

## Linfopoyesis temprana en médula ósea adulta

R.S. Welner<sup>1,2</sup>, P.W. Kincade<sup>1</sup>, R. Pelayo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Immunobiology and Cancer Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City.*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, U.S.A.*

<sup>3</sup>*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S., Mexico City, Mexico.*

### EARLY LYMPHOPOIESIS IN ADULT BONE MARROW

Recibido: 1 Septiembre 2007

Aceptado: 14 Septiembre 2007

#### RESUMEN

El desarrollo de las células linfoides a partir de células troncales hematopoyéticas es un proceso organizado en el que se pierden gradualmente múltiples potenciales de diferenciación alternos; y coinciden el compromiso de linaje y la ganancia de funciones especializadas. En los últimos años se han registrado avances notables en la caracterización de los progenitores primitivos que dan inicio al programa linfoide, y en la definición de los patrones de actividad transcripcional que controlan las decisiones del linaje, aunque está poco definida la relación entre las señales ambientales y la estabilidad de la ruta de diferenciación linfoide. Esta revisión bibliográfica pretende proporcionar un panorama claro del conocimiento actual en los eventos tempranos de la linfopoyesis y su interrelación con el microambiente hematopoyético.

**PALABRAS CLAVE:** Progenitores linfoides/ Compromiso de linaje linfoide/ Médula ósea/ Linfopoyesis temprana/ Nicho hematopoyético.

#### ABSTRACT

Development of lymphoid cells from hematopoietic stem cells is an ordered process where multiple alternate lineage potentials are gradually lost and lineage commitment is coincident with gain of specialized functions. Over the last few years remarkable advances have been made in characterizing primitive progenitors that initiate the lymphoid program, and patterns of transcriptional activity controlling lineage fate decisions during normal hematopoiesis, but less is known about environmental signals that may influence the differentiation pathway stability. This review discusses the current knowledge with relevance to hierarchy and early events in lymphopoiesis and their relationship to hematopoietic microenvironment.

**KEY WORDS:** Lymphoid progenitors/ Lymphoid lineage commitment / Adult bone marrow / Early lymphopoiesis / Hematopoietic niche.

## INTRODUCCIÓN

El aprendizaje acerca de la organización y jerarquía hematopoyéticas para la producción balanceada de todos los tipos celulares que integran el sistema inmune ha incrementado vigorosamente en los últimos años. La identificación fenotípica de las células troncales hematopoyéticas (HSCs) en la médula ósea del ratón<sup>(1)</sup> preparó el terreno para construir el mapa hematopoyético basado en la existencia de progenitores restringidos a linajes celulares específicos, y disparó la intensa exploración de modelos experimentales para el estudio de su regulación. Los resultados han sido muy favorables respecto a los eventos tempranos de diferenciación y compromiso linfo-hematopoyéticos en estado basal, así como a la identificación de la mayoría de las poblaciones celulares que participan en ellos. Aún en construcción se encuentran la arquitectura y regulación del nicho hematopoyético, y es todavía ignoto si dichos progenitores y eventos tempranos son vulnerables a cambios abruptos en el microambiente celular a los que se ve expuesto un individuo.

Las células sanguíneas maduras son tradicionalmente clasificadas en dos linajes o estirpes: linfoide y mieloide. El linaje linfoide consiste de células B, T y asesinas naturales (NK), mientras que el linaje mieloide incluye un número de categorías celulares que son morfológica, fenotípica y funcionalmente distintas, incluyendo diferentes subtipos de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos y células cebadas. Las células dendríticas (DCs) tienen un programa único que puede ser activado desde las vías de diferenciación linfoide o mieloide<sup>(2-4)</sup>. De acuerdo a esta clasificación, las rutas de desarrollo linfoide y mieloide progresan a través de estadios críticos de diferenciación de las HSCs, compromiso de sus progenitores y maduración de sus precursores; y se han representado como una serie de opciones binarias, excluyentes e independientes<sup>(5)</sup>. Aunque este concepto ha sido apoyado por la purificación exitosa de los progenitores linfoides comunes<sup>(6)</sup> y sus contrapartes, los progenitores mieloides comunes<sup>(7)</sup>, un número de estudios recientes que utilizan marcadores adicionales y genética de poblaciones sugieren que los progenitores tempranos son heterogéneos y retienen cierto grado de plasticidad, lo que hace a la divergencia linfoide-mieloide menos abrupta, pero más complicada de lo previamente concebido. En los nuevos modelos, el desarrollo linfo-hematopoyético temprano es guiado por combinaciones de factores intrínsecos y microambientales que impulsan la pérdida gradual de opciones de diferenciación en paralelo con una ganancia de funciones especializadas<sup>(8-11)</sup>.

## LAS CÉLULAS TRONCALES Y EL INICIO DE LA DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA

Las células totipotentes o embrionarias son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo); pueden ser cultivadas casi indefinidamente y dan origen a todos los tipos celulares del cuerpo, razón por la que son empleadas en procesos de clonación, así como en la generación de animales manipulados genéticamente usando tecnología de recombinación homóloga. Las células troncales multipotentes pueden ser aisladas de varios tejidos fetales y adultos, e incluyen a las células troncales hematopoyéticas, encargadas de la producción balanceada y el reabastecimiento de todos los linajes de la sangre a lo largo de la vida. Su papel activo en el rescate y mejoramiento del sistema hematopoyético como parte del tratamiento de diversas enfermedades malignas, deficiencias inmunológicas y autoinmunidades, han alentado gran expectación mundial, de manera que el estudio de su biología y la de sus descendientes más próximos es una de las prioridades del mundo científico<sup>(12)</sup>.

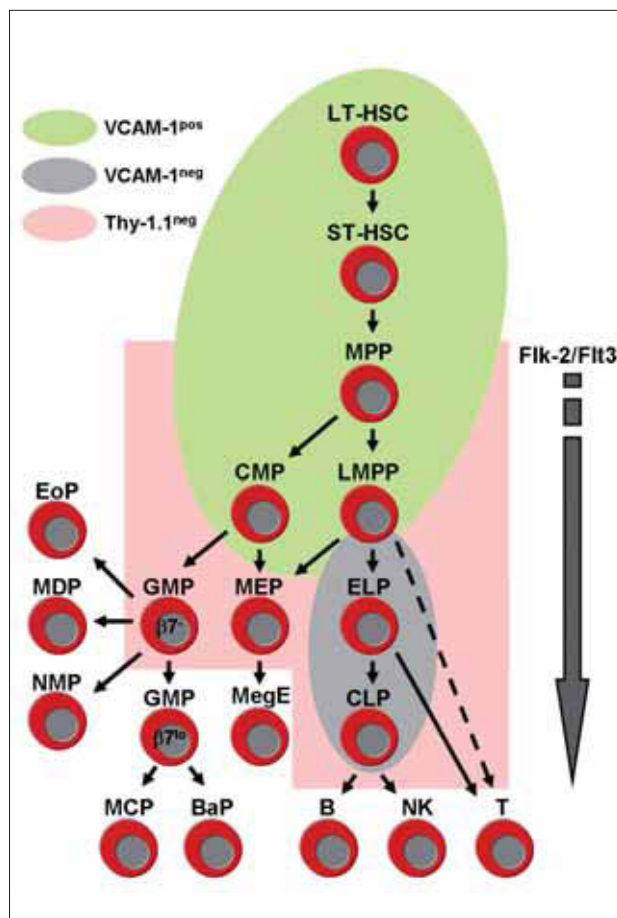
El conocimiento actual de la biología de los progenitores tempranos y el desarrollo del sistema hematopoyético proviene, en gran medida, de la investigación en modelos de ratón, debido a la posibilidad que ofrecen éstos de llevar a cabo experimentos *in vivo* que demuestran la actividad precursora de diversas poblaciones celulares, así como a la incrementada disponibilidad de ratones genéticamente modificados, los cuales se han convertido en un instrumento básico para la elucidación de los mecanismos moleculares que participan en las diversas vías de diferenciación<sup>(13)</sup>.

La hematopoyesis es iniciada por una población conspicua y única de HSCs que residen en vida fetal en el hígado y en la vida adulta en la médula ósea, principalmente. Dos propiedades las hacen particulares: su capacidad de auto-renovación y su potencial de diferenciación en las múltiples categorías celulares sanguíneas: eritrocitos, megacariocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos. La aptitud clonal de estas células para reconstituir a largo plazo el sistema hematopoyético de animales de experimentación irradiados e inmunodeficientes, les ha merecido el nombre de LT-HSC (del inglés 'long term-hematopoietic stem cells'). Virtualmente todas las LT-HSC, así como la población capaz únicamente de reconstitución transitoria -las ST-HSC- y los progenitores multipotentes (MPP) residen en un pequeño compartimiento que constituye aproximadamente el 0.1% del total celular de la médula ósea y es llamado LSK (Lin-Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup>), en donde convergen todas las poblaciones que carecen de expresión de marcadores de linaje definido, pero expresan las moléculas Sca-1 y c-

kit<sup>14</sup>). En este compartimiento se llevan a cabo los eventos más tempranos de la hematopoyesis a partir de HSCs que generan progenitores primitivos cuyo compromiso de linaje se establece gradualmente<sup>(8)</sup>. Algunos otros marcadores, como Thy1.1 (CD90) y CD150, han sido de utilidad en el rastreo de la progresión de HSC a los progenitores multipotentes<sup>(15)</sup>.

El modelo prevaleciente de diferenciación hematopoyética se basó durante años en la estricta separación de progenitores linfoides comunes (CLP, del inglés 'common lymphoid progenitors') y progenitores mieloides comunes (CMP, del inglés 'common myeloid progenitors') como primer paso en el compromiso de las HSCs hacia una estirpe celular<sup>(6,7)</sup>, resultando en la completa e inmediata segregación de los procesos de linfopoyesis y mielopoyesis<sup>(5)</sup>. Sin embargo, ese paso crítico parece no ser una simple selección entre los linajes linfoides y mieloides, y las evidencias actuales sustentan una novedosa ruta de desarrollo hematopoyético temprano, en la que LT-HSC que expresan VCAM pero no el receptor de tirosina cinasa Flt3 (de 'fms-like tyrosine kinase-3') generan ST-HSC con actividad progenitora multipotente y fenotipo VCAM<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>TpoR<sup>+</sup>EpoR<sup>+</sup>G-CSFR<sup>+</sup>IL7R $\alpha$ -PU.1<sup>+</sup>GATA-1<sup>+</sup>. A partir de ellas, el incremento en los niveles de Flt3 marca el inicio de una gradual separación de los destinos celulares, donde las células que expresan Flt3 pierden la habilidad para adoptar destinos de linaje megacariocítico y eritroide, pero sostienen un potencial de diferenciación mieloides y linfoides<sup>(9,16)</sup> (Figura 1). En concordancia, se disminuye la expresión de un número de genes críticamente involucrados en el desarrollo megacariocítico/eritroide y aunque la población no es uniformemente positiva, en ella comienzan a aparecer transcritos linfoides, razón por la cual se le ha denominado LMPP (de 'lymphoid-primed multipotent progenitors'). Conforme la diferenciación progresa, el nivel de expresión de la molécula VCAM-1 disminuye. Por lo tanto, Flt3 y VCAM-1 representan parámetros particularmente útiles para el fraccionamiento de poblaciones dentro del compartimiento LSK de la médula ósea (Figura 1). Cuando estos parámetros son explotados en combinación con otros marcadores o animales reporteros, es posible aislar y estudiar extensamente a los fundadores del sistema inmune (ver 'Progenitores linfoides y linfopoyesis temprana').

En el mismo esquema, la mielopoyesis da inicio con la diferenciación de ST-HSC a CMPs. Las CMPs (Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Fc $\gamma$ RII/III<sup>lo</sup>) no son parte de la población LSK, poseen más del 98% de la actividad formadora de colonias mieloeritroides de la médula ósea, y al parecer son la principal fuente de GMPs (Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Fc $\gamma$ RII/III<sup>hi</sup>) productores de granulocitos y macrófagos, y MEPs (Lin<sup>-</sup>c-



**Figura 1.** Expresión de marcadores y la jerarquía hematopoyética en la médula ósea de ratón. LT-HSC, célula troncal hematopoyética de larga duración; ST-HSC, célula troncal hematopoyética de corta duración; MPP, progenitor multipotente; LMPP, progenitor multipotente de pre-instrucción linfoides; ELP, progenitor linfoides temprano; CLP, progenitor común linfoides; CMP, progenitor común mieloides; MEP, progenitor megacariocítico-eritroide; GMP, progenitor granulocítico-mieloides; BaP, progenitor de basófilos; MCP, progenitor de células cebadas; EoP, progenitor de eosinófilos; MDP, progenitor de macrófagos y células dendríticas; NMP, progenitor de neutrófilos y monocitos. Figura adaptada de las referencias 16 y 9.

kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Fc $\gamma$ RII/III<sup>lo</sup>) productores de células de linaje megacariocítico y eritroide<sup>(7,9,16)</sup>, aunque ha sido sugerida una participación de los LMPPs en el aporte de GMPs. La fracción GMP está dividida en poblaciones integrina  $\beta$ 7<sup>+</sup> y  $\beta$ 7<sup>lo</sup>. Esta última está pre-destinada hacia los linajes de basófilos y células cebadas, mientras que la  $\beta$ 7<sup>-</sup>negativa asume el destino de eosinófilos por un lado, y genera precursores de monocitos y células dendríticas (MDP), así como de neutrófilos y monocitos (NMP), por otro. Tanto la contribución natural de los LMPPs en la generación de GMPs, como la relación lineal entre los precursores derivados de GMP permanecen todavía imprecisos<sup>(9)</sup>.

## PROGENITORES LINFOIDES Y LINFOPOYESIS TEMPRANA

Durante la ontogenia y a lo largo de la vida adulta, la producción de las células linfoides -B y T, células NK, y algunas categorías de células dendríticas- es un proceso dinámico y complejo, en el cual la diferenciación de los progenitores, en términos de fenotipo de superficie distintivos y expresión de genes funcionalmente importantes, comienza a ser activada mucho antes de que el compromiso sea completado. Los eventos tempranos en las decisiones del destino de linaje deben entonces ser entendidos como una negociación entre factores de transcripción y señales microambientales que resulta en la restricción, ganancia y pérdida de funciones<sup>(10,17)</sup>.

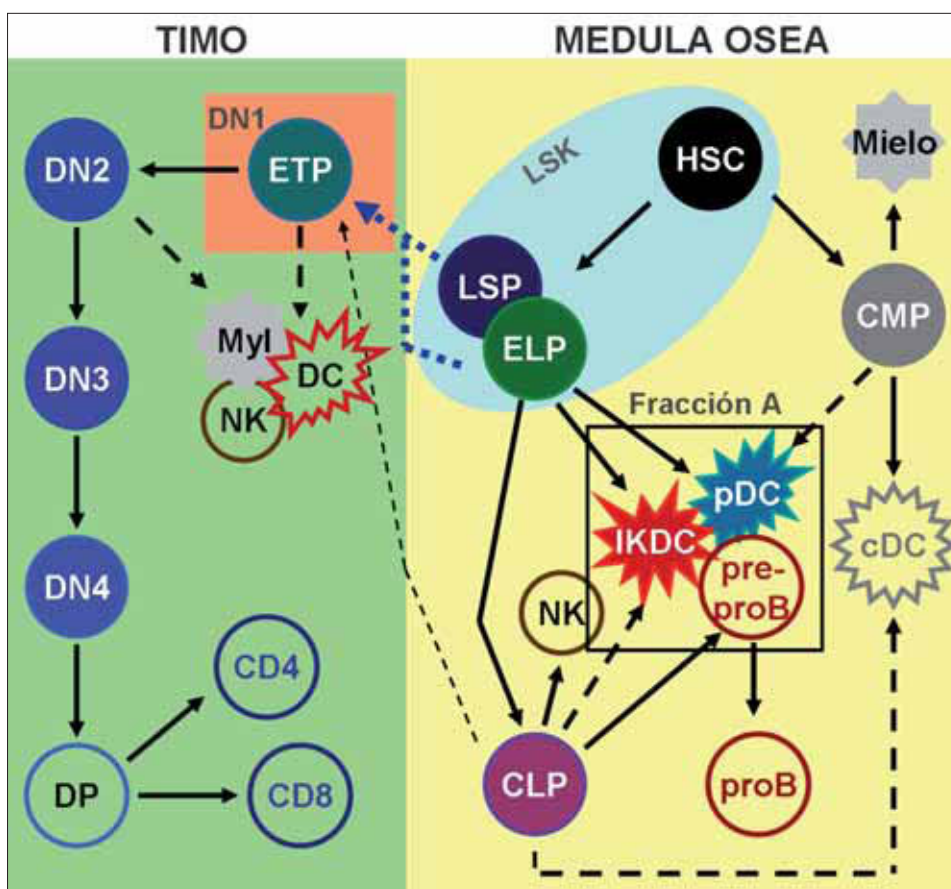
**Los progenitores linfoides.** La población de LMPPs proveniente de células troncales multipotentes y no auto-renovables de la médula ósea del ratón, contiene progenitores clonales con un potencial combinado de células T, B y mieloide<sup>(18)</sup>, así como restringidos a linajes de B o T, y productores de células NK. Aproximadamente la tercera parte de los LMPPs expresan con cierta heterogeneidad transcritos de genes linfoides como RAG1 o IL-7R $\alpha$ . A lo largo de su progreso, la des-regulación de la molécula de adhesión VCAM-1<sup>(19)</sup> y la transcripción del locus de la enzima que recombina los segmentos genéticos VDJ de la inmunoglobulina y del TCR, la recombinasa RAG1, marcan a las células que apenas inician el programa de diferenciación hacia la estirpe linfoides<sup>(20)</sup>. Por esta razón, los ratones "knock-in" RAG1/GFP se han constituido como una herramienta particularmente útil en la investigación del proceso de linfopoyesis temprana<sup>(4,20-23)</sup>, y han permitido el aislamiento y caracterización de los progenitores linfoides más tempranos, tanto en hígado fetal como en médula ósea, de los que se tiene conocimiento: los ELPs (de 'early lymphoid progenitors'). En dicho modelo, un alelo del gen RAG1 ha sido reemplazado por la secuencia que codifica la proteína verde fluorescente, y es posible localizar la señal de fluorescencia por análisis de citometría de flujo, la cual corresponde con la transcripción del gen RAG1<sup>(21)</sup>. Las células que expresan RAG-1 en embriones pueden ser resueltas en una serie de estadios de diferenciación comenzando con la fracción c-kit<sup>hi</sup>Sca1<sup>+</sup>GFP<sup>lo</sup> y culminando con c-kit<sup>lo</sup>-GFP<sup>hi</sup>. Tanto en hígado fetal, como en médula ósea adulta, las células troncales y los progenitores mieloides residen en la fracción GFP<sup>-</sup>, mientras que los progenitores linfoides en la GFP<sup>+</sup>. Los ELPs de la médula ósea adulta son parte de la población LSK, son primitivos en términos de marcadores de superficie (Lin<sup>-</sup>ckit<sup>hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>Thy1.1-IL7-R<sup>-</sup>), factores de transcripción en contexto y tiempo requerido para diferenciarse; expresan TdT intracelular y CD27 y Flt3 en membrana y son sensibles al tratamiento con estrógeno<sup>(20,24)</sup>.

Su potencial para generar todas las líneas de células linfoides es muy alto, así como para producir ciertas categorías celulares del sistema inmune innato (ver 'Fracción A'), pero el potencial de diferenciación mieloide es reducido. Acorde con estas características, los ELPs transcriben genes asociados a linajes linfoides como *gata-3*, *ebf*, *b29*, *e* IL7R $\alpha$ , y tanto en cultivo como *in vivo* dan origen a la fracción de Pro-linfocitos Lin<sup>-</sup>ckit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>Thy1.1-Flt3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>, que ha desregulado la expresión de c-kit e incluye a la mayoría de los progenitores linfoides comunes o CLPs. Los CLPs expresan en superficie el receptor de IL-7 (IL-7R $\alpha$ )<sup>(6)</sup>, y aunque muestran actividad clonogénica de T, B y NK (lo que originalmente les valió su designación), son bien reconocidos por múltiples laboratorios como los más eficientes precursores de linfocitos B pero no contribuyen sustancialmente al desarrollo del linaje de T<sup>(6,22,23,25)</sup>. Estos progenitores carecen de potencial de reconstitución a largo plazo y no exhiben un obvio potencial de producción de células no linfoides, pero sí cierta habilidad residual para generar células mieloides y dendríticas<sup>(26-28)</sup>. La expresión de IL-7R $\alpha$  es distintivo de los CLPs, y su señalización esencial para el desarrollo de B y de T en el ratón<sup>(29)</sup>.

**La Fracción A.** En 1991 Hardy identificó las principales subpoblaciones con compromiso de linaje B en médula ósea y propuso un esquema secuencial de diferenciación río abajo de las CLPs<sup>(30)</sup>. El compartimiento celular más primitivo exhibía un fenotipo B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD24<sup>-/lo</sup> y fue denominado Fracción A. Esta fracción comprende 3 subpoblaciones definidas no yuxtapuestas: DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (45-55%), DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> (30-35%) y DX5<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup> (16-20%), de las que solo la última posee potencial precursor de células B<sup>(28,31,32)</sup> y presumiblemente tiene su origen en las CLPs. La reciente caracterización de células de linaje no-B dentro de las otras dos subpoblaciones (DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> y DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>) y sus controversiales orígenes han incrementado la complejidad del sistema linfo-hematopoyético.

Dos categorías de células dendríticas plasmacitoides (pDC) distinguidas de acuerdo a la expresión de RAG1 en el ratón reportero RAG1/GFP, se diferencian directamente de ELPs y residen entre las DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> de la fracción A que expresan CD11c<sup>(4,23)</sup>. El desarrollo de ambas es independiente de IL-7 y de RAG1, pero las pDC1 RAG1<sup>+</sup> han sido dotadas de la capacidad de hacer rearrreglos D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> y de expresar algunos transcritos relacionados al linaje de B, tales como RAG, Bcl11a, Ebf, Mb-1 y Pax5. Posiblemente: a) ELP es una población heterogénea y las pDC1 derivan de un progenitor más predispuerto al linaje de células B, b) las pDC1 derivan de la categoría pDC2. Los estudios *in vitro* no muestran una relación obvia precursor-producto pDC2-pDC1, lo que sugiere que ambas categorías divergen de entre ellas y del





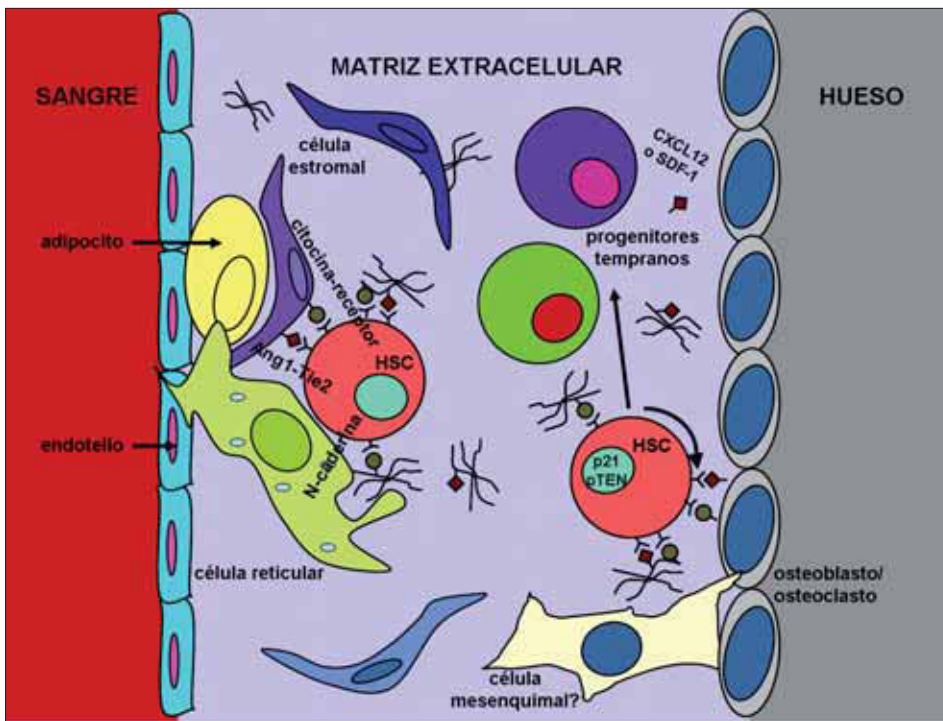
**Figura 2.** Principales rutas de diferenciación linfóide. Las líneas punteadas finas indican bajo potencial de diferenciación, mientras que las líneas punteadas más gruesas sugieren las rutas probables del inicio de colonización tímica. HSC, célula troncal hematopoyética; LSP, progenitor L-selectina<sup>+</sup>; ELP, progenitor linfóide temprano; CLP, progenitor común linfóide; CMP, progenitor común mieloide; ETP, progenitor tímico temprano.

linaje B a estadios tempranos de la diferenciación linfohematopoyética<sup>(17)</sup>. Por otro lado, la subpoblación cohorte DX5<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> contiene células que co-expresan el marcador NK1.1 y son expandibles en cultivos con IL-15<sup>(4,23)</sup>. Estas células fueron originalmente descritas como híbridos fenotípicos y funcionales de células dendríticas y células NK<sup>(33,34)</sup> y nombradas IKDC (de 'interferon-producing killer dendritic cells'). Similar a las pDCs, ellas son CD11c<sup>lo</sup>, aunque no son productoras eficientes de IFN $\alpha$  y se caracterizan por su poderosa capacidad citotóxica y de producción de IFN $\gamma$ <sup>(35)</sup>. Tanto el perfil de expresión génica, así como la dependencia del factor inhibidor Id2 para su desarrollo indican que las IKDCs parecen tener una relación más cercana con células NK que con DCs<sup>(23,35,36)</sup>, y nuestros recientes estudios proveen evidencias de su origen linfóide a partir de LMPPs, particularmente de los progenitores L-selectina<sup>+</sup> (LSP), reconocidos por su robusto potencial de T<sup>(22,37)</sup>, y de ELPs<sup>(23)</sup>. En contraste, los reportes comparables de trasplante de progenitores linfoides en animales irradiados sugieren que las células NK clásicas B220<sup>-</sup> son mayormente generadas por CLPs<sup>(22,23)</sup>. Aún está por aclarar si IKDCs y NKs representan

estadios de maduración, estadios de activación, o subpoblaciones funcionalmente restringidas.

En conclusión, parte de la Fracción A corresponde a células del sistema inmune innato, como las pDCs e IKDCs, que tienen su origen en progenitores linfoides muy tempranos y cuyo brazo de diferenciación aparentemente es previo e independiente del compromiso de los precursores en la ruta de células B (Figura 2). Más aún, su producción es promovida por la infección viral a expensas de la linfopoyesis de B (R. Pelayo, enviado). El estudio de las posibles implicaciones de este fenómeno durante un estado de desequilibrio hematopoyético o enfermedad es de indiscutible importancia.

**Diferenciación de células B.** La regulación positiva de CD19 es considerada uno de los sellos más tempranos del compromiso al linaje B. Células denominadas pre-proB que residen en la Fracción A2 de Hardy, esto es, B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD24<sup>-/lo</sup> y fenotipo adicional AA4.1<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, expresan IgH en línea germinal, además de genes que codifican para componentes de los receptores pre-B y B, tales como mb-1, B29 y  $\lambda$ 5, y factores de transcripción necesarios para la diferenciación, como Pax5 y E47. Mas



**Figura 3.** El nicho hematopoyético en la médula ósea. El diagrama esquemático muestra los potenciales componentes del nicho celular en la médula ósea en condiciones normales. Algunas HSCs se localizan cerca del endosteó en donde se hipotetiza que osteoclastos y osteoblastos crean un nicho para su mantenimiento, mientras que otras HSCs son mantenidas por un nicho de una variedad de células perivascuales. Es todavía impreciso cuáles células actúan directamente y cuáles lo hacen indirectamente. La arquitectura de un posible nicho para el soporte de los progenitores tempranos permanece indefinida. Adaptación de las referencias 67 y 62.

aún, esta población pre-proB B220<sup>+</sup> despliega IL-7R $\alpha$  en membrana<sup>(28)</sup>, y constituye la conexión entre las CLPs B220<sup>+</sup> y el estadio pro-B (Figura 2), que es B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> y está mayormente comprometido al linaje B. A lo largo de este proceso de diferenciación, las señales de IL-7 son críticas en el adulto. El análisis riguroso de la médula ósea de ratones deficientes en IL-7R $\alpha$  ha sido indicativo de un bloqueo profundo en el desarrollo de B a nivel de la Fracción A<sub>2</sub><sup>(29,38)</sup>. Los subsecuentes estadios de diferenciación -independientes de antígeno- son guiados con la finalidad de producir células que expresen moléculas de inmunoglobulina funcionales en membrana, y de manera orquestada una serie de factores de transcripción están sustancialmente involucrados en esta ruta. PU.1, Ikaros, E2A, Bcl11a, EBF y Pax5 participan en la determinación del compromiso y/o la especificación del linaje<sup>(17)</sup>. PU.1 es expresado exclusivamente en células hematopoyéticas y su deficiencia resulta en que Flt3 no sea regulado positivamente, y genes como EBF no sean expresados, dando por consecuencia un posible defecto en los progenitores linfoides y el bloqueo de la diferenciación de células B<sup>(39)</sup>. Ikaros, al igual que PU.1, tiene un papel en los eventos más tempranos de la linfopoyesis; en su ausencia Flt3 no es expresado y hay un daño severo en el potencial de T y de B<sup>(40)</sup>. Bcl11a es requerido en el desarrollo de células pre-proB y su actividad parece preceder a la de EBF y Pax5<sup>(41)</sup>. E2A es crucial para la activación de RAG, y sus productos, directa

o indirectamente, regulan la expresión de Pax5, el cual a su vez regula la expresión de genes específicos de células B, incluyendo CD19. Más aún, un número de genes que participan en la señalización del receptor pre-B tales como mb-1,  $\lambda$ 5, VpreB y B29, así como RAG1/2 y TdT requeridos para el rearreglo de inmunoglobulinas, son blancos potenciales para las secuencias de unión a DNA de E2A<sup>(42)</sup>. EBF comienza su expresión en las ELPs y prosigue en todos los estadios de la diferenciación de B antígeno-independiente; y en coordinación con los productos de E2A, EBF es clave en el control previo al rearreglo de genes de inmunoglobulina<sup>(39)</sup>. Finalmente, los extensos estudios sobre la participación de Pax5 en el desarrollo de B indican que su función es esencial para la represión de la transcripción de genes no linfoides y no B<sup>(43,44)</sup>. Entonces, en esta red de regulación, el desarrollo de progenitores multipotentes Flt3<sup>+</sup> es dependiente de PU.1 e Ikaros, mientras que la especificación y el compromiso de las células pro-B representan mecanismos dependientes de E2A/EBF y Pax5, respectivamente.

Un número de hallazgos indican que los miembros de la familia Notch median la decisión de linaje B/T<sup>(10,45)</sup>. Por otro lado, el reciente análisis de animales deficientes en el represor transcripcional LRF ha mostrado su importancia en la decisión de linaje B/T, ya que la pérdida de su función resulta en un severo decremento de todos los precursores de B CD19<sup>+</sup>, concomitante con un incremento en la fracción

pre-proB, la cual en esa condición carece de transcritos de linaje B y expresa en su lugar, transcritos relacionados con la especificación de T<sup>(46)</sup>.

Formalmente diferente de las células que residen en la Fracción A en términos de expresión de B220 y CD19, pero muy probablemente afiliada a las células de linaje B, otra población ha emergido en el esquema de diferenciación de B: las células B1. En 2001 fue reportada una población conspicua en médula ósea de células CD45R/B220-CD19<sup>+</sup> carente de potencial de T y NK, pero que incluía progenitores bipotenciales de B y macrófagos, con la habilidad para generar células B1 CD19<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>Mac1<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>/<sup>+</sup><sup>(47)</sup>. Dichas células B1 constituyen una población menor de células B que reside en alta proporción en las cavidades peritoneal y pleural formando parte posiblemente del sistema inmune innato<sup>(48)</sup>, y aunque sus progenitores (B1P) son producidos más eficientemente durante la embriogénesis, los mismos en la médula ósea adulta retienen cierto potencial. Investigación adicional es necesaria para elucidar la posibilidad de que ellos representen remanentes de un programa fetal, o sean producidos a través de la vida por progenitores linfoides primitivos.

**Diferenciación de células T.** El timo es el sitio principal para la producción de linfocitos T, pero no contiene ni produce progenitores de renovación autóloga, por lo que la linfopoyesis de T es mantenida por la importación periódica de un número pequeño de progenitores hematopoyéticos a través de la corriente sanguínea a la inmaduración tímica corteza-médula<sup>(49,50)</sup>. Aunque a múltiples progenitores se les reconoce cierto potencial para generar células T bajo circunstancias experimentales, no todos ellos tienen la propiedad de establecerse en este órgano, y su naturaleza precisa es aún objeto de investigación. De las varias categorías de progenitores linfoides identificados en la médula ósea, los que exhiben la más robusta capacidad de reconstitución tímica se encuentran entre la fracción LSK con alta densidad de Flt3<sup>(13,16,22,50-52)</sup>. Entre ellos, los progenitores L-selectina<sup>+</sup> (LSP) y los ELP RAG1<sup>+</sup> son candidatos efectivos en modelos de trasplante (Figura 2). Aunque la población de ELPs tiene mayor potencial de B que la de LSPs, ambos progenitores están presentes en la circulación periférica y muestran un potencial predominante en la generación de timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup><sup>(22)</sup>.

La caracterización de los progenitores residentes en el timo ha sido definitiva en la búsqueda de las células que colonizan este órgano. Utilizando citometría de flujo los timocitos pueden subdividirse en varias poblaciones: alrededor del 5% de ellos no expresan CD4 o CD8 (DN, doble negativos); ~80% expresan ambos CD4 y CD8 (DP, doble positivos), ~10% expresan sólo CD4 y ~5% sólo CD8. Las células DP

proviene de timocitos DN, y tras desregular uno de los correceptores CD4 o CD8, se diferencian a linfocitos T unipositivos CD8 o CD4. En esta clasificación, los timocitos más primitivos (ETP, de 'early thymic progenitors') residen en la fracción DN, carecen de marcadores asociados con cualquier linaje hematopoyético, expresan altos niveles de c-kit, y despliegan L-selectina<sup>(13,49,50,53)</sup>. Aunque la capacidad de los ETPs para generar células del linaje T es poderosa, ellos retienen cierto potencial de B, NK, DC y mieloides<sup>(13)</sup>, sugiriendo heterogeneidad en la población y/o plasticidad celular. En línea con el primer concepto, la población DN puede ser subdividida en 4 estadios de desarrollo basados en la expresión diferencial de CD44 y CD25, madurando desde CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1) a CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2) a CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) y hasta CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (DN4)<sup>(49)</sup>. La categoría DN1 contiene a su vez 5 subpoblaciones de acuerdo a los niveles de expresión de c-kit y CD24<sup>(13)</sup>. Las dos subpoblaciones de mayor densidad de c-kit, DN1a y DN1b, son potentes progenitores de T con casi nulo potencial de B<sup>(54)</sup>. Por lo tanto, a menos que ellos cambiaran rápidamente sus características al momento de entrada, los candidatos más probables para colonizar el timo debieran ser Lin-CD24<sup>-</sup>/<sup>lo</sup>CD25<sup>-</sup>Thy1<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup>Flt3<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>L-select<sup>+</sup>. Dicho fenotipo es similar a los Lin-c-kit<sup>hi</sup>L-selectina<sup>+</sup>RAG<sup>-</sup> LSPs, lo que ha sugerido que es la población de LSPs, y no la de ELPs, la que en condiciones normales pudiera participar en la timopoyesis temprana<sup>(22)</sup>. Por otro lado, con ayuda de un transgénico reportero de pTα, von Boehmer y colaboradores han identificado otros progenitores circulantes (CLP-2 y CTP) con fenotipo más diferenciado (c-kit<sup>-</sup>/<sup>lo</sup>B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>) y capacidad de reconstitución tímica<sup>(55,56)</sup>; y recientemente, el análisis de ratones reporteros del receptor de quimiocina CCR9 reveló que la expresión de este receptor es indispensable para el establecimiento de los progenitores en el timo, y que las poblaciones LMPP/ELP, CLP, CLP-2, CTP y ETP son CCR9<sup>+</sup><sup>(51,57)</sup>. Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que el timo sea colonizado constantemente por múltiples progenitores. Una vez éstos hagan su arribo, los precursores efectivos deben ser capaces de una expansión rápida y robusta que sostenga la tasa de producción intrínseca<sup>(58,59)</sup>.

Numerosos factores de transcripción participan en el programa de T, pero algunas citocinas y la señalización a través de los receptores Notch, son críticamente requeridos en los eventos tempranos del desarrollo<sup>(10,50)</sup>. Se piensa que la interleucina 7 (IL-7) y el factor de células troncales (SCF) funcionan en el soporte de la supervivencia y proliferación de los precursores tímicos, mientras que Notch dispara una serie de reacciones importantes para el compromiso y la decisión del linaje<sup>(10)</sup>. La inactivación inducible de Notch1



resulta en el bloqueo de la diferenciación a nivel de DN1, y el incremento de células de linaje B en el timo, y al revés, la sobre-expresión de Notch1 en los progenitores hematopoyéticos promueve el desarrollo de células de linaje T en médula ósea<sup>(60)</sup>, apoyando su indiscutible papel en la determinación B/T. Estos datos indican que un distintivo del microambiente tímico debe ser su capacidad para enviar señales firmes a través de Notch a las células colonizadoras. Aún cuando están definidos muchos de los genes blanco de Notch, los estadios precisos, así como las bases moleculares de su actividad y el balance dinámico entre los factores que dirigen el programa, siguen siendo blanco de intensa investigación<sup>(10)</sup>.

### NICHO HEMATOPOYÉTICO Y FACTORES MICROAMBIENTALES

Ni las HSC ni los progenitores primitivos crecen como unidades autónomas independientes. Ambos están rodeados en todas dimensiones por el microambiente de la médula, definido por interacciones célula-célula y exposición a combinaciones y concentraciones variables de citocinas<sup>(61)</sup>. De importancia crítica es la contribución de células estromales, osteoblastos y células endoteliales, los cuales pueden tener papeles y propiedades múltiples además de su función de soporte de la linfo-hematopoyesis en un ambiente natural<sup>(62)</sup> (Figura 3). Ellas producen citocinas y son capaces de elaborar una variedad de moléculas de adhesión e interacción que le permiten responder a señales microambientales y participar en una comunicación bi-direccional con las células linfo-hematopoyéticas<sup>(61,63,64)</sup>. El nicho mantiene a las HSCs en ciclos de prolongada quiescencia en los cuales alrededor del 70% de las células están en G<sub>0</sub>, presumiblemente debido a la expresión de factores genéticos intrínsecos que inhiben el ciclo celular, como p21 y pTEN, así como a la actividad de diversas moléculas de anclaje<sup>(65-68)</sup>. La 'activación' de la HSC, por mecanismos no bien definidos a la fecha, induce la autorenovación o división celular asimétrica<sup>(67)</sup> (Figura 3). Por otro lado, diversos estudios indican que la mayoría de los progenitores linfoides tempranos pasan también un tiempo considerable en G<sub>0</sub><sup>(69,70)</sup>, y aún cuando los componentes del nicho que sostiene a las células progenitoras multipotentes no se conocen, esta condición quiescente puede ser importante en el control del tamaño de la población y para la integridad de las células que reabastecen el sistema inmune a lo largo de la vida.

En diversos modelos experimentales se ha reportado la perturbación del estado de quiescencia y de la arquitectura del nicho hematopoyético en circunstancias de infecciones y/o estrés, lo que puede resultar en el exporto prematuro de células precursoras a la periferia<sup>(71,72)</sup>. Kelsoe y sus

colaboradores han sugerido que el aumento de granulocitosis en la médula ósea compromete la linfopoyesis porque ambos eventos se llevan a cabo en un nicho celular común, y que en esta circunstancia hay un desequilibrio en la actividad de algunos componentes básicos del nicho, como es la quimiocina CXCL12, lo que promueve la liberación de los progenitores<sup>(72,73)</sup>. Por otro lado, datos recientes señalan que células que residen en la fracción de HSCs de médula ósea de ratón reconocen directamente productos bacterianos a través de receptores tipo Toll (TLRs), y que la ligación de estos receptores puede alterar los patrones normales de diferenciación<sup>(74)</sup>. Queda por determinar si la estabilidad del linaje es perturbada bajo estas circunstancias, y si ello representa una amenaza para la reconstitución del sistema inmune, o por el contrario, una vía para robustecer la linfopoyesis temprana.

### CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

#### CORRESPONDENCIA:

Dra. Rosana Pelayo

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas

Centro Médico Nacional Siglo XXI. I.M.S.S.

Av. Cuauhtémoc 330. Colonia Doctores

06725 Ciudad de México, México

Phone number: (52) 55 56 27 69 00 x 2270. Fax: (52) 55 85 96 47 04

E-mail: rosana.pelayo@imss.gob.mx

### BIBLIOGRAFÍA

1. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241: 58-62.
2. Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann NY Acad Sci* 2001; 938: 167-173.
3. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001; 97: 3333-3341.
4. Pelayo R, Hirose J, Huang J, Garrett KP, Delogu A, Busslinger M, et al. Derivation of two categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 2005; 105: 4407-4415.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
6. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91: 661-672.
7. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193-197.



8. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol* 2004; 25: 645-649.
9. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 2007; 26: 726-740.
10. Rothenberg EV. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* 2007; 26: 690-702.
11. Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 2007; 26: 703-714.
12. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 759-806.
13. Pelayo R, Welner R, Perry SS, Huang J, Baba Y, Yokota T, et al. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 100-107.
14. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403.
15. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst T, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121: 1109-1121.
16. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of Flt3<sup>+</sup> lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; 121: 295-306.
17. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Sem Immunol* 2006; 18: 2-11.
18. Mansson R, Hultquist A, Luc S, Yang L, Anderson K, Kharazi S, et al. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 2007; 26: 407-419.
19. Lai AY, Lin SM, Kondo M. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* 2005; 175: 5016-5023.
20. Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 2002; 17: 117-130.
21. Yokota T, Kouro T, Hirose J, Igarashi H, Garrett KP, Gregory SC, et al. Unique properties of fetal lymphoid progenitors identified according to RAG1 gene expression. *Immunity* 2003; 19: 365-375.
22. Perry SS, Welner RS, Kouro T, Kincade PW, Sun XH. Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol* 2006; 177: 2880-2887.
23. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun X-H, et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDC) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> lymphoid progenitors. *Blood* 2007; 109: 4825-4831.
24. Medina KL, Garrett KP, Thompson LF, Rossi MID, Payne KJ, Kincade PW. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nature Immunol* 2001; 2: 718-724.
25. Kouro T, Kumar V, Kincade PW. Relationships between early B- and NK-lineage lymphocyte precursors in bone marrow. *Blood* 2002; 100: 3672-3680.
26. D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid pre-dendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 2003; 198: 293-303.
27. Balciunaite G, Ceredig R, Massa S, Rolink AG. A B220<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2019-2030.
28. Rumpf LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA, Hardy RR. Lineage specification and plasticity in CD19-early B cell precursors. *J Exp Med* 2006; 203: 675-687.
29. Miller JP, Izon D, DeMuth W, Gerstein R, Bhandoola A, Allman D. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J Exp Med* 2002; 196: 705-711.
30. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-proB cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991; 173: 1213-1225.
31. Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 1996; 5: 527-535.
32. Tudor KS, Payne KJ, Yamashita Y, Kincade PW. Functional assessment of precursors from murine BM suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 2000; 12: 335-345.
33. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006; 12: 207-213.
34. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12: 214-219.
35. Spits H, Lanier LL. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* 2007; 26: 11-16.
36. Vremec D, O'Keeffe M, Hochrein H, Fuchsberger M, Caminschi I, Lahoud M, et al. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 2007; 109: 1165-1173.
37. Perry SS, Wang H, Pierce LJ, Yang AM, Tsai S, Spangrude GJ. L-selectin defines a bone marrow analog to the thymic early T-lineage progenitor. *Blood* 2004; 103: 2990-2996.
38. Allman D, Li J, Hardy RR. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* 1999; 189: 735-740.
39. Medina KL, Pongubala JM, Reddy KL, Lancki DW, DeKoter R, Kieslinger M et al. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell* 2004; 7: 607-617.
40. Yoshida T, Ng SY, Zúñiga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 2006; 7: 382-391.
41. Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 2003; 4: 525-532.
42. Sun XH. Multitasking of helix-loop-helix proteins in lymphopoiesis. *Adv Immunol* 2004; 84: 43-77.

43. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999; 401: 556-562.
44. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 55-79.
45. Ye M, Graf T. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 123-128.
46. Maeda T, Merghoub T, Hobbs RM, Dong L, Maeda M, Zakrzewski J, et al. Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* 2007; 316: 860-866.
47. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* 2001; 2: 83-88.
48. Montecino-Rodríguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 2006; 7: 293-301.
49. Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 888-897.
50. Bhandoola A, Sambandam A, Allman D, Meraz A, Schwarz B. Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* 2003; 171: 5653-5658.
51. Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 2007; 178: 2008-2017.
52. Umland O, Mwangi WN, Anderson BM, Walker JC, Petrie HT. The blood contains multiple distinct progenitor populations with clonogenic B and T lineage potential. *J Immunol* 2007; 178: 4147-4152.
53. Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 2003; 4: 168-174.
54. Porritt HE, Rumpf LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflucker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 2004; 20: 735-745.
55. Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H, et al. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* 2003; 4: 866-873.
56. Krueger A, von Boehmer H. Identification of a T lineage-committed progenitor in adult blood. *Immunity* 2007; 26: 105-116.
57. Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, Zúñiga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 2007; 26: 678-689.
58. Prockop SE, Petrie HT. Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *J Immunol* 2004; 173: 1604-1611.
59. Laurent J, Bosco N, Marche PN, Ceredig R. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *Int Immunol* 2004; 16: 1069-1080.
60. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999; 11: 299-308.
61. Kincade PW, Owen JJ, Igarashi H, Kouro T, Yokota T, Rossi MI. Nature or Nurture? Steady state lymphocyte formation in adults does not recapitulate ontogeny. *Immunol Rev* 2002; 187: 116-125.
62. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-1885.
63. Li L, Xie T. Stem Cell Niches: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605-631.
64. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* 2007; 129: 1081-1095.
65. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000; 287: 1804-1808.
66. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118: 149-161.
67. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005; 26: 426-433.
68. Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, et al. PTEN maintains hematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 2006; 441: 518-522.
69. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 2005; 202: 1599-1611.
70. Pelayo R, Miyazaki K, Huang J, Garrett KP, Osmond DG, Kincade PW. Cell cycle quiescence of early lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24: 2703-2713.
71. Nagaoka H, Gonzalez-Aseguinolaza G, Tsuji M, Nussenzweig MC. Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J Exp Med* 2000; 191: 2113-2120.
72. Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* 2004; 199: 47-58.
73. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* 2005; 201: 1771-1780.
74. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 2006; 24: 801-812.