vitro* amb línies cel·lulars "fibroblast-like" i amb precursors de cèl·lules mesenquimàtiques de sang perifèrica¹¹⁶ poden diferenciar-se FDCs després d'estimulació amb IL-1 β o TNF α . Ultraestructuralment s'han descrit poblacions d'FDCs heterogènies¹¹⁷: així, les que se situen a la zona clara del centre germinal expressen CD23, mentre que les de la zona fosca no l'expressen. Es disposen en xarxes de cèl·lules acumulades majoritàriament en la zona on té lloc la maduració per afinitat. Encara que han de ser considerades com a cèl·lules presentadores d'antigen, es diferencien de les típiques en que no internalitzen ni processen antigen i en que no els presenten via HLA classe II. Per tant, no expressen classe II pròpia en superfície però sí CD21 (CR2) i CD35 (CR1) que usen per unir immunocomplexes antigen/anticòs¹¹⁸ o iccosomes visibles al microscopi. Són capaces de mantenir-los en la seva superfície durant llargs períodes de temps després d'una immunització, la qual cosa permet la producció perllongada de clons de cèl·lules B memòria¹¹⁹. En general es considera que el seu fenotip és l'indicat a la *taula IV*. Les FDCs secreten CXCL13 que atrau cèl·lules B amb les que interaccionen via BCR(Ag-Ac-CD21), LFA-1/ICAM-1 i VLA-4/VCAM-1.

- Les cèl·lules dendrítiques madures (mDCs) són una població cel·lular d'origen hematopoiètic que es caracteritza pel seu aspecte gran i estel·lat amb perllongacions citoplasmàtiques eosinòfiles. Se situen principalment a la corona del fol·licle limfoide secundari o a la zona rica en cèl·lules T. Es distingeixen diferents subgrups de cèl·lules dendrítiques tant de llinatge mioelode com limfoide¹²⁰. Els darrers estudis (*taula IV*) suggereixen que en els centres germinals humans, les DCs poden classificar-se en: 1/

clàssiques o estromals (expressen DRC-1, Kim4 i 7D6) i 2/ cèl·lules dendrítiques de centre germinal o hemotopoiètiques (GCDCs) identificades com CD3⁺CD4⁺CD11c⁺¹²¹. Una darrera classificació dels subgrups de cèl·lules dendrítiques presents als centres germinals de l'amígdala descriu 5 subtipus diferents en funció dels marcadors d'activació/diferenciació (CD83, CD86, CMRF-44, CMRF-56, 4-1BB lligand): 1/ cèl·lules dendrítiques interdigitants (IDCs) HLA-DR^{alt}CD11c⁺, 2/ IDCs HLA-DR^{mod}CD11c⁺CD13⁺, 3/ IDCs HLA-DR^{mod}CD11c⁻CD123⁻, 4/ cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs) HLA-DR^{mod}CD11c⁻CD123⁺ i 5/ GCDCs HLA-DR^{mod}CD11c⁻CD13⁻¹²².

	IDCs	GCDCs	TBMs	FDCs
HLA-DR	<i>alt/moderat</i>	<i>moderat</i>	+	+
CD11b	ND	+	ND	+
CD11c	+/-	+	+	-
CD123	-			
CD13	-	+	+	-
CD14	-	-	ND	+
CD16				+
CD2	-	+	-	-
CD21	ND	<i>baix</i>	<i>baix</i>	<i>alt</i>
CD21L	-	-	-	+
CD23	ND	<i>baix</i>	ND	<i>alt</i>
CD3		-		
CD32	ND	+	ND	+
CD33	-	+	+	-
CD35	ND	+	ND	+
CD38	ND	+	ND	+
CD4	<i>baix</i>	+	+	-
CD40	<i>alt</i>	<i>baix</i>	+	+
CD45	+	+	+	-
CD44	ND	+	ND	+
CD54	ND	+	ND	+
CD80	+	-	ND	ND
CD83	+	-	ND	ND
CD86	+	-	ND	ND
IC	+	+	ND	+

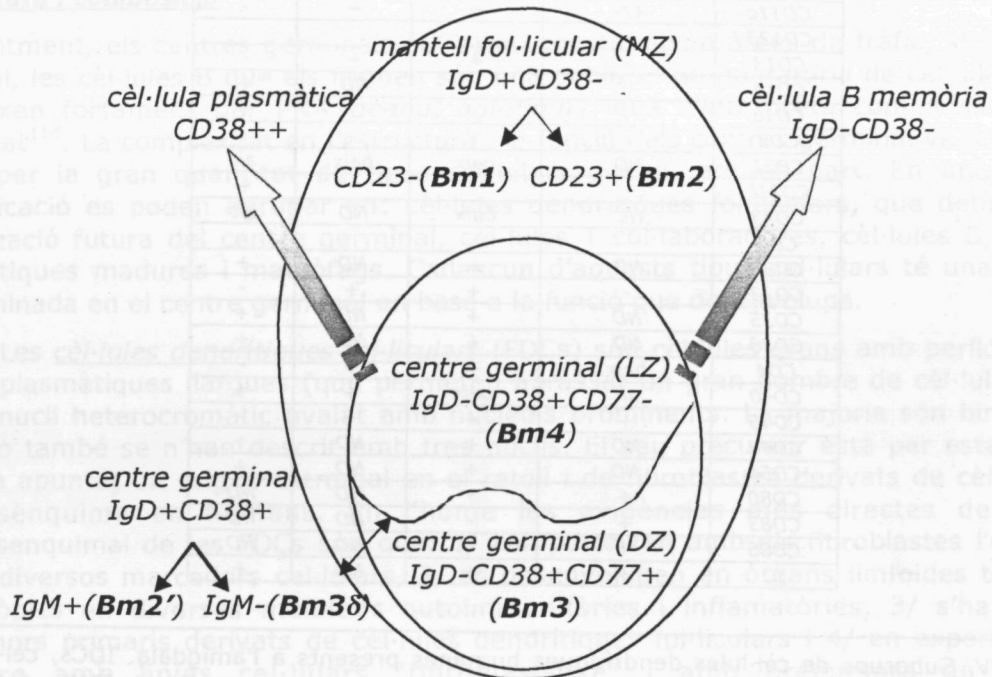
Taula IV. Subgrups de cèl·lules dendrítiques humanes presents a l'amígdala. IDCs, cèl·lules dendrítiques interdigitants; GCDCs, cèl·lules dendrítiques de centre germinal; TBMs, tingible body macrophages; FDCs, cèl·lules dendrítiques fol·liculars; IC, immunocomplexes.

- Les cèl·lules T col·laboradores (Th) representen aproximadament el 10-15% de les cèl·lules que formen els centres germinals. Se situen majoritàriament a la zona externa del fol·licle limfoide i, en menys proporció, a la zona clara en contacte directe amb les cèl·lules B i les presentadores d'antigen (veure apartat posterior). Una gran proporció són cèl·lules CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD40L⁺¹²³, però s'han descrit també cèl·lules CD3⁺CD8⁺. Són essencials en la formació del centre germinal, en la generació de cèl·lules B memòria i en el canvi d'isotip.

- La població B dels centres germinals als ganglis limfàtics és heterogènia i durant les dues darreres dècades se n'han descrit al menys 7 subgrups, tant pel que fa a característiques funcionals com estructurals. Una primera subdivisió es pot fer en funció de l'anàlisi dels gens de les IgV, que indica que les cèl·lules B fundadores del GC són predominantment policlonals (deriven de 10-20 clons) de centroblastes no mutats, mentre que la zona clara està formada per centròcits derivats de 3-5 clons mutats¹²⁴. En funció dels seus marcadors de superfície i a grans trets, en l'home es distingeixen les cèl·lules B naïve de mantell fol·licular (PNA^{baix}sIgD⁺CD38⁻) i les de centre germinal (PNA^{alt}sIgD⁻CD38⁺)¹²⁵. Cadascun d'aquests grups es divideix en subgrups en funció de la positivitat d'altres marcadors i s'agrupen sota la denominació "Bms" com es mostra a la *figura 6*. Pel que fa a l'expressió de gens relacionats amb la

susceptibilitat a la mort cel·lular programada, els centroblastes són cèl·lules B $CD95^+Bcl-2^-$, mentre que els centròcits són $CD95^-Bcl-2^+$.

Fig. 6 Esquema dels subgrups de cèl·lules B que s'observen a l'amígdala palatina i als ganglis establerts tant en ratolins com en humans en funció de marcadors de superfície cel·lular. Bm1 i Bm2 es defineixen per l'absència o presència de CD23, respectivament. El grup Bm3 (que ja ha regulat negativament la IgD de superfície i que és $CD77^+CD38^+$) es divideix en dos subgrups (Bm2' i Bm38) segons expressin o no IgM en membrana. En el grup Bm4 es perd l'expressió de CD77. DZ, dark zone; LZ, light zone.



A nivell de melsa, existeix una altra subpoblació de cèl·lules B $IgM^{alt}IgD^{alt}$ que expressa alts nivells de CD21, de la molècula d'MHC no clàssica CD1d i dels receptors de complement (CR1/2), que són les precursors de les cèl·lules B de la zona marginal $IgM^{alt}IgD^-CD23^-CD21^{alt}CD1d^{alt}$. En estudis *in vitro* s'ha demostrat que aquestes cèl·lules són més sensibles als mitògens com l'LPS¹²⁶ i que quan reconeixen antigen es diferencien ràpidament a cèl·lules secretores d'anticossos. La seva retenció a la zona marginal sembla deguda a la secreció local de quimiocines, ja que el tractament amb dosis baixes de toxina *pertussis* (PTX) causa la pèrdua d'aquestes cèl·lules B a la zona.

- La població de *macròfags* presents als fol·licles limfoides no és tampoc una població homogènia i, de fet, alguna subpoblació de macròfags és específica d'òrgan. En general podem distingir entre els *macròfags metal·lofíllics* (MM) i els *macròfags de la zona marginal* (MZM) esplènics i els *macròfags de l'interior dels centres germinals* que també es poden trobar als ganglis limfàtics. Els MZM són cèl·lules grans amb alta activitat fagocítica que formen una anella a la zona externa de la zona marginal i inicialment es van descriure per la seva habilitat en retenir i internalitzar polisacàrids haptens. Els MM són cèl·lules igualment grans però amb menys capacitat fagocítica, situades en un anell molt fi al sinus marginal i que tenen afinitat per la plata.

MOLÈCULES, INTERACCIONS I ESTRUCTURES INVOLUCRADES EN L'ORGANITZACIÓ FUNCIONAL DELS ÒRGANS LIMFOIDES SECUNDARIS

Molècules d'adhesió

Les molècules d'adhesió no només juguen un paper fonamental en l'arribada dels leucòcits als endotelis, sinó que participen en les interaccions entre les cèl·lules que formen els centres germinals (figura 7). Així, s'ha descrit que les cèl·lules dendrítiques fol·liculars expressen ICAM-1 i VCAM-1 (però són negatives per LFA-1, ELAM-1 i CD44)¹²⁷. Això els permet la interacció amb els centròcits per les unions LFA-1 amb ICAM-1 i VLA-4 (*very late antigen-4*) amb VCAM-1¹²⁸. Els contactes entre les cèl·lules B i les FDCs constituïrien un pre-requisit per aturar la maquinària apoptòtica^{127,129,130}. També s'han descrit interaccions adhesives entre cèl·lules B i T de centre germinal mitjançant el reconeixement LFA-1 a les cèl·lules B amb ICAM-1 a les T¹³¹.

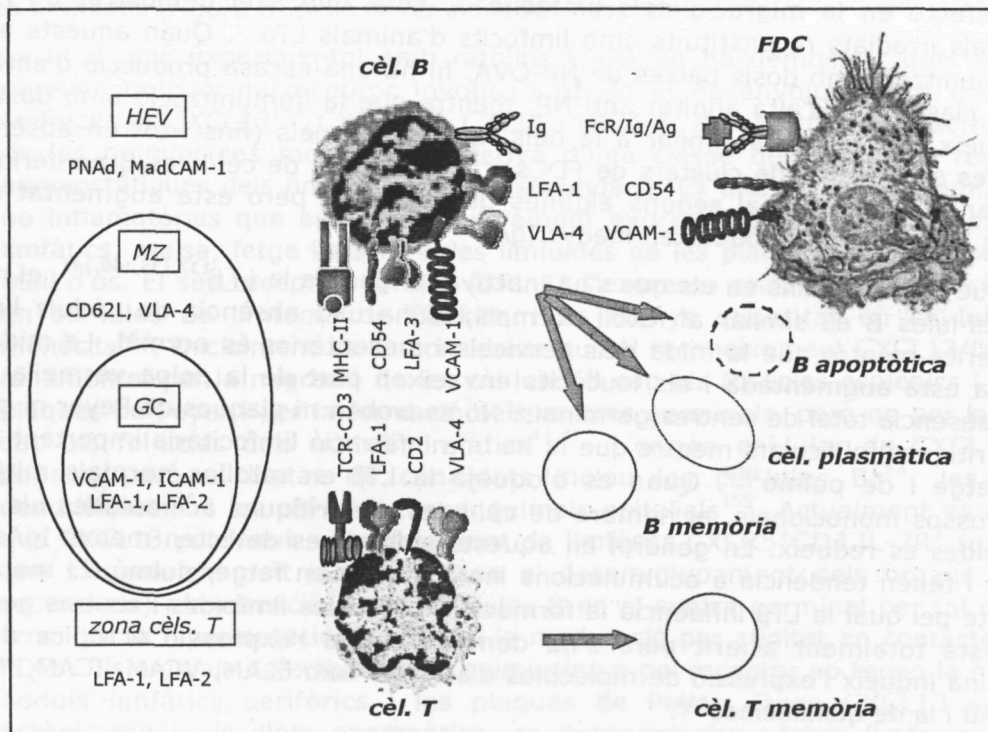


Fig. 7 Molècules d'adhesió i receptors involucrats en el reconeixement entre les cèl·lules B, cèl·lules T i cèl·lules dendrítiques fol·liculars als fol·licles limfoides secundaris.

Les citocines i els receptors de citocines

Hi ha varies citocines i receptors involucrats tant en l'estructuració directa dels òrgans limfoides secundaris com en l'emissió de senyals d'apoptosi o supervivència de les cèl·lules B. El seu paper s'ha determinat generalment amb l'ús d'animals transgènics, de knockouts i d'anticossos. Moltes d'aquestes citocines (Figura 8) pertanyen a la superfamília dels receptors del TNF, com són la limfotoxina alfa (LT α)¹³², LT β ¹³³, TNFRp55 (CD120a)¹³², TNFRp75 (CD120b)¹³⁴, LT β R¹³⁵, BAFF¹³⁶, TALL¹³⁷, TRANCE, TRANCE-r i TRAIL. Encara que en algunes ocasions el paper que desempenyen aquestes molècules siguin superponibles, les interaccions entre elles no són redundants i cadascuna juga un paper específic en la senyalització i la formació dels fol·licles limfoides^{138-142,143}. Donada la importància dels senyals que generen, en comentarem algunes a continuació:

- La limfotoxina (LT α o TNF β) i el factor de necrosi tumoral (TNF α) són homotrímerns que uneixen amb afinitats similars els seus respectius receptors TNFR-I i TNFR-II. A diferència del TNF α , la LT α (secretada per cèl·lules T CD4⁺ i cèl·lules B activades)

existeix en dues formes: com a heterotrímer ancorat a membrana ($\alpha 1\beta 2$) i com a homotrímer soluble ($\alpha 3$). La forma $\alpha 1\beta 2$ interactua amb el seu propi receptor $LT\beta R$ i es coneix com a $LT\beta$. Aquesta s'expressa en limfòcits activats, cèl·lules NK, timòcits i esplenòcits. El fet que la $LT\alpha$ i la $LT\beta$ comparteixin cadenes però senyalitzin a través de receptors diferents fa pensar que puguin produir diferents tipus de respostes.

El paper que juguen en la formació dels fol·licles limfoides ha estat estudiat mitjançant ratolins knockout $LT\alpha^{-/-}$ que manifesten absència congènita de nòduls limfàtics (LNs) i plaques de Peyer (PPs) i una estructura anormal dels fol·licles esplenics en els que no hi ha una separació zonal T/B. Tampoc no hi ha FDCs, ni centres germinals¹³⁸ ni macròfags metal·lofíllics a la zona marginal. Els nòduls limfàtics mesentèrics són pocs però amb segregació T/B. L'absència de LNs en aquests animals és deguda a un error en el desenvolupament dels òrgans més que a un defecte en la migració dels limfòcits¹⁴⁴, cosa que s'ha demostrat en ratolins normals irradiats reconstituïts amb limfòcits d'animals $LT\alpha^{-/-}$. Quan aquests animals s'immunitzen amb dosis baixes de NP-OVA, hi ha una escassa producció d'anticossos de la classe IgG d'alta afinitat anti-NP, mentre que la immunització amb dosis altes produeix una resposta similar a la dels ratolins normals (fins i tot en absència de centres germinals i de clusters de FDCs)¹³². El nombre de cèl·lules B perifèriques és similar al ratolí normal segons algunes publicacions, però està augmentat segons altres i, en general, produeixen menys IgA.

Pel que fa als ratolins en els que s'ha inactivat el gen de la $LT\beta$ ^{133,135,140,141}, el nombre de cèl·lules B és similar al ratolí normals, hi ha una absència de nòduls limfàtics perifèrics mentre que la mida dels cervicals i mesentèrics és normal. La mida de la melsa està augmentada i els leucòcits envaeixen part de la polpa vermella i hi ha una absència total de centres germinals. No es troben ni plaques de Peyer ni cèl·lules dendrítiques fol·liculars mentre que hi ha una infiltració limfocitària important a nivell de fetge i de pulmó¹⁴⁵. Quan es bloqueja la $LT\beta$ en ratolins normals mitjançant anticossos monoclonals, el nombre de cèl·lules dendrítiques acumulades als òrgans limfoides es redueix. En general en aquests animals es detecten menys IgAs i més IgMs i tenen tendència a acumulacions limfocítiques en fetge, pulmó. El mecanisme exacte pel qual la $LT\beta$ influencia la formació de fol·licles limfoides i centres germinals no està totalment aclarit però s'ha demostrat que l'expressió ectòpica d'aquest citocina induïx l'expressió de molècules d'adhesió com ELAM, VCAM, ICAM, MadCAM i PNAD i la de quimiocines¹⁴⁶.

- $TNFR-II$ s'expressa en limfòcits activats i en cèl·lules reticulars interdigitants, mentre que la producció de $TNFR-I$ es limita a les cèl·lules dendrítiques dels centres germinals, que a la vegada són la regió de màxima producció de $TNF\alpha$. Els animals $TNFR-I^{-/-}$ tenen un desenvolupament general normal però nòduls limfàtics sense centres germinals i la presència de plaques de Peyer és controvertida¹³². Els $TNFR-II$ KO¹³⁴ presenten una organogènesi dels nòduls limfoides aparentment normal.

- $LTbetaR$ és l'únic receptor conegut de $LT\beta$. Aquest receptor s'expressa tant en teixits no limfoides (pulmó, fetge, ronyó, cor, testicles i cervell) com en limfoides (nòduls limfàtics, timus i melsa) i atrau principalment cèl·lules dendrítiques. En els animals en que s'anul·la l'expressió de $LT\beta R$ hi ha un increment en el nombre total de cèl·lules T $CD4^+$, $CD8^+$ i de cèl·lules B. Juga un paper fonamental en l'estructuració dels nòduls limfàtics per què en els ratolins deficientes no se'n troben i els que es troben a la melsa no presenten zona marginal. A conseqüència, la maduració per afinitat de les cèl·lules B es veu pertorbada i, per tant, les respostes a antígens T-dependents. Tampoc s'ha descrit presència de plaques de Peyer.

- $TRANCE$ (*TNF-related activation-induced cytokine*; OPGL, RANKL o ODF) és un regulador del sistema immunitari, del desenvolupament ossi i de l'homeòstasi. A més d'expressar-lo els osteoblats estimulats *in vitro*, s'expressa en cèl·lules T activades i

dendrítiques madures, cosa que va suggerir que jugués un rol en la interacció T-DC durant la resposta immunitària. TRANCE media el seu efecte a través del seu receptor TRANCE-R (RANK). En els ratolins KO per aquesta molècula s'ha demostrat la seva implicació en la formació de fol·licles limfoides, però no en la generació de plaques de Peyer^{147,148}.

Altres citocines no participen en l'organogènesi, sinó en els processos propis de diferenciació de les cèl·lules B al centre germinal, com la IL-4 secretada per les cèl·lules T CD4⁺ que participa en el canvi d'isotip o la IL-10 que les diferencia a cèl·lules plasmàtiques.

Les quimiocines i els receptors de quimiocines

Fins el moment s'ha descrit un nombre força reduït de quimiocines i de receptors involucrats en el desenvolupament i la compartimentalització (segregació cel·lular) dels fol·licles limfoides (Figura 8) però el seu paper és essencial.

- La utilització experimental amb ratolins knockout ha demostrat que una de les parelles quimiocina/receptor involucrades en el desenvolupament dels òrgans limfoides és CXCL13¹⁴⁹/CXCR5¹⁵⁰. CXCL13 (BCA-1, *B cell attracting factor*) és una de les quimiocines més representativa d'una classe de citoquines reguladores homeostàtiques dels òrgans limfoides secundaris. És una quimiocina amb funcions no inflammatòries que està constitutivament expressada a alts nivells als ganglis limfàtics, melsa, fetge i als fol·licles limfoides de les plaques de Peyer però no en moll d'os. El seu receptor, CXCR5 (BRL-1) s'expressa principalment en cèl·lules B, en cèl·lules de limfoma de Burkitt, i en menys quantitat en cèl·lules T¹⁵¹ i monòcits¹⁵². Inicialment es va considerar que el reconeixement CXCL13/CXCR5 era fonamental per la migració de les cèl·lules B cap als fol·licles esplènics i cap a les plaques de Peyer i per la formació dels centres germinals, però no per la migració cap als fol·licles dels nòduls limfàtics^{41,42}. L'origen cel·lular de CXCL13 no es coneix, però el llistat de candidats inclou les cèl·lules B¹⁵³, les cèl·lules dendrítiques¹⁵⁴ i les cèl·lules mesenquimals epitelials¹⁵⁵. Actualment es considera que CXCL13 pot induir el reclutament de limfòcits CXCR5⁺CD3⁻IL-7R⁺ (que se sap que s'acumulen molt inicialment en el desenvolupament dels òrgans limfoides secundaris) i la retenció de les cèl·lules B en el centre germinal per tal que pugui tenir lloc la hipermutació somàtica i la maduració per afinitat en contacte amb les FDCs. Els animals defectius per la quimiocina o pel receptor no tenen la majoria de nòduls limfàtics perifèrics i les plaques de Peyer. Quan CXCL13 s'expressa ectòpicament als illots pancreàtics, es desenvolupen nòduls limfoides ectòpics d'una forma dependent de LTα1β2¹⁵³, però sense FDCs, la qual cosa sembla demostrar que aquesta quimiocina pot produir-se en absència d'aquestes cèl·lules¹⁵⁶. Estudis *in vitro* demostren que CXCL13 pot induir directament l'expressió de LTα1β2 en cèl·lules B en repòs i com que se sap que LTα1β2 pot induir l'expressió de CXCL13¹⁵⁷, això tanca un cercle creant un feed-back positiu que s'ha suggerit com a necessari en el desenvolupament dels fol·licles limfàtics. Se sap que les cèl·lules de l'estroma fol·licular dels ratolins knockout per TNF, TNF-R, LTα i LTβ no expressen CXCL13¹⁵⁷. El tractament dels animals adults normals amb antagonistes de LTβ té el mateix efecte pel que fa a l'expressió de CXCL13/CXCR5 i, a més, també es troba reduïda la de CCL21. La utilització d'animals doblement deficientes en CCR7 i CXCR5 alhora recentment ha demostrat que ambdós receptors presenten algunes funcions que es complementen pel que fa a l'organogènesi dels òrgans limfoides i en la seva organització, donat que en aquests ratolins defectius¹⁵⁸ no es desenvolupen nòduls limfoides perifèrics i en la melsa i en els ganglis mesentèrics (que sí que existeixen) no es desenvolupen fol·licles limfoides degut a una manca de migració de les cèl·lules B.
- CCL19 (MIP-3β, *macrophage-inflammatory chemokine*)¹⁵⁹ i CCL20 (MIP-3α)¹⁶⁰, malgrat el seu nom, són dues quimiocines candidates a dirigir o participar en la

migració de les cèl·lules B, T i dendrítiques als fol·licles limfoides dels ganglis ja que indueixen quimiotaxi en aquestes cèl·lules.

- **CXCL12** (*SDF-1, stromal cell-derived factor*) és la quimiocina que està més altament conservada en l'evolució (un únic aminoàcid diferent entre la forma humana i murina)¹⁶¹ i es considera una de les més primitives. Forma part del grup de quimiocines amb funció homeostàtica crítica pel *homing* i l'angiogènesi, més que del grup de quimiocines proinflamatories⁸⁹. Té una homologia de seqüència equidistant a les CXC i CC quimiocines i el gen que la codifica es localitza al cromosoma 10. CXCL12 l'expressen molts tipus cel·lulars de diferents teixits i té efectes quimiotàctics sobretot en cèl·lules T, cèl·lules B i megacariòcits¹⁶², encara que també sobre una gran varietat de tipus cel·lulars, degut a l'extensa distribució del seu únic receptor (CXCR4)¹⁶³. CXCL12 s'expressa abundantment en òrgans limfoides secundaris i, tant les cèl·lules preimmunes com les memòria responen, mentre que les cèl·lules B de centre germinal no ho fan. Això explica que un cop les cèl·lules B han estat activades, les cèl·lules que envolten el centre germinal expressen CXCL12, que probablement les atrau cap enfora seguint un gradient positiu. Com s'ha comentat anteriorment, el reconeixement CXCL12/CXCR4 és essencial per la vida: ratolins knockout per la quimiocina o pel seu receptor moren poc després del naixement^{47,164} i presenten defectes hemotopoiètics, nerviosos i vasculars. En aquests ratolins, el nombre de cèl·lules B precursors està molt disminuït en el fetge fetal i en el moll de l'ós i es troben anormalment incrementades en sang. Els granulòcits també estan incrementats en sang però són immadurs, cosa que indica que són alliberats prematurament a la perifèria.

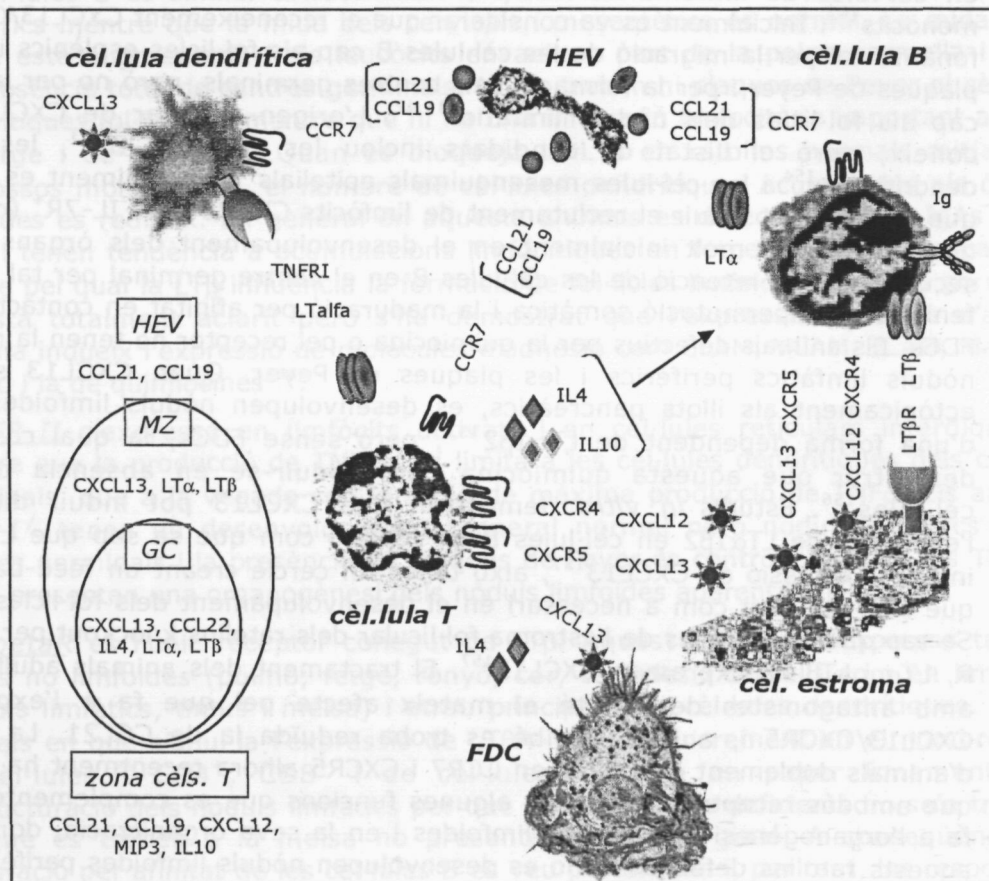


Fig. 8 Quimiocines, citocines i receptors involucrats en el reconeixement entre les cèl·lules B, cèl·lules T, cèl·lules dendrítiques madures, dendrítiques fol·liculars i cèl·lules de l'estroma als fol·licles limfoides secundaris.

- CCL22 (MDC, *macrophage-derived factor*) és una quimiocina que és codificada al cromosoma 16 molt propera a TARC amb la que presenta un 37% d'homologia de seqüència proteica. Inicialment va ser descrita en macròfags (però no en monòcits) i posteriorment en algunes cèl·lules epitelials (enteròcits⁴⁷), cèl·lules dendrítiques derivades de macròfags i cèl·lules natural killer⁴⁸. Produeix el seu efecte via CCR4 i està involucrada en la formació de clusters de cèl·lules T i dendrítiques en les cèl·lules epitelials inflamades i en els teixits limfoides secundaris⁴⁹, en timus, en budell prim i en pulmó. Els nivells sèrics de la quimiocina es troben elevats en algunes malalties com la dermatitis atòpica⁵⁰. És la quimiocina expressada en els fol·licles limfoides secundaris menys estudiada. Se sap que és produïda per les cèl·lules dendrítiques madures i que indueix la segregació dels limfòcits en zones riques en cèl·lules T i B¹⁶⁵.

- CCL21 (SLC, *secondary lymphoid chemokine*) es troba constitutivament a nivell proteic en les HEVs dels òrgans limfoides secundaris i en cèl·lules endotelials de fetge i budell prim⁵¹. Se situa al cromosoma 9 i també s'anomena 6C-kine perquè presenta dues cisteïnes C-terminal⁵³. Indueix ràpidament (en segons) l'adhesió de les T naïve a ICAM-1 i promou la transmigració dels limfòcits T recirculants cap als òrgans limfoides secundaris⁵². Juntament amb CCL19 dirigeix el homing de timòcits, cèl·lules T naïve¹⁰⁹, cèl·lules dendrítiques¹⁶⁶, i amb menys eficiència cèl·lules B¹⁰⁹ als teixits limfoides. El paper d'aquesta quimiocina s'ha estudiat en ratolins *plt* (paucity of lymph node T cell) descrits pel grup de Nakano i col·laboradors¹⁶⁷ en els que hi havia una manca de homing de les cèl·lules T. Presenten un defecte genètic al cromosoma 4 que és el mateix en el que mapa CCL21. En aquests ratolins no es troba missatge per CCL21 (i només parcialment CCL19) a les cèl·lules estromals encara que la seva seqüència intrònica i exònica sigui normal. Com a conseqüència, les cèl·lules dendrítiques no s'acumulen a la zona rica en cèl·lules T dels ganglis limfàtics i de la melsa i encara que siguin reconstituïts amb cèl·lules T normals⁵⁴ no són capaços d'estructurar correctament els fol·licles limfoides. CCL21 és reconeguda per CCR7¹⁶⁸, que a la vegada també reconeix CCL19/MIP-3β/Exodus-3/ELC. La seva expressió s'ha demostrat en cèl·lules T i en cèl·lules dendrítiques madures i augmenta després de l'activació amb anti-CD3. Tant les cèl·lules memòria (CD45RO+) com les cèl·lules naïve (CD45RA+) CD4+ o CD8+ poden ser CCR7+¹⁶⁹, de forma que es poden distingir dues poblacions de cèl·lules T: CCR7- o memòria (CD45RA-CCR7-) amb funcions efectores i que poden migrar cap als teixits inflamats i les CCR7+ (CD45RA-CCR7+) que requereixen un estímul secundari abans d'esdevenir efectores. Així com la ràpida adhesió de les cèl·lules T a l'endoteli requereix el reconeixement CCL21/CCR7 per arribar als òrgans limfoides secundaris, l'adhesió de les cèl·lules B no és tan dependent, ja que en ratolins *plt* les cèl·lules B estan en quantitats relativament normals¹⁷⁰. Així, sembla que el reconeixement CCL21/CCR7 facilita el reclutament i la retenció de les cèl·lules T als òrgans limfoides secundaris, pas que és crític per una exposició eficient de les cèl·lules T als antígens.

- S'ha descrit una altra quimiocina, CCL18 (DC-CK1/PARC), que també atrau cèl·lules T naïve¹⁷¹. S'expressa en una subpoblació de cèl·lules dendrítiques humanes dels centres germinals en contacte amb les cèl·lules T d'amígdala, melsa i gangli limfàtic¹⁷². S'ha postulat que, inicialment, CCL21 podria dirigir les cèl·lules T naïve cap als nòduls limfàtics a través de les vècules d'endoteli alt i que posteriorment PARC les guiaria cap als centres germinals.

Altres molècules

1. MOLÈCULES RELACIONADES AMB SENYALS DE COESTIMULACIÓ

- LIGHT (HVEM-L, TNFSF14) és un lligand del TNF present a la superfície de les cèl·lules T activades i que és reconegut pel LTβR¹⁷³ en les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i en les cèl·lules estromals. També s'expressa a cèl·lules dendrítiques

immadures on reconeix dos receptors addicionals: HVEM (herpes virus entry mediator) i DcR3 (decoy receptor)¹⁷⁴ que actua com a receptor regulador negatiu. LIGHT juga un paper important en l'activació de les cèl·lules T¹⁷⁵ i promou la selecció negativa tímica¹⁷⁶. No és essencial en l'homeòstasi de les cèl·lules T però s'ha demostrat en animals deficients en aquesta molècula¹⁷⁷ la manca de coestimulació T-B en ganglis mesentèrics. La seva sobreexpressió en perifèria dona lloc a l'expansió i activació de les cèl·lules T i al desenvolupament de síndromes autoimmunitàries^{178,179} i el tractament d'animals NOD amb anticossos LIGHT-Fc, minva la incidència de diabetes. Això suggereix que l'expressió transitòria de LIGHT és important en l'activació de les cèl·lules T, però que desregulada condueix a la pèrdua de tolerància.

- OX40L es troba en cèl·lules presentadores d'antigen activades, com cèl·lules B, macròfags, endotelials i dendrítiques¹⁸⁰. S'uneix a OX40 (CD134) que és un receptor del TNF expressat transitòriament en cèl·lules T activades després que han reconegut antigen via TCR. Encara que no és essencial en la formació del centres germinals, OX40 és necessari per la producció d'anticossos depenent de cèl·lula T¹⁸¹. L'excés de senyalització via aquesta molècula pot trencar la tolerància T i, a l'inrevés, la inhibició de la interacció OX40-OX40L té efectes protectors en models animals d'encefalomielitis autoimmunitària experimental (EAE), inflammatory bowel disease (IBD) i artritis reumatoide¹⁸⁰ (RA).

2. MOLÈCULES RELACIONADES AMB EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

- BAFF (BlyS, TALL-1, THANK, TNFSF13B, zTNF4)^{137,182} un dels darrers membres descrits de la família del TNF, és un homotrímer que es troba a la superfície cel·lular en forma de proteïna transmembrana de tipus II o secretada en forma soluble després de processament¹⁸³. L'expressen i secreten macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T i la seva expressió és modulada per IFN γ i per IL-1. La seva seqüència aminoacídica és molt similar a la d'APRIL (proliferation-inducing ligand) que s'expressa a baixos nivells en cèl·lules limfoides i a alts nivells en cèl·lules tumorals¹⁸⁴. Va ser identificat originàriament com un coestimulador potent de la proliferació i la producció d'Ig per part de les cèl·lules B. Poc després es va observar en animals transgènics que un excés de BAFF resultava en un increment del nombre de cèl·lules B madures, generació espontània de centres germinals, presència de dipòsits d'Igs en ronyó i en un procés autoimmunitari amb característiques similars a les del lupus eritematós sistèmic (SLE) humà¹⁸⁵. A la vegada, la manca de BAFF resulta en una pèrdua gairebé completa de les cèl·lules B fol·liculars i de la zona marginal, mentre que les B immadures no s'afecten, cosa que indica que el bloqueig en el desenvolupament d'aquestes cèl·lules té lloc a l'estat transicional T1, per tant suggereix que l'estat transicional T2 és la primera diana d'acció de BAFF. Contràriament al que es podria esperar, però, la immunització d'animals amb immunoglobulines Fc-BAFF, no inhibeix la formació de centres germinals ni la hipermutació somàtica, encara que aquests desapareixen més ràpidament, no presenten una xarxa de cèl·lules dendrítiques fol·liculars típica i les respostes d'anticossos d'alta afinitat es veuen atenuades¹⁸⁶. Aquesta molècula no només s'ha estudiat en models animals, sinó que també s'han determinat els nivells incrementats de BAFF circulant en el sèrum de malalts amb malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide¹⁸⁷ (RA), el SLE¹⁸⁸ i la síndrome de Sjögren¹⁸⁹ (SS). És reconegut específicament per tres receptors de la família del TNF-R: BCMA (B-cell maturation antigen)^{190,191} que té una expressió restringida a cèl·lules B i TACI¹⁹² que, a més, també es troba a les cèl·lules T activades. Els estudis amb ratolins knockout per BCMA demostren que els animals tenen un fenotip normal, mentre que els deficients en TACI tenen un nombre incrementat de cèl·lules B madures i d'immunoglobulines. Mitjançant el cribatge d'una genoteca d'expressió s'ha resolt aquesta paradoxa amb el descobriment d'un nou receptor de BAFF, BAFF-R¹⁹³, que no només és cèl·lula-B-específic, sinó que no té cap altre

l·ligand conegut. Quan aquest receptor es muta, com en el cas del ratolí A/WySnJ, hi ha una absència total de cèl·lules B perifèriques, que indica que la senyalització a través de BAFF intervé en el manteniment d'aquestes cèl·lules, mentre que la injecció de BAFF recombinant en ratolins augmenta els nivells d'Igs i el nombre de cèl·lules B madures. El nombre de cèl·lules B-1 no s'afecta en els animals knockout per BAFF.

3. MOLÈCULES REGULADORES DE L'APOPTOSI

- *Bcl-2*. És el membre fundador de la família de factors antiapoptòtics que va ser identificat per la seva freqüència de translocació en els limfomes fol·liculars i per la seva associació amb la supervivència de les cèl·lules hematopoiètiques¹⁹⁴. No hi ha un consens sobre els mecanismes d'acció precisos, però se sap que protegeixen els mitocondris de les proteïnes de mort i influencien altres activitats cel·lulars com la de les ciclines¹⁹⁵. Expressat com a transgen en ratolins, redueix el nivell d'apoptosi en els centres germinals i provoca l'augment de cèl·lules B memòria amb una freqüència baixa de mutacions somàtiques¹⁹⁶ (fins i tot les que codifiquen per canvis que milloren l'afinitat). Per contra, els animals *Bcl-2*^{-/-} presenten defectes severes en la producció de limfòcits T i B i en el nombre de limfòcits perifèrics i poliquistosi renal¹⁹⁷ a partir del primer mes.

- *CD95* (Fas/APO-1)-*CD178* (CD95L o Fas ligand). CD95 és una molècula de superfície cel·lular glicosilada, de 45-52kDa, que pertany a la família del TNF tipus I i que s'expressa en forma de trímer. Per splicing alternatiu es pot generar una forma soluble¹⁹⁸. Indueix apoptosi per activació de la cascada de caspases després del reconeixement del seu l·ligand CD178¹⁹⁹, que és una molècula de la família del TNF transmembrana tipus II amb un patró de distribució molt més restringit que el de CD95. En ratolins s'han identificat diverses mutacions de Fas i FasL que condueixen a trastorns immunològics per disfunció en l'apoptosi²⁰⁰: a/ al ratolí, la mutació recessiva *lpr* que es manifesta per limfoproliferació i que és molt similar al lupus eritematós sistèmic; b/ el model *lpr*^{cg} que presenta una mutació puntual al domini intracel·lular de mort de CD95; c/ el ratolí *gld* amb una mutació puntual al domini carboxi-terminal de CD178. En aquests animals, el nombre total de limfòcits (tant CD3⁺ com CD19⁺) i la mida dels nòduls limfoides estan incrementats i la histologia dels fol·licles limfoides de ganglis i de melsa alterada. Les cèl·lules B expressen CD95 en diferents etapes de la seva maduració, però la contribució del sistema CD95/CD178 en l'eliminació de les cèl·lules B perifèriques autoreactives o amb baixa afinitat per l'antigen generades després de la hipermutació somàtica està en discussió, encara que es coneix que les cèl·lules B de centre germinal expressen CD95²⁰¹ i en molt menor proporció són CD178⁺, a diferència dels limfòcits T CD45RO CD178⁺ de centre germinal²⁰². CD95 s'ha involucrat en el desencadenament de la tiroiditis de Hashimoto^{76,203} i de la diabetis humana depenent d'insulina²⁰⁴ i en models animals d'autoimmunitat⁷⁷.

4. MOLÈCULES RELACIONADES AMB ELS REORDENAMENTS GÈNICS I AMB EL CANVI D'ISOTIP

- *Interacció CD40-CD154*. És sabut que la interacció entre CD40, expressat a les cèl·lules B constitutivament, en cèl·lules dendrítiques i en monòcits amb CD154 (CD40L) de la superfície de les cèl·lules Th activades, és indispensable per la generació d'una resposta B eficaç. Entre d'altres fenòmens, el seu paper fonamental en la hipermutació somàtica i el canvi d'isotip es va descobrir en malalts amb la síndrome d'hiper-IgM l·ligada al cromosoma X (X-linked HIGM syndrome, HIGM1), en els que es va descriure una mutació en el gen que codifica per CD154^{205,206,207,208,209}. Com a conseqüència del defecte d'activació en trans, les cèl·lules B dels malalts eren incapaces de proliferar, de formar centres germinals en els òrgans limfoides i de fer canvi d'isotip (CSR) *in vivo*. Les cèl·lules B, però, eren intrínsecament normals de forma que es podia induir la producció *in vitro* d'IgA, IgE i IgG normalment amb agonistes de CD40. Aquestes observacions, juntament amb les que es van fer amb

ratolins CD154^{-/-}, van demostrar que la interacció CD40/CD40L era absolutament necessària en la maduració del limfòcit B. Cal també comentar que les cèl·lules B IgM⁺IgD⁺ dels malalts amb síndrome HIGM1 expressen CD27 (considerat un marcador de cèl·lula B memòria) i presenten hipermutacions somàtiques (SHM)²¹⁰, la qual cosa suggereix que aquest darrer fenomen pot tenir lloc en absència d'interacció CD40/CD154. Aquest subtipus de cèl·lula B també podria estar relacionat amb les cèl·lules B esplèniques de la zona marginal que presenten semblances fenotípiques. S'ha descrit recentment l'existència de malalts amb síndrome HIGM3²¹¹ en els que CD40 no s'expressa ni en cèl·lules B ni en monòcits degut a una delecció homocigòtica del cinquè exó del gen que presenta un fenotip molt similar al del ratolí CD40^{-/-}.

- AID (*activation-induced cytidine deaminase*)²¹². Una altra síndrome, HIGM2²¹³, que presenta una herència autosòmica recessiva, és la que es presenta en malalts amb una susceptibilitat peculiar a les infeccions bacterianes però no oportunistes amb uns nivells sèrics d'IgA i IgG reduïts i d'IgM incrementats. El gen que codifica per CD154 és normal i la proteïna és present en la superfície dels limfòcits T CD4⁺ activats. Per contra, les seves cèl·lules B presenten un defecte intrínsec degut a que no fan canvi d'isotip *in vitro* en presència d'agonistes de CD40²¹⁴ i són CD27⁺ però no presenten hipermutacions somàtiques. Aquests individus presenten òrgans limfoides secundaris engrandits amb centres germinals gegants plens de limfòcits B en proliferació que co-expressen IgM, IgD i CD38 (fenotip similar al de les cèl·lules fundadores dels CGs). Mitjançant estudis de segregació de marcadors de microsatèl·lits polimòrfics es va determinar que el gen AID era responsable de la síndrome, cosa que es va confirmar amb l'ús de ratolins AID^{-/-} als quals s'associaven principalment tres defectes: CSR defectuosa, SHM defectuosa i gegantisme dels centres germinals dels òrgans limfoides secundaris²¹⁵. Finalment s'han clonat les formes murina i humana d'AID, amb una homologia del 96% i del 100% en el domini citidina-deaminasa i s'ha demostrat que és una molècula d'expressió restringida a les cèl·lules B de centre germinal amb activitat citidina-deaminasa. La seva absència provoca que les cèl·lules B no facin hipermutació somàtica ni canvi d'isotip encara que existeixin centres germinals. Recentment alguns grups han demostrat la presència de "breaks" en la doble cadena de DNA durant el procés d'hipermutació somàtica^{216,217,218} i també durant el canvi d'isotip^{219,220}, cosa que suggereix que AID pot jugar un paper comú com a endonucleasa en ambdós fenòmens.

- Obf-1/Oca-B/Bob1 (*Oct binding factor*). És un factor de transcripció específic dels limfòcits B que està relacionat amb la transcripció dels gens de les immunoglobulines. El seu paper es va definir *in vivo* utilitzant cèl·lules embrionàries en les que s'havia eliminat el gen OBF-1. El ratolí resultant neixia normal i reordenava correctament les Igs però presentava una reducció en el nombre de cèl·lules B madures i una reducció severa de les circulants però amb diferenciació normal. Els nivells d'IgGs sèriques estaven reduïts i després d'una immunització amb antigens T-dependents no es formaven centres germinals²²¹.

- RAG1 i RAG2 (*Recombination-activating genes*)²²². La transcripció dels dos gens es regula coordinadament i el seu producte catalitza les recombinacions V(D)J²²³ en cèl·lules B i T. El mecanisme d'acció exacte és desconegut però s'accepta que reconeixen les seqüències senyal de recombinació (RSSs) en el DNA genòmic (motius d'heptàmers i nonàmers) que flanquegen les regions gèniques dels receptors antigènics^{222,224,223}. Els enzims heterodimèrics codificats introdueixen forats en la doble cadena de DNA (double-stranded breaks, DSBs) que generen extrems 3'-OH i la formació de plec (nances). La seva activitat és essencial i la manca o pèrdua d'un dels dos, tant en models animals com en humans, afecta profundament la limfopoiesi^{225,226,227} de forma que els animals defectius en RAG1²²⁵ o RAG2²²⁶ no presenten limfòcits T o B madurs perifèrics. A la inversa, l'expressió desregulada de RAG s'ha implicat en transformacions malignes tant de cèl·lules T com B. Els nivells

de mRNA de RAG en les cèl·lules T i B varien durant el desenvolupament^{228,229} i els nivells proteics de RAG2 estan regulats per un mecanisme relacionat amb la seva desestabilització per fosforilació. Inicialment es va descriure que l'expressió de RAG1 i 2 estava restringida a cèl·lules pre-T²³⁰ i pre-B²²⁹ però posteriorment dos grups van demostrar la seva re-expressió en limfòcits de centre germinal humà^{231,232}, en cèl·lules mononuclears de decidua²³³, en cèl·lules B madures activades de ratolí²³⁴ i en cèl·lules T humanes perifèriques²³⁵.

- *NEHJ* (*nonhomologous end-joining*). La relligació dels forats produïts per RAG està mediada per les proteïnes d'expressió ubíqua NHEJ, de les quals se n'han descrit tres (DNA-PKcs, DNA ligase IV i XRCC4)²³⁶, que s'encarreguen també de les reparacions generals de les cadenes de DNA. La deficiència/manca de qualsevol d'aquestes proteïnes de junció causa el fenotip d'immunodeficiència severa combinada²³⁷ (SCID).

- *TdT* (*terminal deoxynucleotidil transferase*)²³⁸. És l'enzim que inserta nucleòtids-N a les junctures tant del receptor de la cèl·lula T com de les cadenes pesades dels gens de les immunoglobulines d'una forma independent del "motllo" de DNA. Inicialment es va descriure en limfòcits T i B immadurs però posteriorment es va demostrar en cèl·lules B de centres germinals. La seva diana són els segments gènics monocadena i la seva acció contribueix a variar el segment CDR3 de reconeixement antigènic i, per tant, a l'augment de la diversitat dels receptors. Els animals defectius en aquesta molècula presenten TCR i BCR sense regions-N de diversitat²³⁹, menys diversificació dels seus receptors però respostes immunològiques normals quant a eficiència i especificitat²⁴⁰.

- *hBRAG* (*human B cell RAG associated-gene*)²⁴¹. És una proteïna transmembrana tipus II, dimèrica i possiblement trimèrica amb 4 llocs de glicosilació, encara que també se n'ha demostrat una forma no glicosilada. S'expressa a baixos nivells com a molècula de superfície donat que no presenta senyal de retenció al reticle endoplasmàtic. Es troba preferencialment a les cèl·lules limfoides, sobretot a les cèl·lules B i se suposa que funciona com a receptor de senyalització i que media canvis en la fosforilació després de ser cros-linkat sol o quan és cros-linkat el BCR. La seva seqüència és molt conservada en les espècies de vertebrats; es co-expressa amb RAG1.

5. ALTRES MOLÈCULES

- *Ikaros*. És un membre de la família de factors de transcripció amb dits de zinc essencial per l'linatge limfoide²⁴². A partir d'un splicing diferencial genera isoformes proteïques que mantenen en comú un domini de dits de zinc a l'extrem COOH-. D'altres isoformes (Ik-1, -2, -3, -4) tenen un segon domini dits de zinc NH₂ terminal que permet la interacció específica amb el DNA²⁴³. El nivell d'expressió d'Ikaros durant el desenvolupament no varia significativament i les isoformes predominants a la població de cèl·lules hemotopoiètiques són Ik-1, -2 i -4²⁴⁴. Els ratolins homocigots per una delecció de l'exó que codifica pel domini COOH-terminal no tenen limfòcits B madurs, ni precursors ni cèl·lules T fetals²⁴⁵ i com a conseqüència no estructuren fol·licles limfoides amb centres germinals.

1.2.4.1.4 La reacció centre germinal. Selecció positiva i selecció negativa

Un procés previ a la reacció centre germinal que té lloc als òrgans limfoides secundaris (melsa^{246,247}, ganglis limfàtics, amígdals, etc) és la formació dels **fol·licles** o **focus primaris** a la zona paracortical dels nòduls limfoides. Estan constituïts fonamentalment per acúmuls de cèl·lules B, i per cèl·lules T i presentadores d'antigen en molt més petita proporció. Són estructures ja organitzades prèviament a l'arribada dels antigens amb la finalitat de desenvolupar una resposta primària eficaç, a partir de la diferenciació de cèl·lules B verges cap a cèl·lules plasmàtiques de baixa afinitat productores d'IgM quan reconeixen antigen.