



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**“EFECTO DEL MICROAMBIENTE CELULAR EN EL  
DESARROLLO DE LOS PROGENITORES LINFOIDES  
TEMPRANOS DE MEDULA OSEA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO  
DE DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. ROSANA PELAYO CAMACHO**

**TUTOR ACADEMICO  
DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE**

**MEXICO D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., México, y en el Immunobiology and Cancer Program de la Oklahoma Medical Research Foundation, U.S.A.

Durante el desarrollo del Proyecto de Investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca CONACYT 56419) y de la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las siguientes Instituciones y Autoridades Académicas fueron el soporte de mis Estudios de Doctorado y del presente Proyecto de Investigación. A ellos brindo el más honrado y comprometido agradecimiento:

Universidad Nacional Autónoma de México

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Oklahoma Medical Research Foundation

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dr. Paul W. Kincade

Drs. Miembros del Comité Tutorial

Drs. Miembros del Jurado

Dra. Yolanda López Vidal

## INDICE GENERAL

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. ABSTRACT</b>	2
<b>III. INTRODUCCION</b>	3
<b>IV. MARCO TEORICO</b>	5
IV.1. Células troncales y el inicio de la diferenciación hematopoyética	5
IV.2. Progenitores linfoides y linfopoyesis temprana	9
IV.3. Nicho hematopoyético y factores microambientales	20
IV.4. El ciclo celular en el sistema hematopoyético temprano	23
IV.5. Perturbación del microambiente hematopoyético	27
IV.6. Desarrollo del linaje linfoide en humanos	28
<b>V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	33
<b>VI. HIPOTESIS</b>	33
<b>VII. OBJETIVOS</b>	34
<b>VIII. MATERIALES Y METODOS</b>	35
VIII.1. Ratones y suspensiones celulares	35
VIII.2. Citometría de flujo y selección celular	35
VIII.3. Tratamiento con 5-fluoro-uracilo	37
VIII.4. Estimulación con el ligando de TLR9	37
VIII.5. Infección por virus de Herpes Simple 1	38
VIII.6. Tratamiento <i>in vivo</i> con bromo-2'-desoxiuridina	38
VIII.7. Análisis del ciclo celular con Hoechst y Pironina Y	39
VIII.8. Expresión de genes asociados a ciclo celular	39
VIII.9. Detección de actividad de la telomerasa	40
VIII.10. Co-cultivos con células estromales	41
VIII.11. Cultivos linfoides libres de suero y estroma	41
VIII.12. Análisis estadístico de estudios en ratón	42
VIII.13. Estudios en humanos: pacientes y controles	42
VIII.14. Definiciones clínicas y determinación de infección por HCMV	43

<b>VIII.15.</b> Citometría de flujo para poblaciones celulares de humanos	44
<b>VIII.16.</b> Análisis estadístico de estudios en humanos	44
<b>IX. RESULTADOS</b>	45
<b>IX.1.</b> Aislamiento de los progenitores linfoides tempranos de ratón	45
<b>IX.2.</b> Efecto de la quimioterapia en la biología de los progenitores linfoides	46
<b>IX.2.1.</b> Heterogeneidad y quiescencia relativa de los progenitores linfoides tempranos y pro-linfocitos en médula ósea de ratones adultos	46
<b>IX.2.2.</b> Rápida división de los precursores linfopoyéticos en hígado fetal	47
<b>IX.2.3.</b> Los progenitores linfoides adultos entran en ciclo durante su reconstitución después de quimioterapia	48
<b>IX.2.4.</b> El potencial de diferenciación de los progenitores de células B en reconstitución después de la quimioterapia se incrementa al nivel de sus contrapartes fetales	49
<b>IX.3.</b> Efecto de la infección viral en la biología de los progenitores linfoides	57
<b>IX.3.1.</b> Los progenitores linfoides expresan TLR9 y su potencial de diferenciación es alterado por la exposición a CpG	57
<b>IX.3.2.</b> La exposición de los progenitores linfoides a CpG lesiona la linfopoyesis temprana de células B y promueve la producción de células dendríticas	59
<b>IX.3.3.</b> La infección aguda de ratones con el virus de herpes simple 1 (HSV-1) induce a los progenitores del linaje B a producir células dendríticas	60
<b>IX.4.</b> Reconstitución de células de linaje linfóide en pacientes receptores de trasplante hematopoyético después de un régimen de quimioterapia mieloablativa	67
<b>X. DISCUSION</b>	70
<b>XI. CONCLUSIONES</b>	77
<b>XII. PERSPECTIVAS</b>	78
<b>XIII. REFERENCIAS</b>	79
<b>XIV. AGRADECIMIENTOS</b>	88

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de primers anversos y reversos para el estudio de expresión de genes del ciclo celular por RT-PCR en tiempo real	40
<b>Tabla 2.</b> Características de donadores voluntarios y pacientes receptores de transplante hematopyético	43
<b>Tabla 3.</b> Progenitores hematopoyéticos con potencial linfoide en médula ósea de ratón	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Expresión de marcadores y esquema de la jerarquía hematopoyética en la médula ósea del ratón	8
<b>Figura 2.</b> Identificación y aislamiento de progenitores linfoides en ratones knock-in RAG1/GFP	11
<b>Figura 3.</b> Marcadores en los estadios progresivos del desarrollo de células B en médula ósea de ratón adulto	14
<b>Figura 4.</b> Producción de células del sistema inmune innato por progenitores linfoides tempranos	16
<b>Figura 5.</b> Rutas de diferenciación temprana de células T	19
<b>Figura 6.</b> El nicho hematopoyético	22
<b>Figura 7.</b> Regulación del ciclo celular en hematopoyesis temprana	26
<b>Figura 8.</b> Cambios en las frecuencias de células hematopoyéticas de médula ósea tras el tratamiento con 5-fluoro-uracilo	26
<b>Figura 9.</b> El modelo de linfo-hematopoyesis en humanos	32
<b>Figura 10.</b> La mayoría de los progenitores linfoides de médula ósea adulta Se encuentran en estado de quiescencia y son heterogéneos con respecto a su actividad proliferativa	51
<b>Figura 11.</b> Los precursores linfoides en hígado fetal están en rápida división celular	52
<b>Figura 12.</b> La quimioterapia con 5-fluoro-uracilo induce la disminución transitoria de progenitores linfoides y la pérdida de expresión de c-kit	53
<b>Figura 13.</b> Los progenitores linfoides en reconstitución después de la quimioterapia están en ciclo celular activo, y algunos cambios en la expresión de genes reguladores de ciclo celular corresponden a los patrones de sus contrapartes fetales	54
<b>Figura 14.</b> Los progenitores linfoides en reconstitución por quimioterapia semejan a sus contrapartes fetales con respecto a su potencial de diferenciación de células B	55

<b>Figura 15.</b> Modelo de la dinámica poblacional de progenitores linfoides tempranos en vida fetal y etapa adulta	56
<b>Figura 16.</b> Los progenitores linfoides expresan altos niveles de TLR9 y responden a CpG en cultivo	58
<b>Figura 17.</b> La exposición a CpG depleta preferencialmente precursores de células B en médula ósea y promueve la producción de células dendríticas a partir de CLP	61
<b>Figura 18.</b> La reducción de las células de linaje B en médula ósea después de la exposición a CpG es parcialmente mediada por $TNF\alpha$ , pero la polarización hacia el linaje dendrítico no requiere esta citocina	62
<b>Figura 19.</b> Producción de células dendríticas por progenitores linfoides en la infección por HSV-1	63
<b>Figura 20.</b> La infección por HSV-1 disminuye la timopoyesis, pero el potencial de diferenciación de los progenitores de T en médula ósea permanece indemne	65
<b>Figura 21.</b> La unión de TLR9 sobre los progenitores comunes linfoides promueve la producción de células dendríticas a expensas de la linfopoyesis	66
<b>Figura 22.</b> La reconstitución de células B después del trasplante hematopoyético es dañada por condiciones de inflamación e infección, pero no por quimioterapia mieloablativa	69

## ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluoro-uracilo

BrdU: bromo-2'-desoxiuridina

CB: células B

Cdks: cinasas dependientes de ciclinas

CKIs: inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas

CLP: progenitores comunes linfoides

CMP: progenitores comunes mieloides

CpG: oligonucleótidos de citosina-fosfato-guanosina fosfotiolados

CT: células T

DC: célula dendríticas

ELP: progenitores tempranos linfoides

ETP: progenitores tempranos de timocitos

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GFP: proteína verde fluorescente

GMP: progenitores granulocíticos-mieloides

HSC: células troncales hematopoyéticas

Hst: Hoechst

HSV-1: virus de herpes simple 1

IKDC: células dendríticas asesinas productoras de interferón

LMPP: progenitores multipotentes de especificación linfoide

LSK: fracción  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-kit}^{\text{hi}}$

LSP: progenitores L-selectina<sup>+</sup>

MDP: progenitores de macrófagos y células dendríticas

MEP: progenitores de megacariocitos y eritrocitos

MPP: progenitores multipotentes

NK: células asesinas naturales

NMP: progenitores de neutrófilos y monocitos

ODN: oligo-desoxi-nucleótido

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

pDC: células plasmacitoides dendríticas

PE: ficoeritrina

Pro-L: pro-linfocitos

PY: pironina Y

RAG1: gen de activación de la recombinasa 1

SP: población lateral

TLR: receptores tipo Toll

## I. RESUMEN

En los últimos años se han registrado avances notables en la caracterización de los progenitores primitivos que dan inicio al programa linfóide, y en la definición de los patrones de actividad transcripcional que controlan las decisiones del linaje, pero no ha sido definida con precisión la relación entre las señales ambientales y la estabilidad de la ruta de diferenciación linfóide. El presente estudio se enfocó en estudiar la influencia que ejercen factores exógenos tales como la quimioterapia y la infección en el desarrollo temprano de los progenitores hematopoyéticos que inician el programa de diferenciación linfóide. Mediante ensayos de incorporación continua de bromo-desoxi-uridina y análisis de DNA/RNA se evidenció que en la médula ósea adulta, la mayoría de los progenitores linfoides tempranos (ELP) están en quiescencia, mientras que sus contrapartes fetales proliferan activamente. El tratamiento mieloablativo indujo a los ELP a entrar en ciclo celular activo y aumentó poderosamente su potencial de diferenciación hacia el linaje de células B, pero no la linfopoyesis de T, revelando heterogeneidad en la sensibilidad de los progenitores linfoides primitivos a las señales microambientales generadas durante quimioterapia. En los progenitores linfoides fue definida la expresión de receptores tipo Toll (TLR) para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos; y su estimulación por ligandos agonistas, como CpG y motivos de DNA virales, promovió la producción de diversas categorías de células dendríticas a expensas de la linfopoyesis de B, pero no de T. Estos hallazgos muestran que los cambios generados en el microambiente por quimioterapia mieloablativa e infecciones amenazantes pueden influenciar selectivamente el potencial de diferenciación y las decisiones de linaje de los progenitores linfoides.

## II. ABSTRACT

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. Therefore, the impact of exogenous factors/conditions such as chemotherapy and infection on hematopoietic progenitors that have just initiated the lymphoid differentiation program represented the focus of this study. Continuous BrdU and DNA/RNA analysis revealed that most of early lymphoid progenitors in adult bone marrow were in cell cycle quiescence, while their fetal counterparts actively proliferated. Following myeloablative treatment, early lymphoid progenitors entered the cell cycle and strongly increased their B cell –but not T cell- potential, suggesting they are heterogeneous with respect to sensitivity to environmental cues during chemotherapy. Expression of functional Toll-like receptors on lymphoid progenitors was defined, and its ligation by phosphorothiolated cytosine-phosphate-guanosine-containing oligonucleotides and viral motifs promoted dendritic cell production at the expense of B lymphopoiesis. These findings show that some changes generated in BM microenvironment by chemotherapy or life-threatening infections, may selectively influence the differentiation potential and cell fate decisions of lymphoid progenitors.

### III. INTRODUCCION

El aprendizaje alrededor 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 (HSC) en la médula ósea del ratón (1) preparó el terreno para construir el mapa hematopoyético basado en la existencia de progenitores restringidos a linajes celulares específicos, y promovió 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. Se encuentra actualmente en construcción un modelo para la arquitectura y regulación del nicho hematopoyético, y todavía falta explorar 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 (DC) tienen un programa único que puede ser activado desde las vías de diferenciación linfoide o mieloide (2-4). De acuerdo a esta clasificación, las rutas de desarrollo linfoide y mieloide progresan a través de estadios críticos de diferenciación de las HSC, compromiso de sus progenitores y maduración de sus precursores; y se han representado como una serie de opciones binarias, excluyentes e independientes (5). Aunque este concepto ha sido

apoyado por la purificación exitosa de los progenitores linfoides comunes (6) y los progenitores mieloides comunes (7), 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 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 (8-11).

La revisión de la bibliografía y el trabajo experimental presentados en esta tesis doctoral pretenden proporcionar un panorama claro del conocimiento actual de los eventos tempranos de la linfopoyesis en ratón y su interrelación con el microambiente hematopoyético, así como de los hallazgos más recientes que sugieren la potencial influencia de factores extrínsecos durante eventos como quimioterapia, inflamación y/o infecciones, en la estabilidad de la producción del linaje linfoide.

## **IV. MARCO TEORICO**

### **IV.1. CELULAS TRONCALES Y EL INICIO DE LA DIFERENCIACION HEMATOPOYETICA**

Las células troncales se han clasificado en pluripotentes o embrionarias, y en multipotentes. Las células pluripotentes son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo); pueden ser cultivadas indefinidamente y dan origen a todos los tipos celulares del cuerpo, razón por la que son empleadas 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 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 (12).

El conocimiento actual de la biología de las células troncales y los progenitores tempranos, así como del 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 creciente 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 (13).

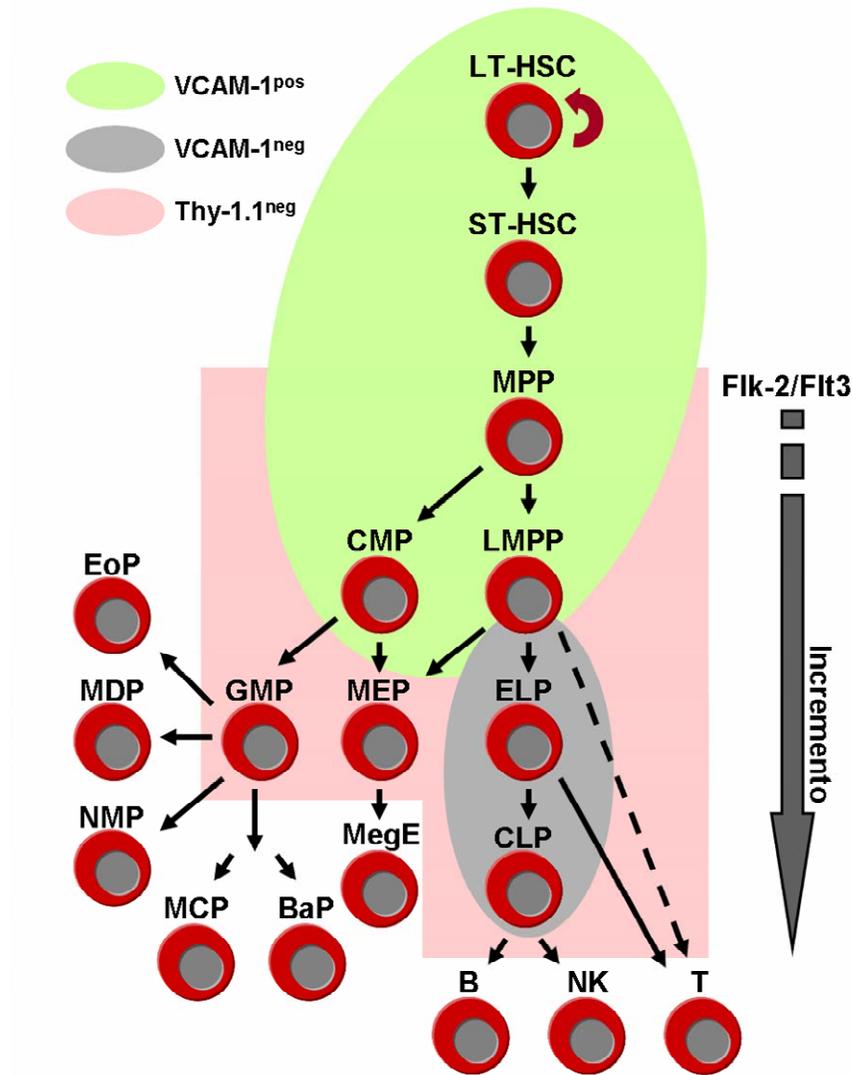
La hematopoyesis es iniciada por una población única de HSC que reside principalmente en el hígado en la vida fetal y en la médula ósea en la vida adulta. Dos propiedades las hacen particulares: su capacidad de auto-renovación y su potencial de diferenciación en las múltiples categorías celulares sanguíneas: 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 ( $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^{\text{hi}}$ ), en donde convergen todas las poblaciones que carecen de expresión de marcadores de linaje definido, pero expresan en membrana la molécula Sca-1 y una alta densidad de c-kit (CD117) (14). En este compartimiento se llevan a cabo los eventos más tempranos de la hematopoyesis a partir de HSC que generan progenitores primitivos cuyo compromiso de linaje se establece gradualmente (8). Algunos otros marcadores, como Thy1.1 y CD150, han sido de utilidad en el rastreo de la progresión de HSC a los progenitores multipotentes. En ratones congénicos, las HSC representan cerca del 8% de LSK que expresan bajos niveles de Thy1.1, y aproximadamente el 40% de éstas expresan CD150, un miembro de la familia SLAM que define a las LT-HSC (15).

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 HSC hacia una estirpe celular (6,7), resultando en la completa e inmediata segregación de los procesos de linfopoyesis y mielopoyesis (5). Sin embargo, ese paso crítico parece no ser una simple selección entre los linajes linfoide 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 tirosin 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 $\alpha$ <sup>-</sup>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 mieloide y linfoide (9,16) (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 en la médula ósea (Figura 1). Cuando estos parámetros son combinados con otros marcadores o animales knock-in, 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 CMP. Las CMP (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 GMP (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 MEP (Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>Fc $\gamma$ RII/III<sup>lo</sup>) productores de células de linaje megacariocítico y eritroide (7,9,16), aunque ha sido sugerida una participación de los LMPP en el aporte de GMP. La fracción GMP está dividida en poblaciones que no expresan la integrina  $\beta$ 7 y poblaciones que la expresan en baja densidad. Esta última está pre-destinada hacia los linajes de basófilos y células cebadas, mientras que la  $\beta$ 7-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 LMPP en la generación de GMP, como la relación lineal entre los precursores derivados de GMP permanecen todavía imprecisos (9).



**Figura 1. Expresión de marcadores y esquema de la jerarquía hematopoyética en la médula ósea del ratón.** Conforme la diferenciación progresa a partir de las células troncales de larga duración, la expresión de la molécula de adhesión VCAM disminuye y Flt3 aumenta, lo que permite el fraccionamiento de poblaciones hematopoyéticas y la generación de un modelo de diferenciación temprana en la médula ósea. 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 linfoide; ELP, progenitor linfoide temprano; CLP, progenitor común linfoide; CMP, progenitor común mieloide; MEP, progenitor megacariocítico-eritroide; GMP, progenitor granulocítico-mieloide; 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 Iwasaki y cols. (9) y Adolfosson y cols. (16).

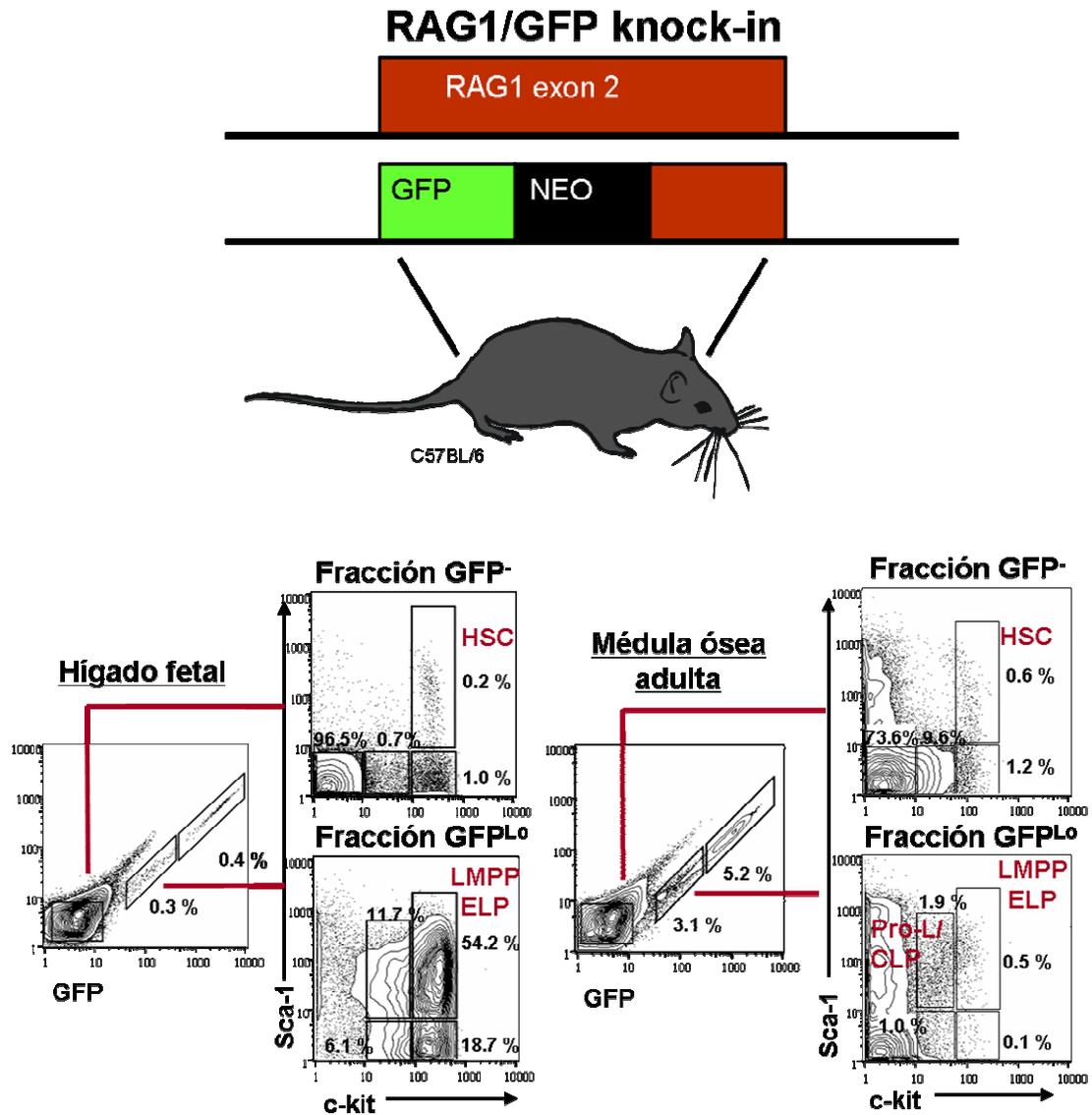
## IV.2. PROGENITORES LINFOIDES Y LINFOPOYESIS TEMPRANA

Durante la ontogenia y a lo largo de la vida adulta, la producción de las células linfoides B, T y 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 un concierto de factores de transcripción y señales microambientales que resulta en la restricción, ganancia y pérdida de funciones (10,17).

**Los progenitores linfoides.** La población de LMPP proveniente de células troncales multipotentes y no auto-renovables de la médula ósea del ratón, contiene progenitores clonales, de los cuales al menos el 38% tienen un potencial combinado de células T, B y mieloide (18), un menor número es restringido a linajes de B o T, y más del 60% genera células NK. Aproximadamente la tercera parte de los LMPP expresan con cierta heterogeneidad transcritos de genes linfoides como RAG1 o IL-7R $\alpha$ . A lo largo de su progreso, la disminución de la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 (19) 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 linfoide (20). La actividad de recombinasa de RAG1 es esencial en el desarrollo del sistema linfoide, por lo que los ratones knock-in RAG1/GFP se han constituido como una herramienta particularmente útil en la investigación del proceso de linfopoyesis temprana (4,20-23), 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 ELP (de 'early lymphoid progenitors') (Figura 2). 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 (21). Las células que expresan RAG1 en embriones pueden ser separadas en una serie de estadios de diferenciación, comenzando con la fracción  $c\text{-kit}^{\text{hi}}\text{Sca1}^+\text{GFP}^{\text{lo}}$  y culminando con  $c\text{-kit}^{\text{lo/-}}\text{GFP}^{\text{hi}}$ . Tanto en hígado fetal, como en médula ósea adulta, las células troncales y los progenitores mieloides residen en la fracción  $\text{GFP}^-$ , mientras que los progenitores linfoides en la  $\text{GFP}^+$  (Figura 2). Los ELP de la médula ósea adulta son parte de la población LSK, son primitivos en términos de marcadores de superficie ( $\text{Lin}^- \text{ckit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^+ \text{Thy1.1}^- \text{IL7-R}^-$ ), 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 (20,24). Su potencial para generar todas las líneas de células linfoides es muy alto, así como para producir ciertas categorías celulares del sistema inmune innato, pero el potencial de diferenciación mieloides es reducido. Acorde con estas características, los ELP 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  $\text{Lin}^- \text{ckit}^{\text{lo}} \text{Sca-1}^+ \text{Thy1.1}^- \text{Flt3}^+ \text{GFP}^+$ , que ha desregulado la expresión de *c-kit* e incluye a la mayoría de los progenitores linfoides comunes o CLP.

Los CLP expresan en superficie el receptor de IL-7 (*IL-7R $\alpha$* ) (6), 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 (6,22,23,25). 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 (26-28). La expresión de *IL-7R $\alpha$*  es distintivo de los CLP, y su señalización esencial para el desarrollo de linfocitos B y T en el ratón (29).



**Figura 2. Identificación y aislamiento de progenitores linfoides en ratones knock-in RAG1/GFP.** El gen de la proteína verde fluorescente se insertó en uno de los alelos de RAG1 y es transcrito bajo su promotor. Las células knock-in de hígado fetal o médula ósea adulta de 10 semanas de edad, son fraccionadas por citometría de acuerdo a los niveles de expresión de GFP y de las moléculas Sca-1 y c-kit. Las células troncales se encuentran en la fracción GFP<sup>-</sup>, mientras que los progenitores linfoides en la fracción GFP<sup>Lo</sup> de intensidad media. No se incluye el análisis de la fracción GFP<sup>Hi</sup> de alta intensidad porque en ella se encuentran principalmente precursores de células B más diferenciados. GFP, proteína verde fluorescente; HSC, células troncales hematopoyéticas; LMPP/ELP, progenitores multipotentes de pre-instrucción linfóide/progenitores linfoides tempranos; Pro-L/CLP, prolinfocitos/progenitores comunes linfoides. Figura adaptada de Yokota y cols. (21).

**Diferenciación de células B.** Haciendo uso de citometría de flujo multiparamétrica, 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 CLP (30). 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 (CB) (28,31,32) y presumiblemente tiene su origen en las CLP. 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 (ver sección 'Fracción A').

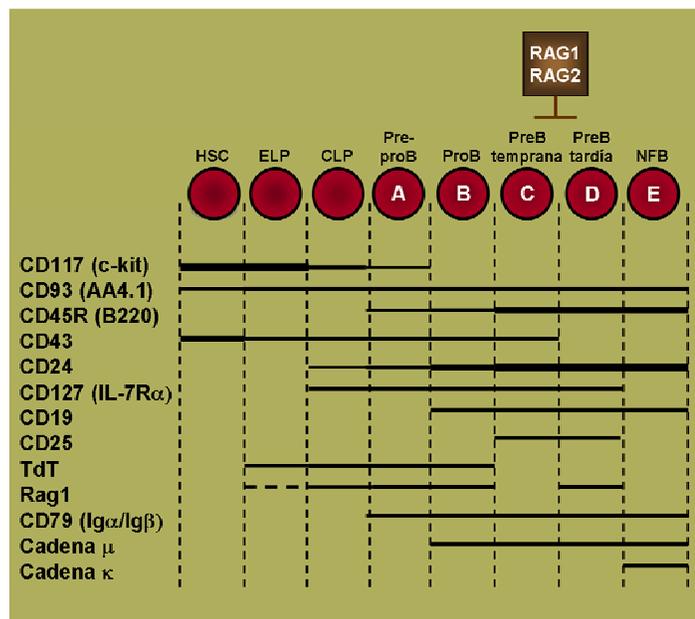
La regulación positiva de CD19 es considerada una de las marcas más tempranas, pero no necesariamente definitivas, del compromiso al linaje B (Figura 3). Células denominadas pre-proB que residen en la Fracción A<sub>2</sub> de Hardy, esto es, B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>CD24<sup>-/lo</sup> y fenotipo adicional AA4.1<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, expresan genes que codifican para componentes de los receptores pre-B y B, tales como mb-1, B29 y λ5, y factores de transcripción necesarios para la diferenciación, como Pax5 y E47. Mas aún, esta población pre-proB B220<sup>+</sup> despliega IL-7Rα en membrana (28), y constituye la conexión entre las CLP 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-7Rα ha sido indicativo de un bloqueo profundo en el desarrollo de B a nivel de la Fracción A<sub>2</sub> (29,33). Los subsecuentes estadios de diferenciación -independientes de antígeno- son guiados con la finalidad de producir células que expresen moléculas de inmunoglobulina funcionales en membrana (Figura 3), 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 (17). 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 (34). 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 diferenciación de células T y B (35). Bcl11a es requerido en el desarrollo de células pre-proB y su actividad parece preceder a la de EBF y Pax5 (36). 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 (37). EBF comienza su expresión en las ELP y prosigue en todos los estadios de la diferenciación de células B antígeno-independiente; y en coordinación con los productos de E2A, EBF es clave en el control previo al rearreglo de genes de inmunoglobulina (34). Finalmente, los extensos estudios sobre la participación de Pax5 en el desarrollo de células B indican que su función es esencial para la represión de la transcripción de genes no linfoides (38,39). 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 (10,40). 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 células T (41).

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

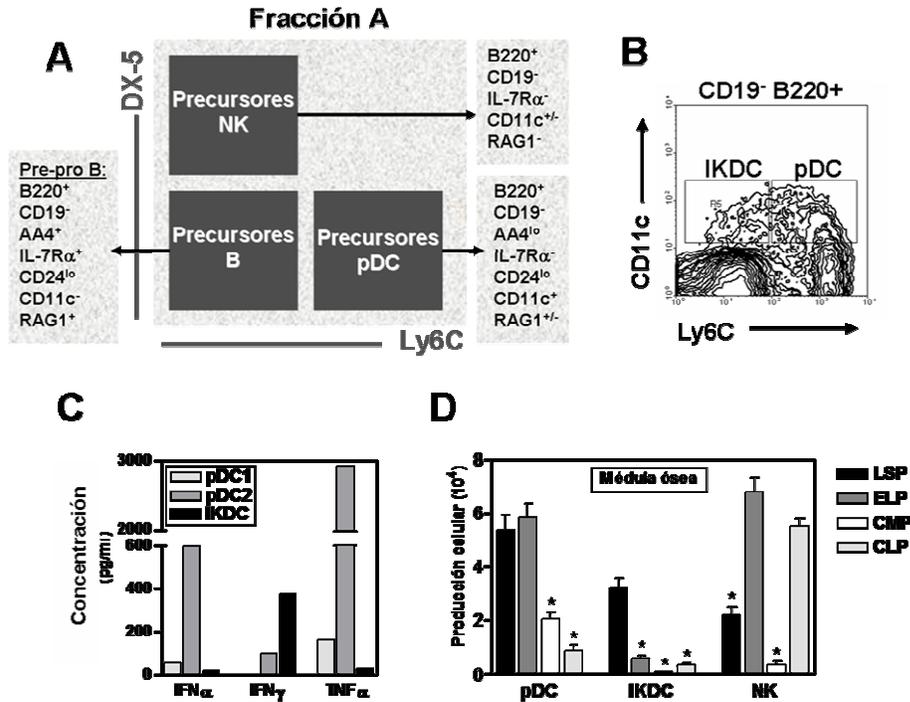
linaje B, otra población ha emergido en el esquema de diferenciación de B: las células B1. En 2001 fue reportada en médula ósea una población de células CD45R/B220<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> carente de potencial de células T y NK, pero que incluía progenitores bipotenciales de células B y macrófagos, con la habilidad para generar células B1 típicamente 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> (42). Dichas células B1 constituyen una población menor de células B que reside en alta proporción en las cavidades peritoneal y pleural, posiblemente formando parte del sistema inmune innato (43); y aunque sus progenitores (B1P) son producidos más eficientemente durante la embriogénesis, los mismos en la médula ósea adulta retienen cierto potencial. Es necesario ampliar las investigaciones para elucidar la posibilidad de que ellos representen remanentes de un programa fetal, o sean producidos a lo largo de la vida por progenitores linfoides primitivos.



**Figura 3. Marcadores en los estadios progresivos del desarrollo de células B en médula ósea de ratón adulto.** El grosor de las barras horizontales es proporcional a los niveles de expresión de marcadores de superficie y genes relacionados con un compromiso hacia el linaje linfocítico de B. La clasificación de Hardy (fracciones A-E) es mostrada en blanco al interior de los precursores. HSC, células troncales hematopoyéticas; ELP, progenitores linfocíticos tempranos; CLP, progenitores comunes linfocíticos; NFB, células B recién formadas. Figura adaptada de Hardy y cols. (11).

**La Fracción A.** Esta fracción está constituida de los precursores más inmaduros de B (pre-proB) y de otros tipos celulares no-B, componentes del sistema inmune innato. Dos categorías de células dendríticas plasmacitoides (pDC) distinguidas de acuerdo a la expresión de RAG1 en el ratón knock-in RAG1/GFP, se diferencian directamente de ELP y residen entre las  $DX5^-Ly6C^+$  de la fracción A que expresan CD11c (4,23). Se han denominado pDC1 a aquéllas que expresan RAG1/GFP, y pDC2 a las que no lo expresan. El desarrollo de ambas es independiente de IL-7 y de RAG1, pero las pDC1  $RAG1^+$  han sido dotadas de la capacidad de hacer rearrreglos tempranos de las inmunoglobulinas  $D_HJ_H$ , y de expresar algunos transcritos relacionados al linaje de B, tales como RAG, Bcl11a, Ebf, Mb-1 y Pax5. 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 linaje B a estadios tempranos de la diferenciación linfo-hematopoyética (17). En la Fracción A existe también una subpoblación de fenotipo  $DX5^+Ly6C^-$ , que por su expresión de B220 y ausencia de CD19 se encuentra siempre presente en el análisis citométrico de pDC (Figura 4). Dicha subpoblación contiene células que co-expresan el marcador NK1.1 y son expandibles en cultivos con IL-15 (4,23), que fueron originalmente descritas como híbridos fenotípicos y funcionales de células dendríticas y células NK (44,45) y nombradas IKDC (de 'interferon-producing killer dendritic cells'). Similar a las pDC, ellas son  $CD11c^{lo}$ , aunque no son productoras eficientes de  $IFN\alpha$  y se caracterizan por su poderosa capacidad citotóxica y de producción de  $IFN\gamma$  (46). Tanto el perfil de expresión génica, así como la dependencia del factor inhibidor Id2 para su desarrollo indican que las IKDC parecen tener una relación más cercana con células NK que con DC (23,46,47), y nuestros recientes estudios proveen evidencias de su origen linfóide a partir de LMPP, particularmente de los progenitores L-selectina<sup>+</sup> (LSP) (22), reconocidos por su robusto potencial de células T (48) y de ELP (Figura 4) (23). En contraste, los reportes comparables de transplante de progenitores linfóides en animales irradiados sugieren que las células NK clásicas  $B220^-$  son principalmente generadas por CLP (Figura 4) (22,23). Aún está por aclarar si las células IKDC y NK

representan estadios de maduración, o subpoblaciones funcionalmente restringidas. En conclusión, parte de la Fracción A corresponde a células del sistema inmune innato, como las pDC e IKDC, que tienen su origen en progenitores linfoides muy tempranos LSP y ELP, y cuyo brazo de diferenciación aparentemente es previo e independiente del compromiso de los precursores en la ruta de células B.



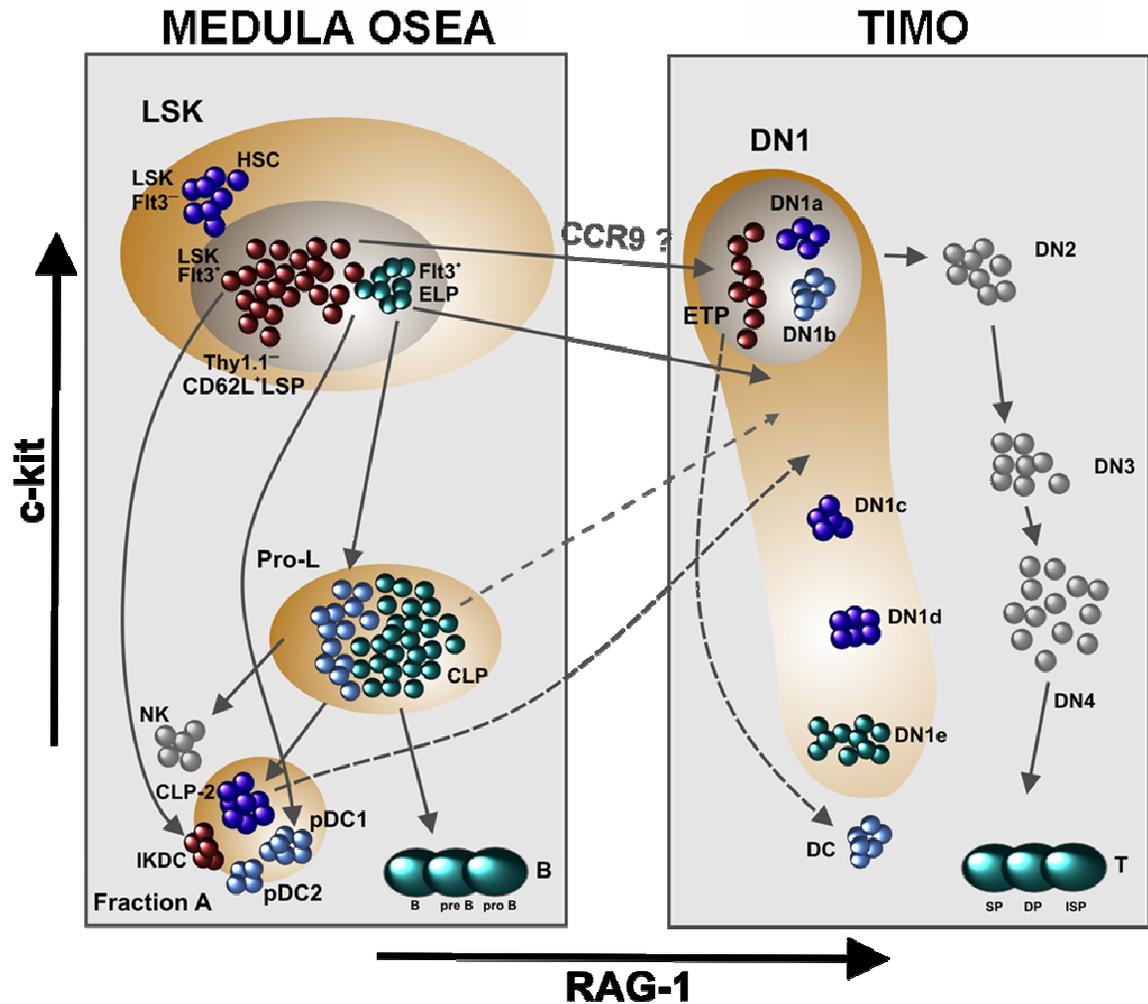
**Figura 4. Producción de células del sistema inmune innato por progenitores linfoides tempranos.** La fracción A contiene 3 poblaciones de precursores identificados de acuerdo a los perfiles de expresión de B220, Ly6C y DX5, entre otros marcadores. Las células pre-proB son los precursores más primitivos del linaje B, mientras que los otros dos compartimientos albergan precursores de células del sistema innato como pDC, IKDC y NK (A). Se aislaron IKDC Ly6C<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> y pDC Ly6C<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> a partir de médula ósea de ratones knock-in RAG1/GFP (B). Las pDC fueron subfraccionadas en RAG1<sup>+</sup> (pDC1) y RAG1<sup>-</sup> (pDC2), y se determinaron sus perfiles de citocinas característicos, en comparación con los de IKDC (C). Cuando fueron transplantados en ratones irradiados, los progenitores linfoides LSP y ELP constituyeron las células de mayor potencial de diferenciación de pDC e IKDC en médula ósea (D), sugiriendo que estas células son producidas muy temprano en la vía de diferenciación linfóide, previo al compromiso de los CLP hacia el linaje de B y NK. LSP, progenitores L-selectina<sup>+</sup>; ELP, progenitores linfoides tempranos; CLP, progenitores comunes linfoides; CMP, progenitores comunes mieloides; IKDC, células dendríticas asesinas productoras de interferon; pDC1 y pDC2, células plasmacitoides dendríticas RAG1<sup>+</sup> y RAG1<sup>-</sup>, respectivamente. Figura adaptada de Pelayo y cols.(4) y Welner y cols.(23).

**Diferenciación de células T.** El timo es el sitio principal para la producción de linfocitos T; sin embargo, no contiene ni produce progenitores de renovación autóloga, por lo que la linfopoyesis de T es mantenida por la importación periódica de progenitores hematopoyéticos a través de la corriente sanguínea (49,50). 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 la naturaleza precisa de las células que colonizan el timo 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 en la fracción LSK con alta densidad de Flt3 (13,16,22,50-52). Entre ellos, los progenitores L-selectina<sup>+</sup> (LSP) y los ELP RAG1<sup>+</sup> son candidatos efectivos en modelos de trasplante (Figura 5), están presentes en la circulación periférica y muestran un potencial predominante en la generación de timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (22). 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 solo CD4 y ~5% solo CD8. Las células DP provienen de timocitos DN y se diferencian a linfocitos T unipositivos para 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 (13,49,50,53). Aunque la capacidad de los ETP para generar células del linaje T es poderosa, ellos retienen cierto potencial de B, NK, DC y mielóide (13), 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) (49). La categoría DN1 contiene a su vez 5 subpoblaciones de acuerdo a los niveles de expresión de c-kit y

CD24 (13). Las dos subpoblaciones de mayor densidad de c-kit, DN1a y DN1b, son potentes progenitores de T con casi nulo potencial de B (54). Por lo tanto, los candidatos más probables para colonizar el timo debieran ser  $\text{Lin}^- \text{CD24}^{-/lo} \text{CD25}^- \text{Thy1}^- \text{Sca1}^+ \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Flt3}^+ \text{CD44}^+ \text{L-sel}^+$ . Dicho fenotipo es similar a los  $\text{Lin}^- \text{ckit}^{\text{hi}} \text{L-selectina}^+ \text{RAG1}^- \text{LSP}$ , lo que ha sugerido que es la población de LSP, y no la de ELP, la que en condiciones normales pudiera participar en la timopoyesis temprana (22). Por otro lado, con ayuda de un ratón transgénico reportero de  $\text{pT}\alpha$ , von Boehmer y colaboradores han identificado otros progenitores circulantes como los CLP-2, que se generan en la médula ósea (Figura 5), con fenotipo más diferenciado ( $\text{c-kit}^{-/lo} \text{B220}^+ \text{CD19}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \text{Sca1}^+ \text{Flt3}^-$ ) y capacidad de reconstitución tímica (55,56). 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  $\text{CCR9}^+$  (51,57). Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que el timo sea colonizado constantemente por múltiples progenitores. Después de su arribo, los precursores con potencial de diferenciación deben ser capaces de una expansión rápida y robusta que sostenga la tasa de producción intrínseca (58,59).

Numerosos factores de transcripción participan en el programa de células T, pero algunas citocinas y la señalización a través de los receptores Notch son requeridos críticamente en los eventos tempranos del desarrollo (10,50). Se piensa que la interleucina 7 (IL-7) y el factor de células troncales (SCF) contribuyen a la sobrevivencia y proliferación de los precursores tímicos, mientras que Notch interviene en la decisión del linaje (10). La inactivación de Notch1 a través de la tecnología loxP-recombinasa *Cre* en ratones neonatos induce una deficiencia en el desarrollo de células T a estadios tempranos, y la acumulación de células B en el timo (60). Consistentemente, el incremento en la expresión de Notch1 en los progenitores hematopoyéticos promueve el desarrollo de células de linaje T en médula ósea (61), apoyando su indiscutible papel en la determinación del linaje de células B vs 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. Las bases moleculares de su actividad y el balance dinámico entre los factores que dirigen el programa, son blanco de intensa investigación (10).



**Figura 5. Rutas de diferenciación temprana de células T.** En este modelo, las poblaciones de células primitivas han sido fraccionadas de acuerdo a la expresión membranar de c-kit y GFP intracelular en el ratón knock-in RAG1/GFP. Las líneas punteadas sugieren bajo potencial de diferenciación, mientras que las líneas continuas indican las rutas más probables de desarrollo del linaje linfóide en médula ósea y del inicio de la colonización tímica. LSK, Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup>; HSC, células troncales hematopoyéticas; LSP, progenitores L-selectina<sup>+</sup>; ELP, progenitores linfoides tempranos; Pro-L, prolinfocitos; CLP, progenitores comunes linfoides; ETP, progenitores tempranos de timocitos; DN, timocitos doble negativos para CD4 y CD8; SP, timocitos unipositivos para CD4 o CD8; ISP, timocitos inmaduros unipositivos para CD4 o CD8. Figura adaptada de Pelayo y cols. (13).

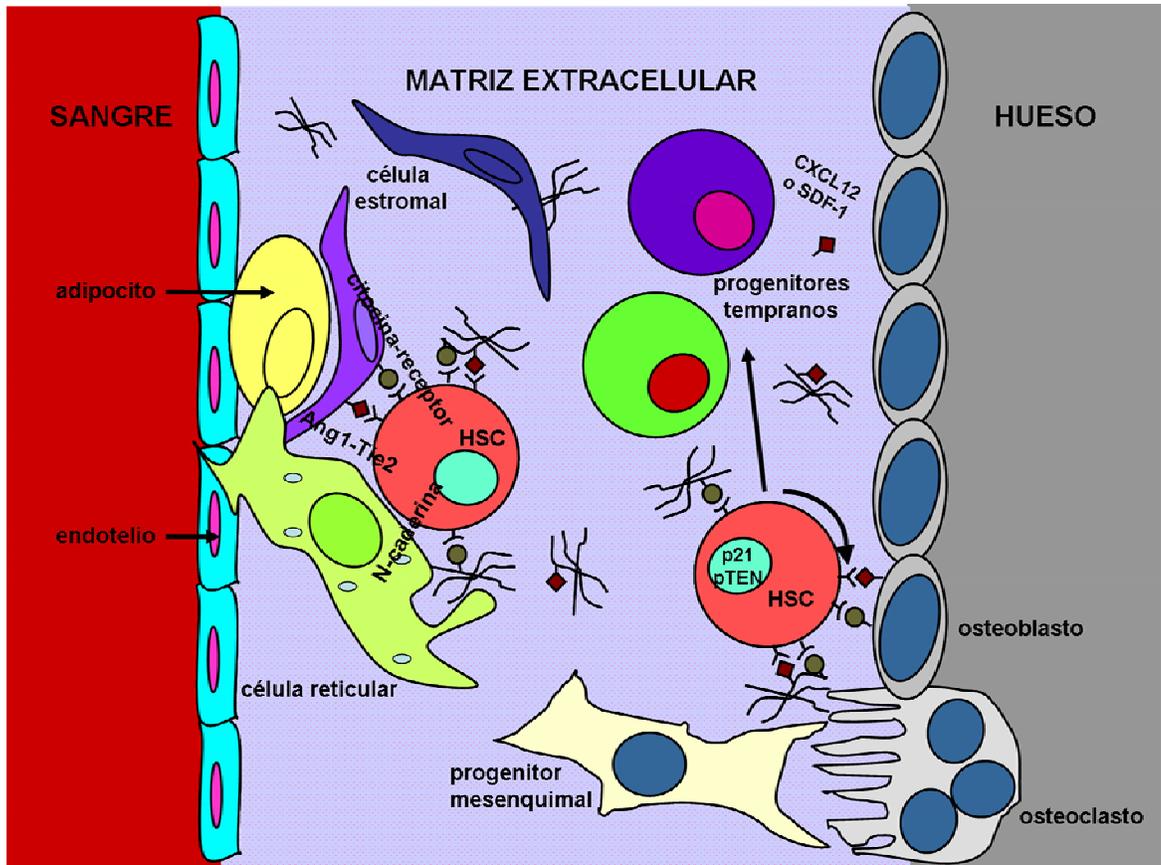
### IV.3. NICHOS HEMATOPOYÉTICOS Y FACTORES MICROAMBIENTALES

Ni las HSC, ni los progenitores primitivos crecen como unidades autónomas independientes. Ambos están rodeados en todas las dimensiones por el microambiente de la médula ósea, definido por interacciones célula-célula y exposición a combinaciones y concentraciones variables de citocinas (62). Este microambiente especializado que sostiene a las células troncales constituye el nicho hematopoyético, el cual promueve el mantenimiento de las HSC a lo largo de la vida. Aún está impreciso el número de nichos y los tipos celulares que contribuyen principalmente a su creación y mantenimiento. Se propone que para que un microambiente sea considerado nicho deben ser satisfechos dos criterios: que en él resida la célula troncal *in vivo*, y que promueva su mantenimiento. Esto significa que no todas las células que son funcionalmente importantes para el mantenimiento de las HSC comprenden el nicho, y que algunos sitios donde ellas residen son transitorios. Existen al menos dos tipos de nichos, el osteoblástico y el vascular (Figura 6). El primero de ellos se encuentra en el endosteo, que es la superficie interna del hueso en la interfase del hueso y la médula ósea. Este tejido está constituido por una capa de osteoblastos y algunos osteoclastos en equilibrio dinámico bajo condiciones normales. Los osteoblastos expresan factores que presumiblemente mantienen los números de HSC en la médula ósea, incluyendo reguladores positivos y negativos, como la angiopoyetina (63) y la osteopontina (64), respectivamente. Por su parte, los osteoclastos producen factores de crecimiento y quimiocinas como la CXCL12 que son críticos para el mantenimiento y la localización de las células hematopoyéticas dentro de la médula ósea (65). Es probable que la interacción de las células del hueso, las células hematopoyéticas y las células vasculares cercanas al endosteo regulen tanto la hematopoyesis como la formación de hueso. Sin embargo, no existe a la fecha evidencia directa de que el mantenimiento de las HSC más primitivas dependa fisiológicamente de la interacción con osteoblastos. Más aún, no se advierte un decremento sustancial de HSC en ratones carentes de osteoblastos, pero hay una pérdida aguda de

progenitores en diferenciación, particularmente del linaje de células B (66), sugiriendo que los progenitores restringidos son más dependientes del nicho osteoblástico que las HSC.

Diversas observaciones demuestran la contribución del nicho vascular en la hematopoyesis. Por un lado, la presencia de HSC perivasculares en saco vitelino, así como en la región de la aorta-gónada-mesonefros y vasos sanguíneos de la placenta; y la capacidad de las HSC para hacer autorenovación y diferenciación durante el desarrollo fetal, antes de la creación de las cavidades de médula ósea, indican que ellas son mantenidas en nichos vasculares previo al nacimiento. Por otro, las células troncales y precursores después de su movilización son localizadas en la superficie exterior de los sinusoides del bazo, sugiriendo que en tejidos extramedulares dichas células pueden residir en nichos alrededor de los sinusoides (15). Los sinusoides son vasos sanguíneos especializados que transportan circulación venosa y a través de su endotelio las células hematopoyéticas pueden entrar y salir de la circulación. El ambiente perivascular en médula ósea está marcado también por células reticulares que promueven la estancia de las células troncales, presumiblemente por un mecanismo mediado por CXCL12 (65). Otras células y condiciones pudieran contribuir a la creación de nichos hematopoyéticos, incluyendo a los progenitores mesenquimales. Al menos en cultivo, ellos tienen el potencial para generar hueso, cartílago y grasa, y los estudios en humano muestran que además son reguladores importantes de la hematopoyesis normal y en estado de desequilibrio, como es el caso del síndrome mielodisplásico (67,68). En general, las células que componen los nichos pueden tener papeles y propiedades múltiples además de su función de soporte de la hematopoyesis en un ambiente natural (69-71). El nicho mantiene a las HSC en ciclos de prolongada quiescencia en los cuales alrededor del 70% de las células están en  $G_0$ , presumiblemente debido a la expresión de factores genéticos intrínsecos que inhiben el ciclo celular, como p21 y pTEN, así como a la actividad de moléculas de anclaje como Tie-2 y angiopoyetina (63,72-74). La 'activación' de la HSC, por mecanismos no bien definidos a la fecha, induce la autorenovación o división celular asimétrica, en la que una célula hija

conserva las propiedades de la célula madre y la otra se diferencia a progenitores multipotentes (73), que eventualmente migran a diferentes microambientes de la médula ósea (Figura 6).



**Figura 6. El nicho hematopoyético.** El esquema muestra los componentes potenciales del nicho celular en la médula ósea en condiciones normales. Algunas HSC se localizan cerca del endosteo en donde se hipotetiza que osteoclastos y osteoblastos crean un nicho para su mantenimiento, mientras que otras HSC son mantenidas por un nicho de una variedad de células perivasculares. 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 Moore & Lemischka (69).

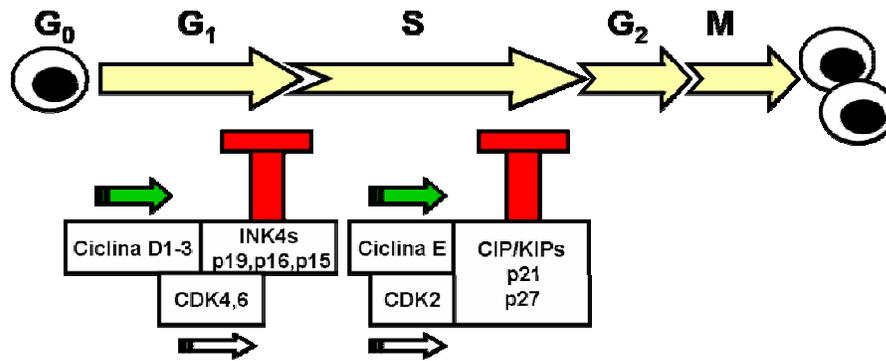
#### IV.4. EL CICLO CELULAR EN EL SISTEMA HEMATOPOYETICO TEMPRANO

Por largo tiempo se propuso la sucesión clonal como el mecanismo de soporte de la hematopoyesis. En ésta, solo un número pequeño de HSC clonales da lugar a las células maduras según la demanda del sistema, y el resto de las HSC permanecen inactivas y no contribuyen a la hematopoyesis hasta que la capacidad proliferativa de la clona troncal en ciclo es agotada (75). Para abordar esta posibilidad, la proliferación de las HSC *in vivo* por medio de cinéticas de incorporación de bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) fue analizada por algunos grupos de investigación (76,77). En ratones adultos, el 99% de las HSC incorporaron BrdU al final de 6 meses de administración continua, y aunque el 75% de las HSC se encontraban en G<sub>0</sub> (fuera del ciclo celular) en cualquier momento del estudio, todas las HSC fueron reclutadas intermitentemente al ciclo celular, de tal modo que la población completa se divide en promedio cada 57 días. Estos resultados advirtieron que las células troncales no están permanentemente en un estado de quiescencia, sino que son reemplazadas muy lentamente, y condujeron a la búsqueda de posibles mecanismos de supresión.

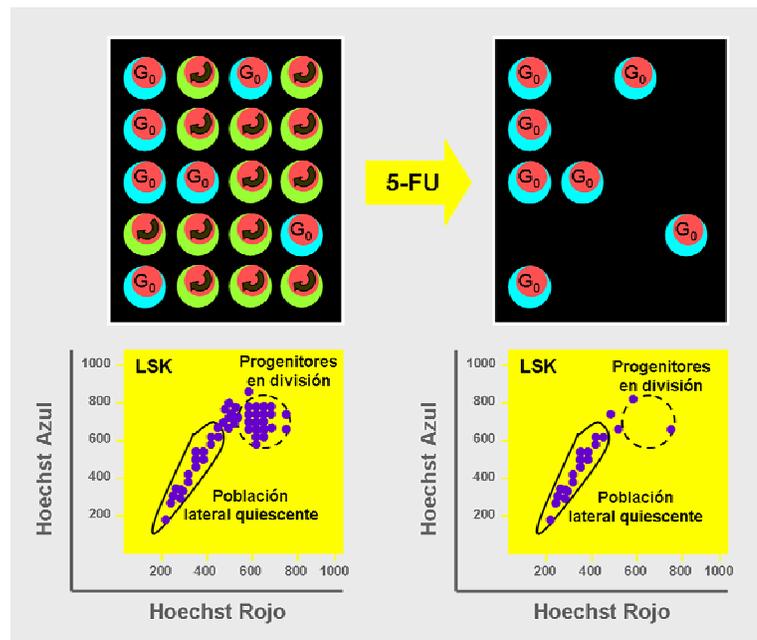
El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias de proteínas clave: la de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks), las cuales inducen procesos de fosforilación de serinas y treoninas sobre proteínas selectas; y la de las ciclinas, que son proteínas de activación que unen moléculas Cdks y controlan su capacidad para fosforilar proteínas blanco. Las ciclinas G<sub>1</sub> se unen a Cdks durante la fase G<sub>1</sub> y son requeridas para la entrada en la fase S, mientras que las ciclinas mitóticas se unen a Cdks durante G<sub>2</sub> y son indispensables para la entrada a mitosis. Sin ciclinas, las Cdks son inactivas; el ensamble cíclico, activación y desensamble de los complejos ciclina-Cdk son los eventos clave que dirigen el ciclo celular (Figura 7). Además de la regulación por ciclinas y la fosforilación/desfosforilación de la subunidad catalítica, los Cdks son fuertemente controlados por inhibidores de Cdks (CKIs) (78), que interfieren con su actividad principalmente por alteración alostérica de los sitios de unión a ciclinas. Se han identificado dos familias de

proteínas capaces de interactuar con Cdk5 y suprimir la progresión a través de G<sub>1</sub>. La familia Cip/Kip, que incluye p21<sup>Cip/Waf1</sup>, p27<sup>kip1</sup> y p57<sup>kip2</sup> y actúan sobre un amplio rango de complejos; y la familia INK4 que incluye p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> y p19<sup>INK4D</sup> y específicamente inhibe CDK4 y CDK6 (78). El RNA mensajero de p21 es abundante en células troncales en reposo, y su evaluación funcional se ha llevado a cabo usando ratones deficientes (72). En ausencia de p21, la proliferación de HSC incrementa bajo condiciones homeostáticas normales. La exposición de los animales p21<sup>-/-</sup> a agentes mielotóxicos específicos de ciclo celular resulta en un mayor índice de mortalidad, debido a la depleción de células hematopoyéticas en división y al agotamiento del compartimiento de células en quiescencia. En contraste, el RNA mensajero de p27 está presente ubicuamente en todas las poblaciones hematopoyéticas. Usando ratones p27<sup>-/-</sup> en combinación con ensayos de reconstitución, Cheng y colaboradores reportaron que p27 no afecta el número y/o la autorenovación de las HSC, pero cuando son transplantadas HSC p27<sup>-/-</sup>, éstas generan progenitores que eventualmente dominan la producción de células sanguíneas (79). Entonces, p21 gobierna la entrada de las células troncales al ciclo, con lo cual impone límites al tamaño de la población y previene su desaparición, mientras que p27 gobierna la expansión de poblaciones progenitoras (80). Algunos factores de transcripción como c-myc, GATA-2, Gfi-1, Bmi-1 y aquellos de la familia Hox han mostrado participación en la proliferación y diferenciación de células primitivas de médula ósea, y la modulación de su señal pudiera representar una tentativa para el mejoramiento de la terapia con precursores hematopoyéticos (81). Por otro lado, el reciente hallazgo de dos moléculas estrechamente relacionadas a la quiescencia de las células troncales ha permitido visualizar un 'nicho de inactividad' como el sitio y estado metabólico más seguro para las células fundadoras del sistema hematopoyético (63,74). Arai y colaboradores demostraron que las células troncales en G<sub>0</sub> expresan el receptor tirosin-cinasa Tie2 y que la señalización inducida por su ligando angiopoyetina (Ang-1) tiene un efecto anti-apoptótico en las células troncales, promueve su estado de quiescencia, mantiene su actividad repobladora de larga duración, y las protege del estrés mielosupresor

(63). En 2006, tras la inactivación del gen PTEN que codifica para un regulador negativo de la vía de señalización PI(3)K-Akt, Zhang y colaboradores demostraron el papel crucial de este factor intrínseco en la restricción prolongada de la activación de las células troncales, en la determinación de su destino, y en la prevención de leucemogénesis (74). El tratamiento experimental con drogas citotóxicas anti-cancer ha sido muy útil para elucidar el estado de las células troncales. El 5-fluorouracil (5-FU), que mata células mitóticamente activas en médula ósea, causa el enriquecimiento de la población de células primitivas que retiene solo niveles bajos del colorante vital rodamina 123 o del colorante Hoechst, la cual ha sido denominada población lateral (Figura 8). La mayoría de las LT-HSC quiescentes residen en esta fracción y son susceptibles de entrar en ciclo tras el tratamiento con 5-FU, y en algunas ocasiones migrar a circulación sanguínea; sugiriendo que los cambios en el ambiente microhematopoyético generados por drogas quimioterapéuticas llevan a las células troncales a transitar de la quiescencia al ciclo (73,82). En conjunto, estos estudios marcan un progreso sustancial en el entendimiento de la dinámica poblacional de las células troncales y señalan que el estado de quiescencia las protege de estrés por radiación y quimioterapéuticos, promueve su adhesión óptima al nicho y disminuye sus requerimientos de factores de crecimiento y oxígeno (73). En contraste, sólo recientemente se han desarrollado métodos para estudiar células que apenas inician el programa de diferenciación linfoide, y por lo tanto la información disponible acerca de su comportamiento proliferativo *in vivo* es todavía escasa.



**Figura 7. Regulación del ciclo celular en hematopoyesis temprana.** La activación secuencial de los complejos de ciclinas/cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) guían la progresión de las células hematopoyéticas en quiescencia a las fases  $G_1$  y S del ciclo, mientras que ciertos inhibidores de cdks como p19, p21 y p27 son candidatos naturales que regulan negativamente la entrada a las fases S y  $G_2$ , controlando así el mantenimiento de poblaciones primitivas.



**Figura 8. Cambios en las frecuencias de células hematopoyéticas de médula ósea tras el tratamiento con 5-fluoro-uracilo.** En el compartimento  $Lin^-Sca^+c-kit^{hi}$  (LSK), una fracción celular se encuentra en la población lateral quiescente, mientras que después del tratamiento con 5-FU el número de progenitores en división se reduce dramáticamente y la mayoría de las células que permanecen pertenecen a la población lateral quiescente. Figura adaptada de Suda y cols. (73).

## IV.5. PERTURBACION DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

Los factores de crecimiento y diferenciación son los elementos extrínsecos principalmente responsables de dirigir y mantener la hematopoyesis basal bajo circunstancias normales. Esta probablemente ocurre en el contexto de secreción de niveles bajos de citocinas esenciales, tales como SCF, Tpo, Flt3L y GM-CSF (83); sin embargo, en respuesta a agentes mieloablativos, inflamación o infección, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y supresoras provenientes de células del sistema inmune innato y componentes del nicho, puede incrementarse y desbalancear el proceso. En particular, una sobre-exposición a citocinas pro-inflamatorias como son IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha/\beta$ , y limitina suprime la linfopoyesis por inducción de muerte celular de los precursores linfoides tempranos, los cuales son altamente sensibles a apoptosis (84). Adicionalmente, la inflamación e infección posiblemente resulten en la exportación prematura de células linfoides y mieloides a la periferia. De hecho, 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, concomitante con la movilización extramedular de las células hematopoyéticas (85-87). Los estudios de Kelsoe y sus colaboradores sugieren que el aumento de granulocitosis por inflamación compromete la linfopoyesis en la médula ósea 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 (86,87). Por otro lado, datos recientes señalan que células que residen en la fracción de HSC de médula ósea de ratón reconocen directamente productos bacterianos a través de receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4; y que la activación de estos receptores puede alterar el ciclo celular y los patrones normales de diferenciación (88). 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 periódicamente la linfo-hematopoyesis temprana.

## IV.6. DESARROLLO DEL LINAJE LINFOIDE EN HUMANOS

Gran parte del conocimiento actual de la biología de los progenitores linfoides y el desarrollo temprano del sistema linfo-hematopoyético en humanos se deriva de estudios *in vitro*, y en menor grado, de la contribución de algunas anormalidades genéticas y modelos quiméricos. Aún cuando los fenotipos de la superficie celular que caracterizan a los progenitores hematopoyéticos del humano son a menudo distintos de sus contrapartes murinas, los hallazgos sugieren que el proceso de linfopoyesis es consistente con los principios delineados en modelos experimentales (12,89).

**Los progenitores linfoides tempranos.** En la médula ósea y el cordón umbilical del ser humano, una variedad de progenitores multipotentes residen en la fracción celular que no expresa en la superficie membranal ningún marcador de célula sanguínea madura, pero expresa CD34. La aparición de CD10 y de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en dichas células es probablemente uno de los eventos iniciales que distinguen a los progenitores linfoides (89). Así mismo, el receptor de quimiocina CXCR4 es sustancialmente expresado en células con actividad precursora linfoide, de tal modo que se especula que podría ser un marcador distintivo de la contraparte de ELP del ratón. Los posibles progenitores linfoides comunes (CLP) expresan además el receptor de interleucina 7 (IL-7), CD38 y CD45RA, y aunque, tanto en cultivo como *in vivo*, muestran un potencial residual hacia células T, NK y dendríticas, se diferencian principalmente a linfocitos B (90) (Figura 9). Por otro lado, células que expresan CD34, CD45RA y CD7, pero no expresan CD10 ni el receptor de IL-7, son eficientes en la generación de células T y NK (91).

**Desarrollo de las células B.** En la ontogenia, el desarrollo de las células B puede ocurrir en el *omentum* y el hígado fetal, mientras que después del nacimiento se confina primordialmente a la médula ósea. Aún cuando la información acerca de los

eventos de transición a partir de los potenciales CLP a los precursores de células B es muy limitada, se han identificado poblaciones funcionales que definen la vía de diferenciación río abajo, iniciando con las células B tempranas  $CD34^+CD19^-CD10^+$ , y continuando con pro-B  $CD34^+CD19^+CD10^+$ , pre-BI grandes  $CD34^+CD19^+CD10^+$ , pre-BII grandes  $CD34^-CD19^+CD10^+$ , pre-BII pequeñas  $CD34^-CD19^+CD10^+$ , B inmaduras  $CD34^-CD19^+CD10^+sIgM^+$  hasta la producción de B maduras  $CD34^-CD19^+CD10^-sIgM^+sIgD^+$ , que eventualmente serán exportadas a los tejidos linfoides periféricos para cumplir su función de reconocimiento de antígeno, activación y producción de anticuerpos específicos (Figura 9). El proceso completo en la médula ósea requiere de la acción concertada de múltiples factores de transcripción, incluyendo Ikaros, PU.1, E2A, EBF y Pax-5. Los dos primeros actúan paralelamente en el control de la transición de las células troncales a progenitores, mientras que E2A, EBF y Pax-5 regulan secuencialmente el desarrollo de las células B tempranas (39). La linfopoyesis de B en el humano parece cumplirse sin el requerimiento de algunas citocinas documentadas como esenciales para el proceso en el ratón, como la interleucina 7, y hasta el momento se desconocen los factores de crecimiento y/o citocinas que la dirigen.

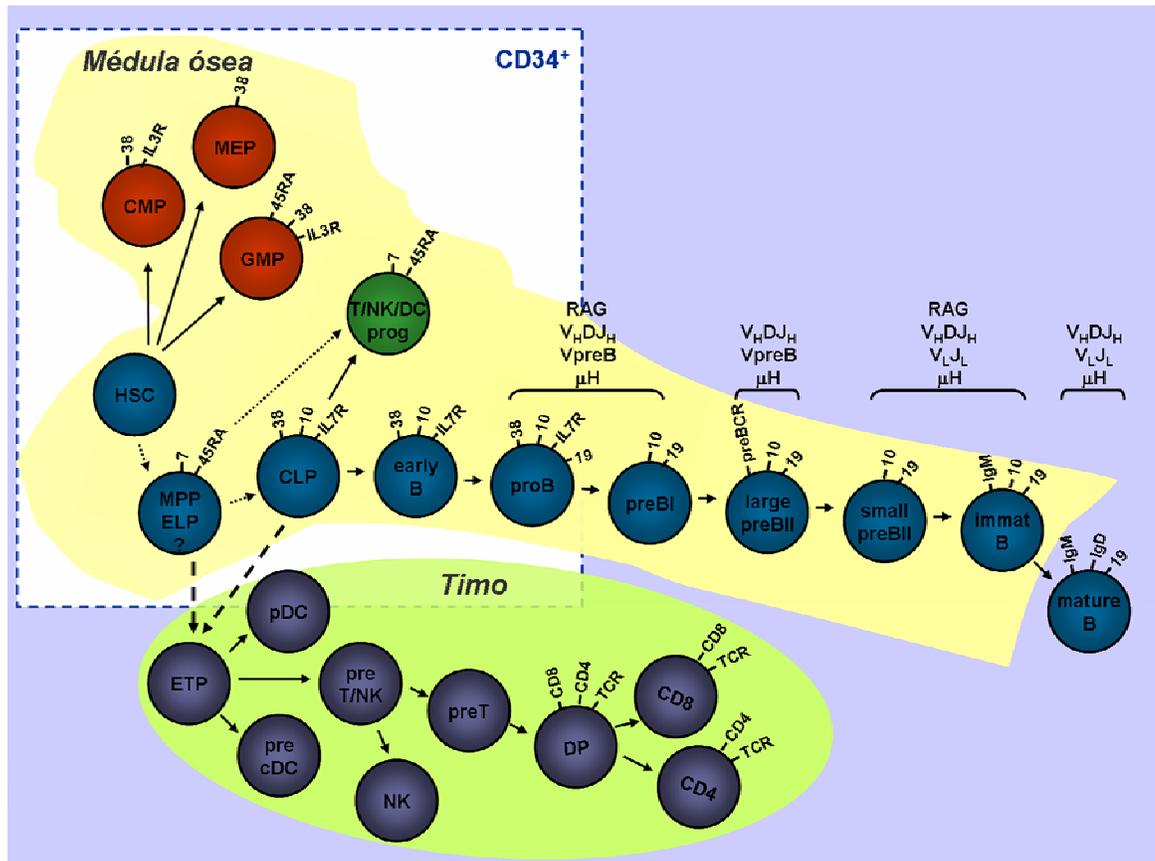
**Desarrollo de las células T.** Los precursores tímicos más tempranos (ETP, del inglés early thymic progenitors) residen en la población  $CD34^+CD1a^-CD38^loCD44^+IL-7R\alpha^+$  y a partir de ellos se inicia el proceso de compromiso de estadios intermedios de diferenciación desde células pre-T, células inmaduras CD4 uni-positivas pequeñas, células CD4 uni-positivas grandes, células tempranas doble-positivas (EDP), hasta los timocitos DP  $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^+$ , los cuales darán origen a la diversidad de linfocitos T maduros CD4 y CD8 con capacidad de reconocimiento de antígeno y activación. La participación de algunos factores de transcripción en este proceso ha sido blanco de gran investigación, y actualmente es claro que las interacciones de los receptores Notch con sus ligandos juegan un papel crucial en el control de la diferenciación y proliferación de los precursores tempranos, dirigiendo así las decisiones de linaje de T en el timo (50), concomitante

con la supresión del linaje de B. Así mismo, el balance de la expresión de las proteínas E y sus antagonistas naturales Id está implicado en la diversificación tímica T/NK (89), y el factor GATA3 es esencial para el rearrreglo apropiado de genes del receptor de células T. Respecto a la importancia de las citocinas, se conoce que la linfopoyesis de T es críticamente dependiente de IL-7, lo que ha sido sustentado por la profunda deficiencia en células T (pero no B) que desarrollan los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada por defectos genéticos en el gen que codifica para la cadena  $\gamma$ c del receptor de IL-7, y los pacientes deficientes en IL-7R $\alpha$  (89).

**Desarrollo de células NK y dendríticas.** Las células asesinas naturales (NK) pueden producirse en múltiples sitios. En el feto se han encontrado precursores en médula ósea, hígado, timo, bazo y ganglios linfáticos, mientras que en niños y adultos la médula ósea es el sitio predominante de su desarrollo, a partir de progenitores linfoides. Los factores de transcripción Id2 y Id3 controlan el desarrollo temprano de las células NK, mientras que los tres estadios que definen el proceso completo -el compromiso de linaje, la selección del repertorio de receptores NK y la maduración funcional- son críticamente dependientes de la interleucina 15, la cual mantiene la viabilidad y sostiene la proliferación de las células en desarrollo (92). Por otro lado, el origen hematopoyético del creciente número de poblaciones de células dendríticas en el humano está, a la fecha, pobremente definido. Sin embargo, la expresión de algunos genes asociados al linaje linfoide en las células plasmacitoides dendríticas (pDC) sugiere una afiliación linfoide en la médula ósea, y datos recientes indican que Notch, en concierto con el factor de transcripción Spi-B pudieran regular la diversificación de linaje T/pDC en el timo (93).

**Linfopoyesis temprana después del trasplante hematopoyético.** El trasplante de células troncales y progenitores hematopoyéticos en individuos inmunocomprometidos o que han desarrollado cáncer, es capaz de rescatar la hematopoyesis y fortalecer el sistema inmune (12). Los Centros para el Control y

Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés 'Centers for Disease Control and Prevention') y el Centro Internacional de Transplantes de Sangre y Médula Osea (CIBMTR, del inglés 'Center for Internacional Blood & Marrow Transplant Research') registran anualmente alrededor de 30,000 individuos que requieren transplante de HSC como medida de rescate a largo plazo del sistema hematopoyético tras la mieloablación provocada por agentes quimioterapéuticos (94,95). Varios factores impactan el resultado de estos transplantes: la edad del receptor, el tipo del donador, estadio de la enfermedad, la sobrevivencia a la toxicidad de la quimioterapia y a las infecciones, y la eficiencia de potencial de las células transplantadas. La recuperación del sistema inmune se lleva a cabo en tres fases: la fase I incluye los primeros 30 días post-transplante; la fase II, del día 30 al día 100, y la fase III los días subsecuentes al día 100 post-transplante. De ellas, la fase I es crucial para el establecimiento y diferenciación de los progenitores tempranos. Durante esta fase, la leucopenia prolongada y el rompimiento de la barrera mucocutánea causada por los regímenes preparativos constituyen dos factores de riesgo críticos, e independientes de si el transplante es autólogo o alogénico. El índice de reactivación del virus de herpes simple y la infección por oportunistas que acceden al organismo a través de mucosas son elevados (95). El destino de las células troncales y los progenitores hematopoyéticos primitivos bajo estas condiciones extremas de estrés es un tema actualmente explotado, ya que de ese destino dependen la iniciación y el mantenimiento de los linajes encargados de restablecer la inmunidad innata y adaptativa.



**Figura 9. El modelo de linfo-hematopoyesis en humanos.** Aunque la mayoría de las poblaciones celulares parecen coincidir con las delineadas en ratón, se desconoce si existe una contraparte precisa de ELP y si ésta es responsable de colonizar el timo para dar inicio a la timopoyesis. HSC, célula troncal hematopoyética; MPP/ELP, progenitor multipotente/progenitor linfoide temprano; CLP, progenitor común linfoide; CMP, progenitor común mieloide; GMP, progenitor de granulocitos y monocitos; MEP, progenitor de megacariocitos y eritrocitos; ETP, progenitor de timocitos temprano. Figura adaptada de Blom & Spits (89).

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad, las células troncales multipotentes y los progenitores hematopoyéticos tempranos son utilizados de forma frecuente para rescatar la hematopoyesis, así como robustecer los sistemas de inmunidad innata y adaptativa, en numerosos tipos de cáncer, deficiencias inmunológicas y enfermedades genéticas. Después del trasplante, la reconstitución del sistema inmune depende de varios factores, incluyendo la capacidad de proliferación y maduración, y el potencial de diferenciación de los progenitores. A menudo, el éxito de este proceso se ve amenazado por infecciones oportunistas alentadas por las terapias químicas cito-reductoras de las que es objeto el hospedero, y cuya resolución demanda a su vez el reabastecimiento y la activación de células del sistema inmune.

Se desconoce si la exposición a agentes quimioterapéuticos y a los componentes microbianos influyen potencialmente la función de las células troncales y los progenitores linfoides. Más aún, no tenemos información acerca de la cinética poblacional de dichos progenitores en circunstancias normales o bajo alteraciones nocivas microambientales. La observación y el entendimiento del efecto de la quimioterapia, la inflamación y las infecciones en los procesos de linfo-hematopoyesis temprana son fundamentales, y pudieran tener gran impacto en la biología del trasplante.

## **VI. HIPOTESIS**

Los progenitores linfoides tempranos de la médula ósea son susceptibles a cambios en el microambiente generados por factores externos tales como la quimioterapia y la infección, y su exposición a dichos factores altera el potencial y/o el destino de la diferenciación linfoide.

## VII. OBJETIVOS

### VII.1 OBJETIVO GENERAL

Definir el efecto de la quimioterapia y la infección sobre la diferenciación hematopoyética de los progenitores linfoides tempranos de ratón y humano.

### VII.2 OBJETIVOS PARTICULARES

**VII.2.1.** Determinar las frecuencias y características fenotípicas *in vivo* de los progenitores hematopoyéticos linfoides murinos de origen fetal y adulto, en condiciones normales y bajo la influencia de quimioterapia, inflamación y/o infección.

**VII.2.2.** Estudiar la capacidad proliferativa y el ciclo celular de los progenitores hematopoyéticos fetales y adultos, en condiciones normales y bajo la influencia de quimioterapia, inflamación y/o infección.

**VII.2.3.** Determinar las diferencias en el potencial de diferenciación linfoide entre progenitores hematopoyéticos de médula ósea e hígado fetal de ratón.

**VII.2.4.** Aprender si las señales microambientales liberadas durante quimioterapia, inflamación y/o infección desestabilizan las decisiones de linaje y el destino de los progenitores linfoides de ratón, *in vivo* y bajo condiciones controladas de cultivo.

**VII.2.5.** Estudiar la reconstitución de células del linaje linfoide humano en pacientes con trasplante de células troncales/progenitores hematopoyéticos después de un proceso de quimioterapia.

## VIII. MATERIALES Y METODOS

**VIII.1. Ratones y suspensiones celulares.** Se utilizó una colonia de ratones F1 heterocigotos knock-in RAG1/GFP, generados en el Laboratorio de Recursos Animales de la Oklahoma Medical Research Foundation, a los que se les ha insertado el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en el locus de la enzima RAG1, que recombina los segmentos genéticos VDJ de las inmunoglobulinas y los receptores de antígeno del linfocito T (96,97). Además, se utilizaron ratones C57BL6 (B6; aloantígeno CD45.2), B6-Thy1.1, B6-SJL (aloantígeno CD45.1), TNF<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> y TLR9<sup>-/-</sup>, los cuales fueron mantenidos en el LARC. Algunos ratones B6-Thy1.1 fueron cruzados con los knock-in B6-RAG1/GFP con el fin de producir animales RAG1/GFP que expresen Thy1.1. Las células de hígado fetal se obtuvieron a las edades embrionarias (en días) E13-E16. Para incorporar de 35 a 55 ratones knock-in por grupo de estudio, los experimentos de ciclo celular en adultos se llevaron a cabo con células purificadas de médula ósea de ratones de 2 a 5 meses de edad. El resto de los estudios se realizó en ratones adultos jóvenes de 8 a 10 semanas de edad.

**VIII.2. Citometría de flujo y selección celular.** La médula ósea fue extraída de los fémures, tibias y húmeros con solución amortiguada de fosfatos (PBS) + 3% de suero fetal bovino (FBS). Las células se resuspendieron y enriquecieron por incubación con anticuerpos purificados, dirigidos contra los marcadores de linaje mielóide Gr1 (RB6-8C5) y CD11b/Mac1 (M1/70), de linaje de B CD19 (1D3) y CD45R/B220 (14.8), y de linaje eritroide TER-119; seguido de un proceso de selección magnética negativa usando el sistema de separación Bio-Mag (Qiagen). La suspensión celular parcialmente despojada de células maduras se bloqueó con un anticuerpo anti-receptor de la fracción Fc de las inmunoglobulinas (anti-FcR) y

fue teñida con los anticuerpos conjugados APC-anti-c-kit (2B8) y biotina-anti-marcadores de linaje [Gr-1, Mac-1, CD3 (17A2), CD8 $\alpha$  (53-6.7), CD19, CD45R, pan-NK (DX-5) y TER-119], combinados con estreptavidina conjugada al colorante Rojo 613. La selección multicolor por citometría de flujo ('sorting') se llevó a cabo en un citómetro MoFlo (DakoCytomation) y/o en un FACSaria (Becton Dickinson, BD). En los estudios de ciclo celular, las fracciones de ELP y Pro-L se analizaron numéricamente y seleccionaron en base a los fenotipos Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup> y Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>c-kit<sup>lo</sup>, respectivamente. Para ello, seguido a la depleción de células Linaje<sup>+</sup>, se realizó la primera selección de las fracciones GFP<sup>-</sup> y GFP<sup>+</sup>, en la cual el fondo de autofluorescencia fué discriminado de la fluorescencia auténtica de GFP por la colección de datos en dos canales de fluorescencia sin compensación (17,21). Una segunda ronda de selección fue necesaria para distinguir células con diferentes niveles de expresión de c-kit. Dos consideraciones técnicas se tomaron en cuenta en el análisis de células en reconstitución después de quimioterapia: el anticuerpo CD11b/Mac1 no fué incluido en el protocolo de depleción debido a la probabilidad de que la molécula sea regulada positivamente; y la expresión de Sca-1 (D7) no fué utilizada como parámetro adicional de discriminación de los progenitores, en las cuales éste se expresa a niveles artificialmente altos bajo el tratamiento *in vivo* con 5-fluoro-uracilo (82). La purificación de progenitores a partir de suspensiones de hígados fetales de ratón incluyó la eliminación de células eritroides TER-119<sup>+</sup> previo a la selección celular en dos pasos. En el primero paso se clasificaron células GFP<sup>-</sup>, GFP<sup>lo</sup> y GFP<sup>hi</sup>. Las células se incubaron con anti-FcR antes de su tinción con los anticuerpos APC-anti-c-kit y bio-Sav-R613-anti-Sca-1 o PE-anti-Sca-1, y fueron sujetas a una segunda ronda de selección. Los progenitores hematopoyéticos fetales se fraccionaron de acuerdo a la expresión de Sca-1 y c-kit (Figura 2).

Para el análisis de los transcritos de genes de receptores tipo Toll (TLR), células Lin<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup> provenientes de médula ósea de ratones Thy1.1-RAG1/GFP fueron teñidas con APC-anti-c-kit (2B8), PE-Cy5-anti-Sca1 (D7), FITC-anti Thy1.1 (OX-7), y PE-anti CD34 (RAM34), mientras que las células Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> fueron teñidas con APC-anti-c-kit, PE-Cy5-anti-Sca1 y PE-anti-IL-7R $\alpha$  (A7R34). Las células troncales

hematopoyéticas (HSC) fueron doblemente seleccionadas como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^- \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca1}^+ \text{Thy1.1}^{\text{lo}}$ ; los progenitores multipotentes (MPP) como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^- \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca1}^+ \text{Thy1.1}^-$ ; los progenitores comunes mieloides (CMP) como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca1}^- \text{Thy1.1}^- \text{CD34}^+$ ; los progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP) como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca1}^- \text{Thy1.1}^- \text{CD34}^-$ ; los progenitores linfoides tempranos (ELP) como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+ \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca1}^+ \text{IL-7R}\alpha^-$ ; y los progenitores comunes linfoides (CLP) como  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+ \text{c-kit}^{\text{lo}} \text{Sca1}^+ \text{IL-7R}\alpha^+$ .

Los CLP provenientes de ratones B6,  $\text{TNF}^{-/-}$ , y/o  $\text{TLR9}^{-/-}$ , y utilizados en cultivos linfoides, se purificaron por citometría de acuerdo al fenotipo  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^{\text{lo}} \text{Sca1}^+ \text{IL-7R}\alpha^+$ , después de la tinción con FITC-anti-marcadores de linaje, APC-anti-c-kit, PE-Cy5-anti-Sca1, y PE-anti-IL-7R $\alpha$ . En todos los casos de purificación por citometría, la pureza de cada población fue confirmada por análisis post-selección.

Después del tratamiento *in vivo* con CpG o la infección viral, la médula ósea de los ratones fué cosechada y la frecuencia de las siguientes categorías celulares fue determinada por citometría de flujo en un FACSCalibur BD: células B  $\text{B220}^+ \text{CD43}^- \text{IgM}^+ \text{CD19}^+$ , células pre-B  $\text{B220}^+ \text{CD43}^- \text{IgM}^- \text{CD19}^+$ , células pro-B  $\text{B220}^+ \text{CD43}^+ \text{CD24}^+ \text{CD19}^+$ , células dendríticas plasmacitoides (pDC)  $\text{B220}^+ \text{CD19}^- \text{CD11c}^+ \text{Ly6C}^+$ , células dendríticas asesinas productoras de interferón (IKDC)  $\text{B220}^+ \text{CD19}^- \text{CD11c}^+ \text{Ly6C}^-$ , y células dendríticas convencionales (cDC)  $\text{B220}^- \text{CD19}^- \text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$ . El análisis de las poblaciones se realizó utilizando el programa CellQuest de BD.

**VIII.3. Tratamiento con 5-fluoro-uracilo.** El 5-fluoro-uracilo (5-FU) es una droga perteneciente a la familia de anti-metabolitos utilizados como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer. Es un análogo de pirimidina que inhibe la actividad de la timidilato sintasa y la replicación de DNA, por lo que arresta el ciclo e induce la apoptosis de las células blanco. En el presente estudio, los ratones adultos fueron sujetos a una inyección intraperitoneal de 150 mg/kg peso corporal de 5-fluoro-uracilo en PBS. Las células de médula ósea se recuperaron y analizaron a diferentes tiempos post-tratamiento.

**VIII.4. Estimulación con el ligando de TLR9.** *In vitro*: los CLP provenientes de ratones B6, TNF<sup>-/-</sup> ó TLR9<sup>-/-</sup> fueron altamente purificados e incubados con 0.6 µg/ml del ligando sintético de TLR9, CpG-ODN 1826 [oligonucleótido constituido de motivos citosina-fosfato-guanosina A fosfotilados], por diferentes períodos de tiempo en medio de cultivo X-VIVO15, libre de suero y estroma. Enseguida las células fueron rigurosamente lavadas y cultivadas sin CpG por 8-10 días nuevamente en condiciones libres de suero y estroma, pero en presencia de factores de crecimiento (ver sección de cultivos celulares). *In vivo*: los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 µg/200 µl de CpG-ODN o con agua libre de endotoxina, y 24 ó 48 horas después, las células de médula ósea se cosecharon para su análisis o cultivo.

**VIII.5. Infección por HSV-1.** Grupos de 3 a 5 ratones adultos C57BL/6 fueron anestesiados y subsecuentemente las córneas escarificadas antes de la aplicación tópica del virus de herpes simple-1 (HSV-1) cepa McKrae. Para el modelo de infección aguda, fueron utilizadas 1000 unidades formadoras de placa por córnea ([pfu]/córnea) en un volumen de 3 µl de RPMI-1640, mientras que para el modelo de infección subclínica o latente se aplicaron 300 [pfu]/córnea. Siete o treinta días post-infección, respectivamente, los ratones se anestesiaron y perfundieron con PBS antes de remover la médula ósea para el análisis de poblaciones y purificación de células progenitoras.

**VIII.6. Tratamiento in vivo con bromo-2'-desoxiuridina.** Para los estudios en adultos, grupos de 35 a 55 ratones fueron sujetos a una inyección intraperitoneal de bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, 100 µg/100 µl PBS), mientras que para los estudios fetales se utilizaron grupos de 3 ratones hembras preñadas, a quienes se aplicó la misma dosis de BrdU por la vena caudal al t<sub>0</sub>. En ambos casos se administró BrdU de forma continua en el agua para beber (0.8 mg/ml) durante la duración del experimento. Los progenitores linfoides fueron purificados por citometría, seguido

de la tinción intracelular con anticuerpo anti-BrdU conjugado a ficoeritrina. La fijación y permeabilización de las células, así como el relajamiento de las cadenas de DNA se condujeron de acuerdo a las especificaciones del sistema para estudio de BrdU de BD Biosciences. Las células fueron analizadas en un FACScan con la ayuda de los programas BD Cell Quest y WinMDI.

**VIII.7. Análisis del ciclo celular con Hoechst 33342 y Pironina Y.** La combinación de los colorantes Hoechst 33342 (Hst) y Pironina Y (PY) fué usada para la tinción diferencial de ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA) celulares (98). Los progenitores linfoides se fijaron durante toda la noche en etanol al 70%, fueron resuspendidos en una solución de Hst 2 µg/ml y PY 4 µg/ml, y analizados en un citómetro MoFlo DakoCytomation equipado con laser UV. Debido a que la tinción de RNA con PY rinde un histograma continuo sin una franca demarcación entre las células positivas y negativas, para designar la fracción G<sub>0</sub> en todos los experimentos fue utilizada una ventana de análisis arbitraria que exhibe la tinción mínima de PY, como ha sido reportado previamente (98), y que en la presente investigación comprendió aproximadamente el 15% de las células progenitoras del hígado fetal.

**VIII.8. Expresión de genes asociados a ciclo celular.** Los progenitores linfoides se purificaron por citometría de acuerdo al protocolo descrito previamente, y el cDNA proveniente de ellos fue preparado para análisis de expresión de genes por reacción de polimerización en cadena usando transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real. Las secuencias de los genes de ciclinas, cdks, p21 Cip1/Waf1, p27 Kip1, p19 Ink4d, bcl-2, c-myc, HoxB4, TGF-βR y Gfi-1 se obtuvieron del navegador del genoma del Grupo de Bioinformática de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), mientras que las secuencias específicas de los primers anversos y reversos fueron diseñadas usando el programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) y son mostradas en la Tabla 1. La mezcla de amplificación estuvo constituida del cDNA

templete, de colorante verde SYBR y cada uno de los iniciadores a concentración de 2  $\mu$ M. Las reacciones de amplificación en tiempo real se condujeron en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), aplicando un ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. La expresión relativa de cada gen fue calculada utilizando cDNA de  $\beta$ -actina como control endógeno [Expresión génica relativa =  $2^{(Ct_{ctrl} - Ct_{gen})} \times 10^3$ ].

GEN	Primer anverso	Primer reverso
p21 Cip1/Waf1	gtacttctctgcccctgctg	tctcttgagaagaccaatctg
p27 Kip1	ttgggtctcaggcaaaactct	ggggaaccgtctgaaacatt
p19 Ink4d	ttctcatcgggagctggt	atgctccaccagaacctca
ciclina A2	gagaatgtcaacccccgaaaa	ggggaaggcaggctgtttac
ciclina D1	gcgtaccctgacaccaatct	ctcttcgacttctgctctct
ciclina D2	acctgttgaccatcgaggag	ccaagaaacgggtccaggtaa
cdk2	gccctattccctggagattc	ggggcatagtgacagcattt
cdk4	gattgcctccagaagacgac	ttgtgcaggtaggagtgctg
bcl-2	agtacctgaaccggcatctg	actgtggcccagggtatgc
c-myc	tcctgtacctcgccgattc	ggtttgctcttctccacag
Hox B4	ctggatgcgcaaagttcac	cttcatgcgccgattctg
TGF- $\beta$ R	gcaagttttgcgatgtgaga	ggcatcttccagagtgaagc
Gfi-1	tggcaagagcttcaagaggt	gctctgactgaaggctttgc
$\beta$ -actina	gctctttccagccttctt	gtgctaggagccagagcagt

**Tabla 1.** Secuencias de primers anversos y reversos para el estudio de expresión de genes de ciclo celular por RT-PCR en tiempo real.

**VIII.9. Detección de actividad de telomerasa.** La telomerasa es una enzima polimerasa encargada de restituir la longitud de los telómeros después de cada división celular, haciendo copias de la secuencia TTAGGG a través de su actividad de transcriptasa inversa (transcripción de RNA a DNA) (99). En el presente estudio, la actividad de telomerasa fué medida cuantitativamente en 1000 progenitores linfoides a través de PCR en tiempo real de acuerdo a las especificaciones comerciales de Express Biotech International. En breve, se adicionó enzima activa proveniente de células lisadas a un número variable de repeticiones teloméricas sobre el extremo 3' de un oligonucleótido sustrato. Los productos de extensión fueron amplificados por PCR y luego detectados midiendo el incremento en la fluorescencia resultante de la unión del colorante verde SYBR al DNA de doble cadena (dsDNA). Se condujo una curva estándar para calcular actividad enzimática usando un oligonucleótido con una secuencia idéntica a la de los primers de los telómeros.

**VIII.10. Co-cultivos con células estromales.** Los progenitores linfoides fetales y adultos fueron co-cultivados hasta por tres semanas con las células estromales OP9 transfectadas con un retrovirus que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (OP9-GFP) o el ligando de Notch tipo Delta 1 (OP9-DL1), provenientes del laboratorio del Dr. J.C. Zúñiga-Pflücker. Las condiciones de los cultivos fueron las adecuadas para promover el desarrollo linfoide de células B y T, respectivamente (100). Durante la primera semana se utilizó medio  $\alpha$ -MEM con 10% de SFB, 2-mercaptoethanol  $5 \times 10^{-5}$ M, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100  $\mu$ g/ml, más los factores de crecimiento 'stem cell factor' (SCF) 2 ng/ml, el ligando de Flk2/Flt3 (Flt3-L) 5 ng/ml, e interleucina 7 (IL-7) 2 ng/ml. Durante la segunda y tercer semanas, la concentración de IL-7 fue incrementada a 5 ng/ml. Las células producidas se analizaron por citometría de flujo y los resultados reportados como rendimiento (# de células de cada categoría) por cada unidad de progenitor inicial (input). Las células estromales fueron distinguidas de las

hematopoyéticas por su tamaño y tinción positiva con un anticuerpo que reconoce la molécula de adhesión VCAM-1.

**VIII.11. Cultivos linfoides libres de suero y estroma.** Células purificadas fueron cultivadas por 8-10 días en medio X-VIVO 15 suplementado con 2-mercaptoethanol, L-glutamina, penicilina y estreptomina, y en presencia de SCF, Flt3-L e IL-7. El fenotipo y número de células a partir de cultivos linfoides fueron establecidos por citometría. Las células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> corresponden al linaje de B, mientras que la fracción B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> contiene una mezcla de IKDC y pDC; y la fracción B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> es considerada por su fenotipo como cDC. Los resultados fueron reportados como rendimiento (# de células de cada categoría) por cada unidad de progenitor inicial.

**VIII.12. Análisis estadístico.** El programa GraphPad Prism V3.02 se utilizó para analizar estadísticamente los resultados de este estudio, los cuales fueron en su mayoría presentados como valores de Media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de *t* no pareada y las diferencias se consideraron significativas si los valores de probabilidad resultantes fueron <0.05.

**VIII.13. Estudios en humanos: pacientes y controles.** Evaluamos tres grupos de estudio: un grupo constituido de 28 pacientes transplantados con células troncales y progenitores hematopoyéticos autólogos como tratamiento a enfermedades hematológicas después del régimen mieloablativo condicionante, según lo detalla la Tabla 2; otro grupo constituido de 15 pacientes transplantados con células troncales y progenitores hematopoyéticos alogénicos después del régimen mieloablativo condicionante; y un grupo control comprendido de 10 donadores voluntarios sanos. Los pacientes fueron tratados en el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades Manuel Avila Camacho, I.M.S.S. Puebla; o en el Centro Médico La Raza, I.M.S.S. México. El estudio se llevó a cabo en apego a las normas y regulaciones establecidas universalmente. Tras el consentimiento informado, de

acuerdo a la Declaración de Helsinki, se realizó una toma de muestra de sangre periférica de cada individuo y se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradientes de densidad.

CARACTERISTICAS	TIPO DE TRANSPLANTE		
	Ninguno	Autólogo	Alogénico <sup>3</sup>
Edad (<10 años:>10 años)	0:10	10:18	2:13
Media de edad	29.7	17.0	26.2
Género (M:F)	9:1	15:13	10:5
Enfermedad	NA		
Leucemia linfoblástica aguda		17	1
Leucemia mieloide aguda		3	9
Leucemia granulocítica crónica		0	5
Linfoma no-Hodgkin		6	0
Cáncer de mama		2	0
Terapia preparativa <sup>1</sup>	NA		
CyEA		16	0
CyICT		4	2
BuCy-2		0	13
CyVB		6	0
CyVP		2	0
Serología HCMV <sup>2</sup> (+ : -)	10:0	28:0	15:0
Enfermedad HCMV: # pacientes	NA	0:28	5:15

**Tabla 2. Características de donadores voluntarios y pacientes receptores de trasplante hematopoyético.** Los valores en la tabla representan el número de pacientes. <sup>1</sup>CyEA=ciclofosfamida+etopósido+ citosin-arabinósido; CyICT=ciclofosfamida + irradiación corporal total; BuCy-2=busulfan + ciclofosfamida; CyVB=ciclofosfamida + vepesid + biscloroetilnitrosourea; CyVP=ciclofosfamida + carboplatino. <sup>2</sup>Determinado pre-trasplante en pacientes. <sup>3</sup>Todos los pacientes con trasplante alogénico recibieron un tratamiento inmunosupresor con ciclosporina y metotrexate. NA denota no aplicable.

**VIII.14. Definiciones clínicas y determinación de infección por HCMV.** Un individuo fue considerado infectado por citomegalovirus humano (HCMV) cuando el gen viral inmediato temprano IE-1 fue detectado en su muestra de PBMC. La enfermedad por HCMV fue definida como la presencia de DNA viral, anticuerpos IgM específicos y antigenemia viral pp65, acompañados de fiebre, leucopenia y/o evidencia de invasión a órganos. La detección del gen IE-1 de HCMV se condujo por amplificación cualitativa de una secuencia de 242 pb, de acuerdo a lo descrito (101). Las pruebas de serología para anticuerpos IgM e IgG anti-HCMV utilizaron el sistema Abbott AxSYM; mientras que la antigenemia de pp65 viral fue determinada por inmunocitoquímica (102).

**VIII.15. Citometría de flujo para poblaciones celulares de humanos.** El análisis fenotípico de las células mononucleares se llevó a cabo por citometría de flujo de tinciones monocromáticas, utilizando anticuerpos anti-CD19 (PE), -CD14 (FITC), -CD4 (PE) y -CD8 (PE).

**VIII.16. Análisis estadístico de estudios en humanos.** El programa GraphPad Prism V3.02 se utilizó para analizar estadísticamente los resultados del estudio en humanos. Para comparaciones intergrupales se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U, en tanto el análisis de correlación de la reconstitución de linfocitos con el tiempo post-transplante se hizo a través de la prueba de Spearman. Las diferencias entre grupos se consideraron significantes si los valores de probabilidad resultantes fueron  $<0.05$ .

## IX. RESULTADOS

**IX.1. AISLAMIENTO DE LOS PROGENITORES LINFOIDES TEMPRANOS DE RATON.** La médula ósea de ratones adultos y el hígado fetal a diversas etapas embrionarias constituyeron la fuente de las diversas poblaciones de progenitores linfoides en esta investigación. Para evitar la contaminación entre progenitores y reducir la plasticidad experimental en sus potenciales de diferenciación, las poblaciones se seleccionaron al menos dos veces por citometría de flujo. La Tabla 3 resume las características fenotípicas que fueron consideradas para su alta purificación, así como el potencial de diferenciación mostrado tanto en sistemas de cultivos como en modelos murinos de trasplante hematopoyético, acorde a lo descrito (13,17,57). Una de las características distintivas de los progenitores que dan inicio al programa de compromiso linfóide es la activación del locus RAG1, propiedad que fue explotada para su aislamiento de los ratones reporteros RAG1/GFP.

Progenitor	Definición	Potencial de diferenciación
HSC	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>hi</sup> c-kit <sup>hi</sup> Thy1.1 <sup>lo</sup> , GFP <sup>-</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	Multipotente
MPP	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>hi</sup> c-kit <sup>hi</sup> Thy1.1 <sup>-</sup> , GFP <sup>-</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	Multipotente
LSP	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> c-kit <sup>hi</sup> Thy1.1 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> GFP <sup>+/-</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	T, (débil) NK, pDC, IKDC, (débil) mieloide
ELP	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> c-kit <sup>hi</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> , GFP <sup>+</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	B, T, (débil) NK, pDC, IKDC, (débil) mieloide
Pro-L	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>lo</sup> c-kit <sup>lo</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>+/-</sup> , GFP <sup>+</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	B, T, NK, DC (débil) mieloide,
CLP	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>lo</sup> c-kit <sup>lo</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> , GFP <sup>+</sup> en ratón reportero RAG1/GFP	B, T, (débil)mieloide

**Tabla 3.** Progenitores hematopoyéticos con potencial linfóide en médula ósea de ratón.

## **IX.2. EFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA EN LA BIOLOGIA DE LOS PROGENITORES LINFOIDES.**

**IX.2.1. Heterogeneidad y quiescencia relativa de los progenitores linfoides tempranos y pro-linfocitos en médula ósea de ratones adultos.** Con el objeto de estudiar el estado proliferativo de los progenitores linfoides de médula ósea adulta, ELP y Pro-L provenientes de ratones knockin RAG1/GFP tratados con bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) fueron fraccionados de acuerdo a la Figura 2 y Tabla 3. La administración continua de BrdU dio como resultado curvas de marcaje bifásicas para ambas poblaciones de progenitores linfoides (Figura 10A). Una pendiente inicial elevada fue característica del índice de marcaje del DNA de una fracción de células en ciclo relativamente rápido, que estuvo seguida de una segunda curva de leve inclinación, indicando la entrada gradual de las células marcadas a una fracción considerablemente mayor y más lenta (103). La extrapolación de la segunda curva al tiempo necesario para alcanzar el marcaje del 100% de las células resultó en un tiempo promedio aparente de ciclo celular de 11.9 días para la población total de ELP y de 11.4 días para la de Pro-L. Ambos tiempos son sustancialmente largos en comparación con el mostrado por la fracción de médula ósea de células  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{GFP}^-$ , que fue de 5 días. Consistente con estos hallazgos, el análisis del contenido celular de DNA/RNA reveló que casi el 70% de ELP y Pro-L en la médula ósea del adulto se encuentran en  $G_0$  en cualquier momento a lo largo del estudio (Figura 10B). En conjunto, estos resultados indican que las poblaciones de progenitores linfoides son una mezcla de células que representan al menos dos estadios de cinética poblacional: un número menor de células en ciclo, y aproximadamente dos tercios del total de las poblaciones en relativa quiescencia (fuera del ciclo celular). La curva lenta de marcaje lineal correspondiente al segundo subgrupo celular indica que esas ELP y Pro-L no están permanentemente en  $G_0$ , sino son periódicamente lanzadas a entrar en ciclo celular, y la duplicación o reemplazo de la población transcurre lentamente.

La denominación progenitores linfoides tempranos no implica homogeneidad. De hecho, aunque la mayoría de ellos expresa TdT y RAG1, muchos expresan las diversas combinaciones de estas características, indicando que éstas no son adquiridas sincrónicamente. Nuestra observación con respecto al ciclo celular es que los ELP con los más altos niveles de RAG1 incorporan BrdU a un índice mucho menor que los ELP con menor expresión de RAG1 (Figura 10C). Este análisis fue llevado a cabo a las 24, 36, 120 y 156 horas de tratamiento continuo con BrdU, observándose el mismo comportamiento. El mismo parámetro reveló similar heterogeneidad en la población de Pro-L: las células con mayor índice de incorporación de BrdU correspondieron con las de menores niveles relativos de RAG1. Entonces, los datos de cinética mostrados en la Figura 9 representan valores promedio para subtipos celulares que no son homogéneos respecto a su actividad mitótica y del gen RAG1. Las variaciones en la actividad transcripcional del gen RAG1 pudiesen estar inversamente asociadas a proliferación, tal que la recombinación de los genes de inmunoglobulina ocurra de una forma segura.

### **IX.2.2. Rápida división de los precursores linfopoyéticos en hígado fetal.**

Previos estudios han revelado una variedad de diferencias en las linfopoyesis fetal y adulta (62). Nuestro análisis del ciclo celular indicó que aproximadamente el 20% de los ELP de hígado fetal en el día 14 de gestación (E14) se encuentran en las fases S+G<sub>2</sub>+M del ciclo celular, y un 58% adicional en G<sub>1</sub> (Figura 11A). De manera similar, todas las demás poblaciones linfoides en E14, incluyendo células CD19<sup>+</sup>RAG1/GFP<sup>hi</sup> exhibieron una alta proporción de células en ciclo. Estas observaciones, consistentes con ciclos celulares de relativamente corto tiempo, demuestran una considerable fracción en crecimiento de células linfoides tempranas en vida fetal. La inyección de hembras preñadas con BrdU y el subsecuente análisis de incorporación a las 6 horas revelaron altos índices de marcaje de los progenitores linfoides fetales en este corto intervalo de tiempo, en contraste a sus contrapartes adultas (Figura 11B). De hecho, a los 13 días de gestación más del 70% incorporaron BrdU; y aunque este índice tendió a declinar con la edad

gestacional, siempre fue mayor que el observado para los ELP adultos 6 días después de suministro continuo de BrdU, sugiriendo que los índices de proliferación aparente de los progenitores fetales son sustancialmente mayores, y que al menos se requiere un intervalo de tiempo 30 veces mayor para alcanzar el grado equivalente de marcaje con células adultas. Por lo tanto, sólo una minoría celular se encuentra en estado quiescente antes del nacimiento.

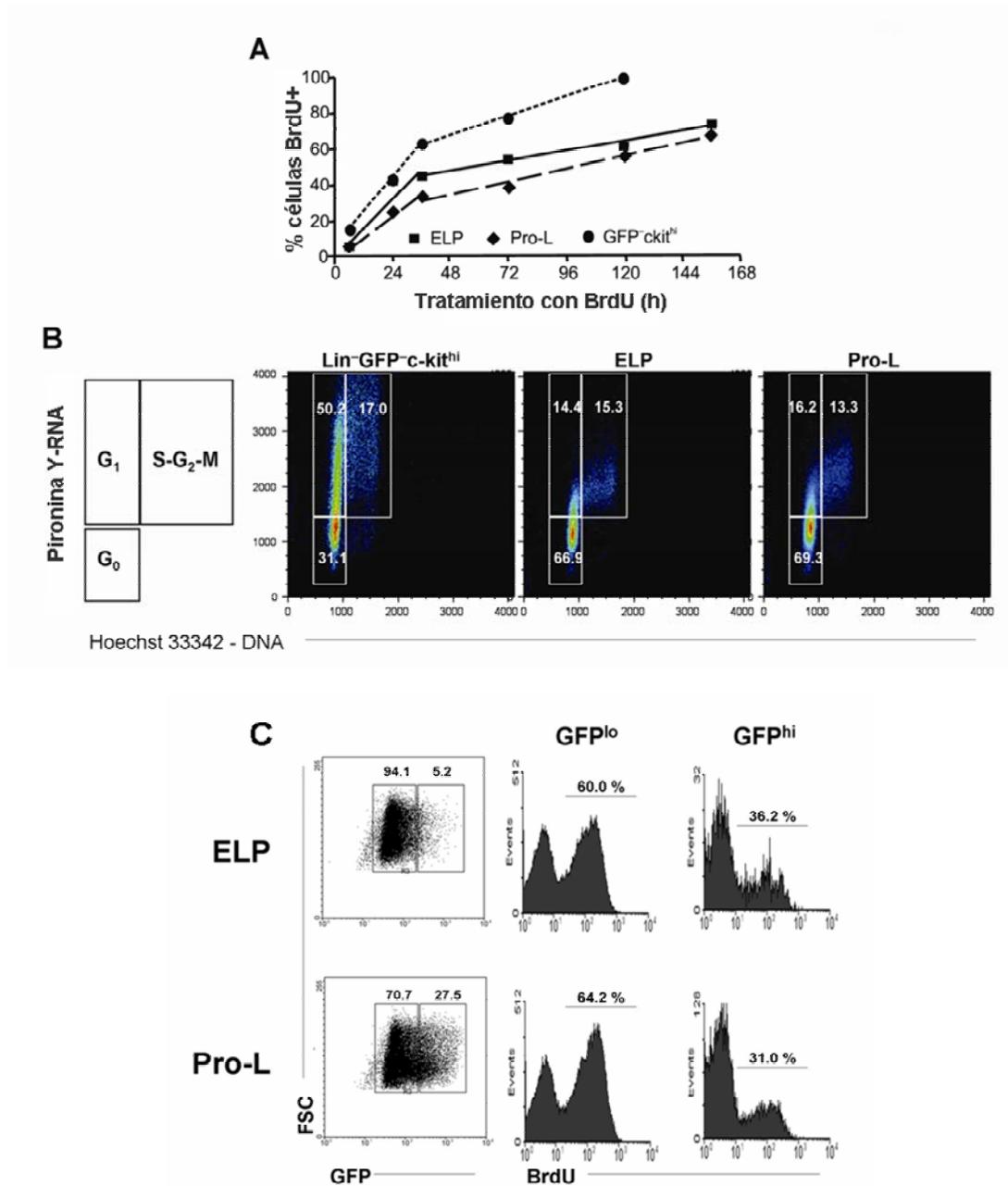
**IX.2.3. Los progenitores linfoides adultos entran en ciclo durante su reconstitución después de quimioterapia.** Algunas características de las células troncales fetales son readquiridas por sus contrapartes adultas después de quimioterapia. Por ejemplo, Flt3, Mac1 y CD34 son expresadas por las células fetales, pero no por las adultas (21,104); y en el proceso de 'rebote' de quimioterapia (el lapso de tiempo posterior a la mieloablación en que se lleva a cabo la repoblación del sistema hematopoyético) estas moléculas aparecen nuevamente en la membrana celular (82,105). Para conocer si las propiedades proliferativas de las células fetales pueden ser inducidas en la médula ósea adulta, los ratones reporteros RAG1/GFP fueron inyectados con 5-fluorouracilo y examinados periódicamente hasta 8 días después, resultando en una depleción transitoria de los progenitores linfoides, seguida por su dramática recuperación a partir del cuarto día después del tratamiento (Figura 12A), cuando el rebote de la quimioterapia comienza a tener lugar (82). Como se ha reportado previamente, a tiempos tempranos post-quimioterapia las células de médula ósea pierden expresión del receptor para el factor de células troncales, c-kit (Figura 12B y ref.82), por lo que en los experimentos conducidos a partir del cuarto día la densidad de c-kit no fue utilizada como un parámetro de distinción de ELP y Pro-L. Ya que sólo pocos progenitores GFP<sup>+</sup> en rebote desplegaron IL-7R fue asumido que la mayoría de los generados recientemente eran equivalentes a ELP. Los marcadores característicos de progenitores fetales Mac1 (CD11b) y CD34 fueron re-expresados en muy baja frecuencia de células Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> en rebote (Figura 12C). Para evaluar la proliferación celular después del tratamiento con quimioterapia, a los animales se

les administró BrdU por inyección intraperitoneal y durante 6 horas en el agua de beber. El 34% de los progenitores adultos incorporó BrdU en 6 horas (Figura 13A), y el 60% de la población enriquecida en ELP de adulto mostró estar en las fases G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M, es decir, el porcentaje de progenitores en la fracción inactiva G<sub>0</sub> fue sustancialmente reducida (Figura 13B) durante el rebote. Consistente con estas observaciones, la actividad de telomerasa en células fetales fue 4 veces mayor que en las adultas, y marcadamente inducida en los progenitores en reconstitución de la quimioterapia (Figura 13C). Para averiguar si las diferencias en la actividad mitótica de células fetales vs adultas se relacionaban a factores intrínsecos, los transcritos de algunos mediadores importantes de ciclo celular fueron evaluados (Figura 13D). La transcripción de los genes de ciclina A2, ciclina D1 y Cdk4 fue mucho menor en los progenitores adultos que en los fetales, mientras que la de Cdk2 y Gfi-1 fue menor en células fetales. Ninguno de estos patrones fue revertido después de la quimioterapia. En contraste, los niveles de ciclina D2, c-myc, Bcl-2, p19, p21, p27, HoxB4 y TGFβ2R en los progenitores en proceso de reconstitución tendieron a semejar a aquéllos provenientes de hígado fetal. Entonces, los niveles de 8 de 13 reguladores de ciclo coincidieron con la re-entrada en división celular, pero sin la correspondiente re-expresión de marcadores de superficie fetal, indicando que algunos aspectos del programa de diferenciación fetal pueden ser re-adquiridos por los progenitores adultos durante la etapa de recuperación de la quimioterapia.

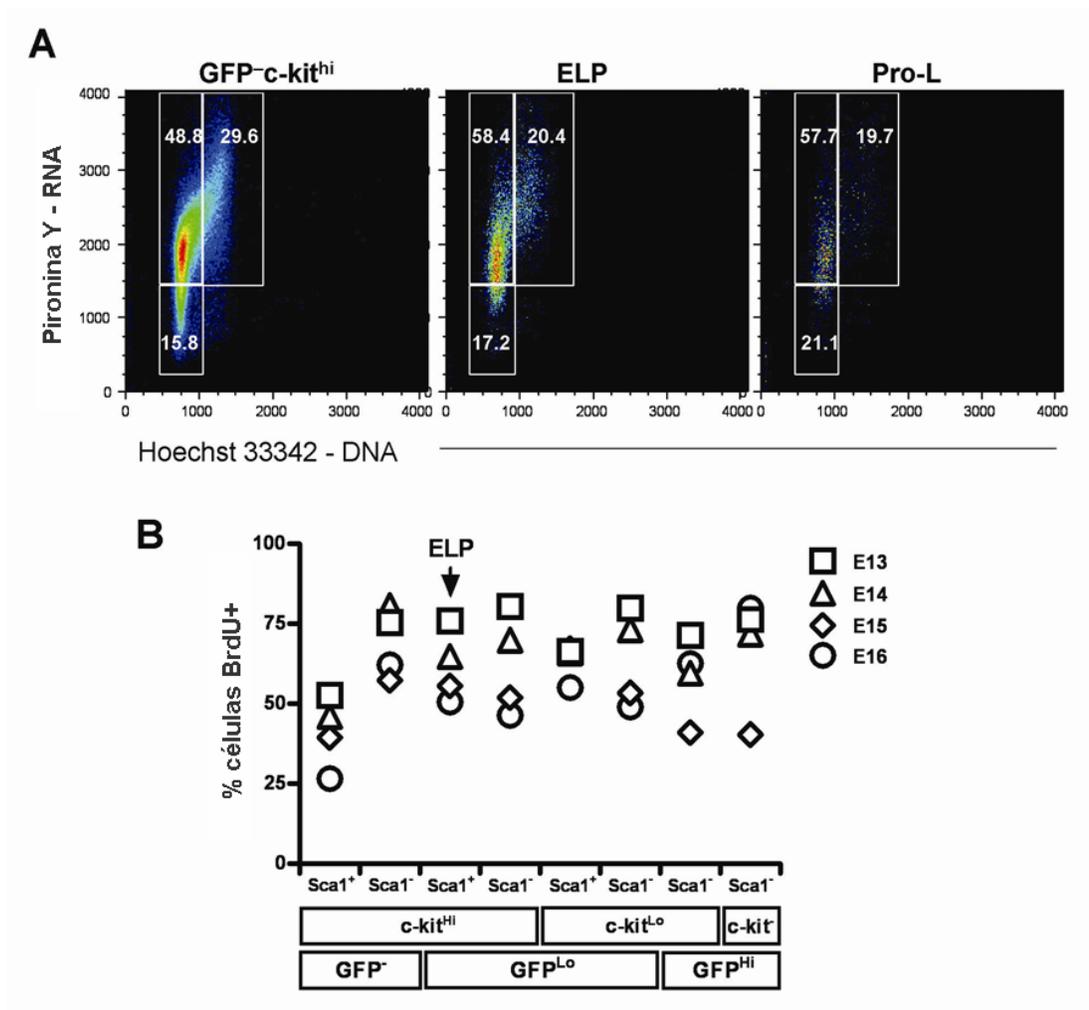
**IX.2.4. El potencial de diferenciación de los progenitores linfoides de B en reconstitución después de la quimioterapia se incrementa al nivel de sus contrapartes fetales.** Se utilizaron sistemas de co-cultivos con células estromales para estudiar si los cambios dados por quimioterapia mieloablativa modifican el potencial de diferenciación de los progenitores linfoides y si las células en rebote son funcionalmente comparables a sus contrapartes vírgenes para 5-FU o fetales (Figura 14). Las poblaciones provenientes de los tres grupos produjeron eficientemente linfocitos del linaje B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> en cultivos de 3 semanas sobre monocapas de células estromales OP-9 (Figura 14A). Cuando los

mismos progenitores recibieron la señal de Notch provista por las células estromales transfectadas con el ligando Delta, OP9-DL1, se produjeron células de linaje T (Figura 14B), observándose una tendencia a la diferenciación de linfocitos  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  por parte de los progenitores de médula ósea en reconstitución. El rendimiento de linfocitos en cultivo fue extremadamente dependiente de la fuente de los progenitores (Figura 14C). A partir de progenitores fetales o adultos en reconstitución de quimioterapia, se registraron de 300 a 1000 veces más el número de células B que el producido por los progenitores de médula ósea adulta. La situación fue diferente respecto a la diferenciación de T en los cultivos OP9-DL1, donde solo los progenitores fetales rindieron números altos de células T, sugiriendo que la quimioterapia con 5-FU no daña la capacidad de los progenitores linfoides adultos para generar células de linaje T, pero la linfopoyesis de B es remarcablemente incrementada, al grado de ser tan robusta como la linfopoyesis fetal típica.

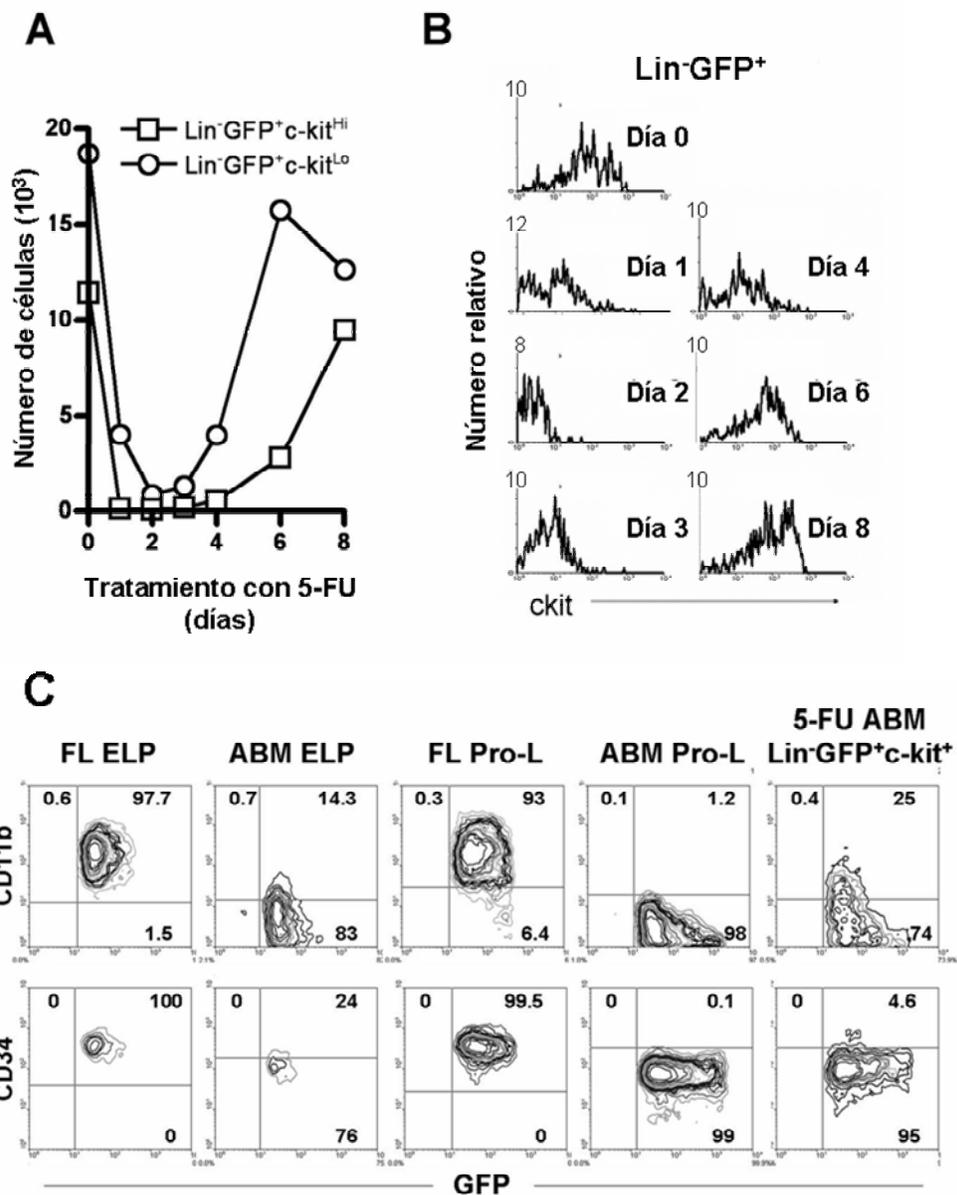
En conjunto, estos datos permiten proponer un modelo de cinética poblacional en el cual la producción de células linfoides es sostenida en la vida fetal por progenitores primitivos con alto índice proliferativo, mientras que durante la vida adulta por progenitores que se dividen intermitentemente (Figura 15). El 80% de los progenitores linfoides de hígado fetal se encuentran en ciclo celular posiblemente por la carencia de represión transcripcional de genes reguladores. Sólo una fracción minoritaria pero constante de progenitores linfoides de médula ósea adulta están en ciclo celular y la fracción mayoritaria reside en  $G_0$ , presumiblemente moviéndose dentro y fuera del ciclo y regulada por inhibidores de Cdks. El estrés hematopoyético en la médula ósea del adulto generado por la quimioterapia con 5-FU promueve la readquisición de algunos aspectos del programa de diferenciación fetal, incluyendo la regulación de factores intrínsecos, la entrada a ciclo celular y el mayor potencial de diferenciación linfoide.



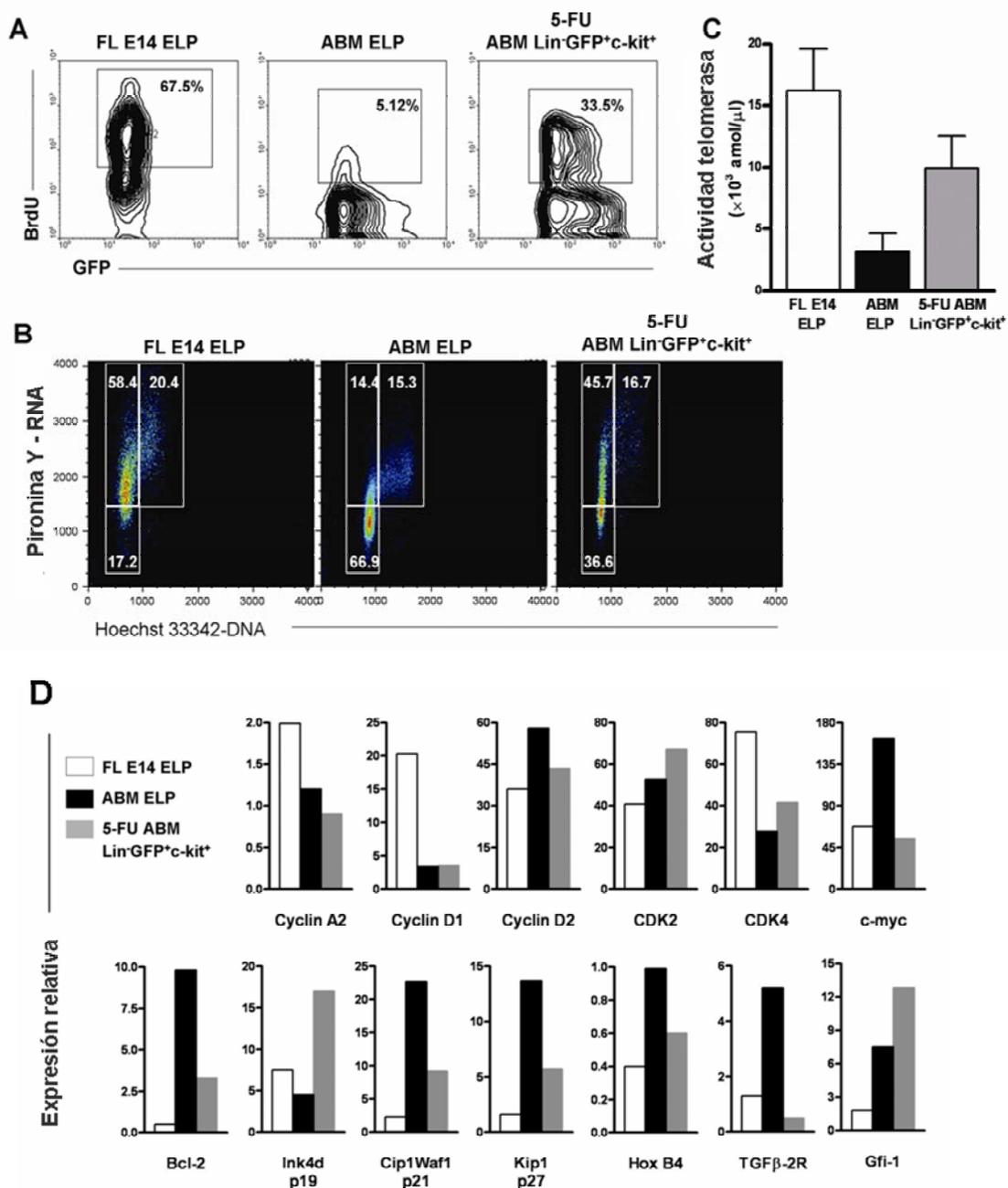
**Figura 10.** La mayoría de los progenitores linfoides de médula ósea adulta se encuentran en estado de quiescencia y son heterogéneos con respecto a su actividad proliferativa. (A) Los ELP, Pro-L y Lin<sup>-</sup>GFP<sup>c-kit</sup><sup>hi</sup> se purificaron de grupos de 35-55 ratones adultos tratados con BrdU y fueron sujetos a la tinción intracelular de BrdU. (B) Resolución de las fracciones G<sub>1</sub> o S+G<sub>2</sub>+M del ciclo celular por tinción de DNA/RNA con Hoeschst 33342 y Pironina Y. El diagrama lateral ilustra el fraccionamiento. (C) Resolución de progenitores linfoides de acuerdo a la densidad de GFP y análisis de incorporación de BrdU a los 5 días de tratamiento.



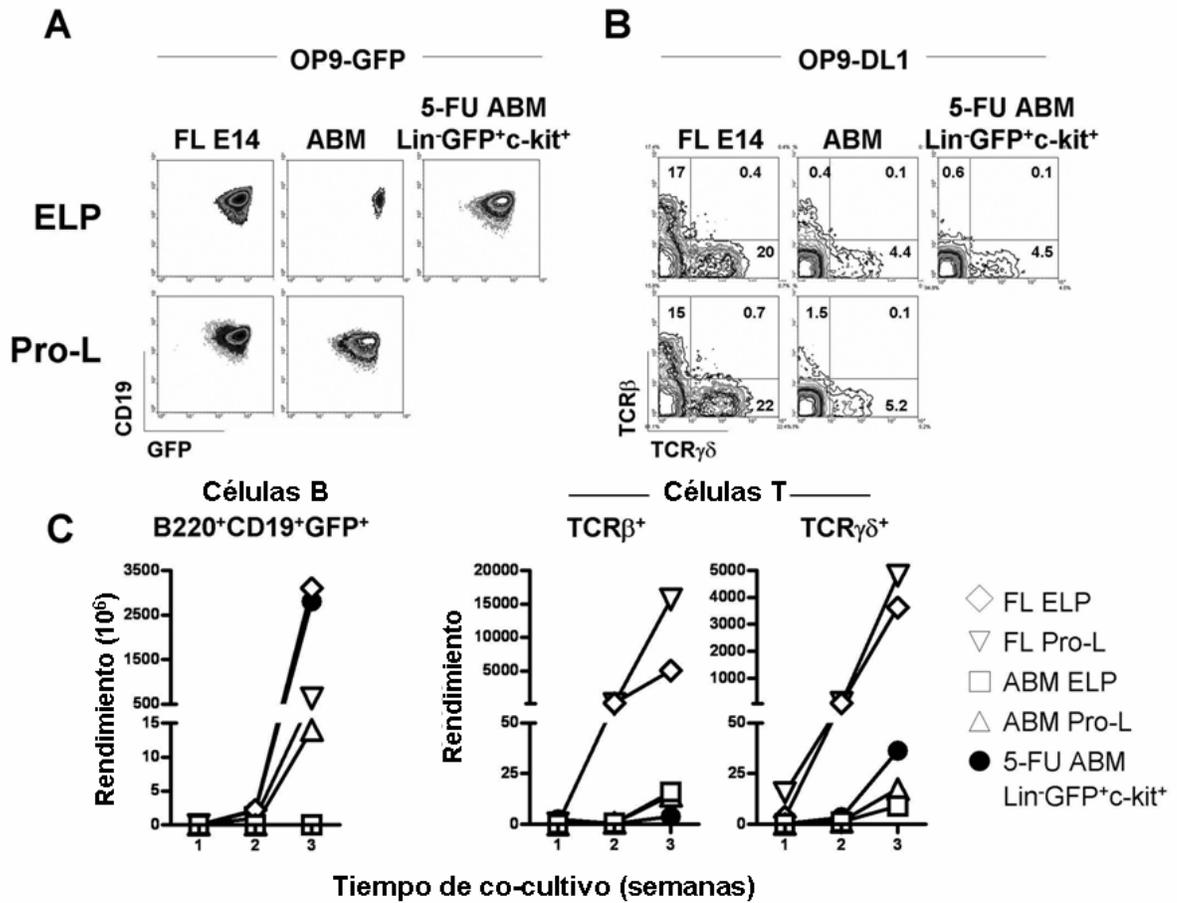
**Figura 11. Los precursores linfoides en hígado fetal están en rápida división celular.** (A) Resolución de las fracciones G<sub>1</sub> o S+G<sub>2</sub>+M del ciclo celular por tinción de DNA/RNA con Hoeschst 33342 y Pironina Y en progenitores de hígado fetal E14. (B) Se administró BrdU intravenoso y en agua de beber por 6 horas a grupos de ratonas preñadas y en diferentes edades gestacionales. Las subpoblaciones analizadas están dispuestas de acuerdo a su probable grado de madurez, comenzando con la fracción más enriquecida en células troncales (izquierda) y culminando con células comprometidas que expresan CD19 (derecha). Se muestra un experimento representativo de tres.



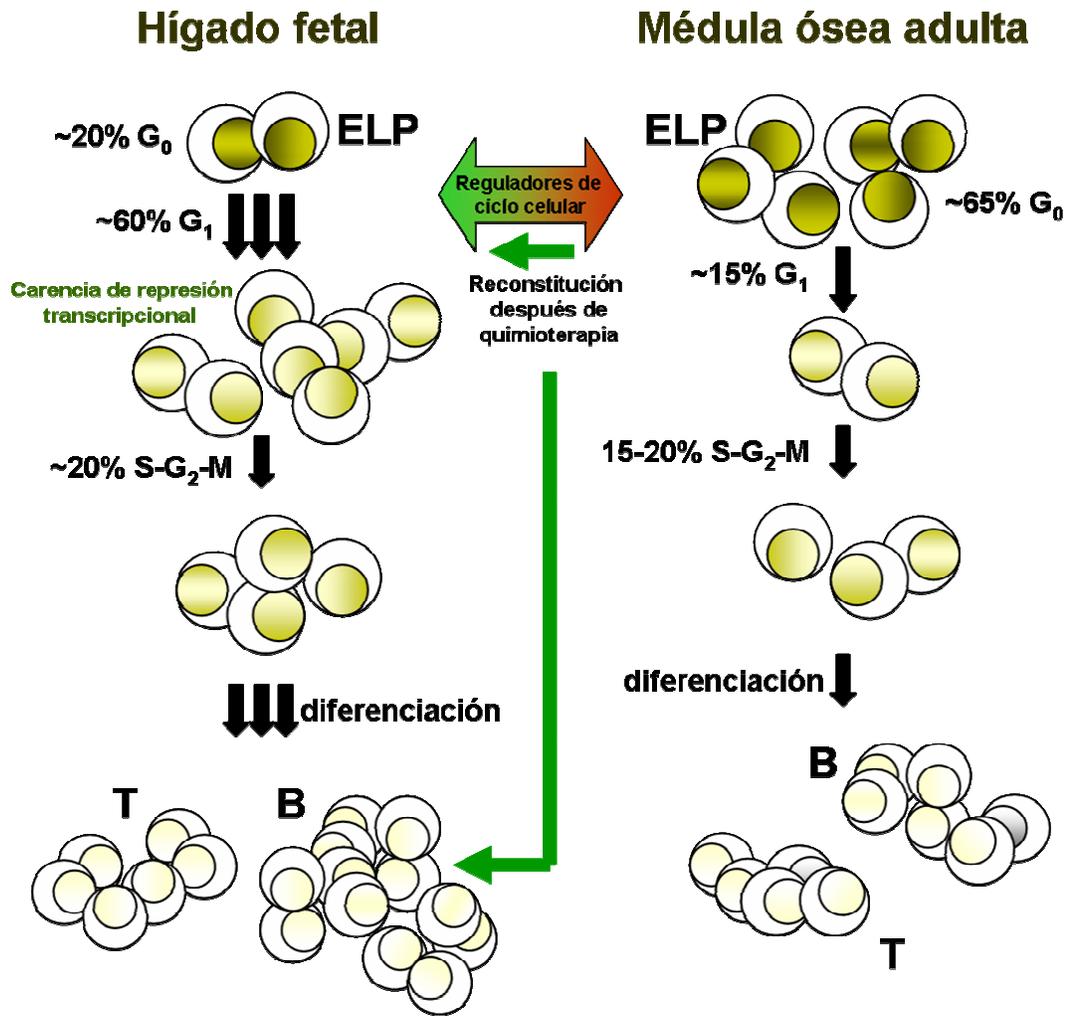
**Figura 12. La quimioterapia con 5-fluoro-uracilo induce la disminución transitoria de progenitores linfoides y la pérdida de expresión de c-kit.** Grupos de ratones fueron tratados con una dosis única de 5-FU, y sus progenitores linfoides purificados a los tiempos indicados. Se muestran los números absolutos de cada población celular (A), así como los cambios temporales en la expresión de c-kit membranal de las células Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> de un experimento representativo (B). Los progenitores en recuperación (día 4 post-quimioterapia) no re-expresan marcadores típicos de sus contrapartes fetales (C). La posición de los cuadrantes está acorde a las tinciones con un anticuerpo no relacionado control de isotipo para cada tipo celular.



**Figura 13.** Los progenitores linfoides en reconstitución después de la quimioterapia están en ciclo celular activo, y algunos cambios en la expresión de genes reguladores de ciclo celular corresponden a los patrones de sus contrapartes fetales. 90 horas después de la administración de quimioterapia, los ratones fueron tratados con BrdU, y 6 horas después los progenitores linfoides se examinaron en relación a índices de proliferación (A), fracción celular en ciclo (B) y actividad de telomerasa (C). La expresión de genes reguladores de ciclo celular fue determinada por RT-PCR en tiempo real (D). En todos los experimentos se analizaron paralelamente para comparación los ELP fetales E14 y ELP adultos.



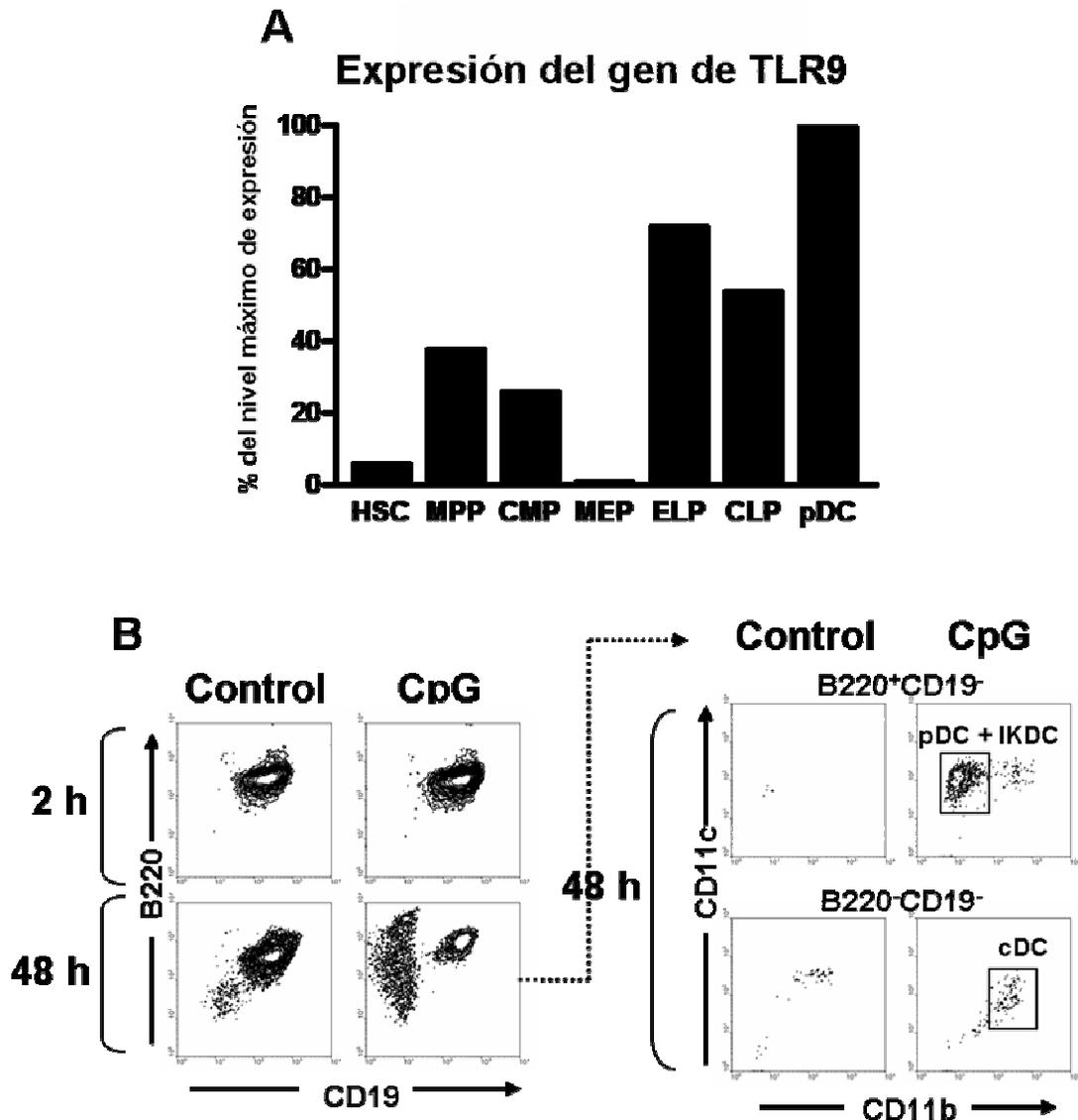
**Figura 14.** Los progenitores linfoides en reconstitución por quimioterapia semejan sus contrapartes fetales con respecto al potencial de diferenciación de células B. Se hicieron cultivos de 3 semanas sobre células estromales OP9-GFP y OP9-DL1 para la evaluación funcional de los progenitores fetales, adultos, y adultos tratados con 5-FU. El perfil de las células B GFP<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> crecidas sobre OP9-GFP se muestra en (A), mientras que el de las células T TCRαβ<sup>+</sup> y TCRγδ<sup>+</sup> crecidas sobre OP9-DL1 en (B). El rendimiento por célula progenitora para cada linaje está representado como gráficas a través del tiempo (C). La figura muestra un experimento representativo de tres.



**Figura 15. Modelo de la dinámica poblacional de progenitores linfoides tempranos en vida fetal y etapa adulta.** El 80% de los progenitores linfoides de hígado fetal se encuentran en ciclo celular y tienen un alto potencial de diferenciación, mientras que una fracción constante y mayoritaria de sus contrapartes adultas se encuentra en quiescencia y entra a ciclo intermitentemente. Bajo los estímulos generados por la quimioterapia mieloablativa con 5-FU, los progenitores adultos en reconstitución adquieren ciertas propiedades del programa fetal, la represión transcripcional por los genes reguladores de ciclo es disminuida y su capacidad proliferativa incrementada, así como el potencial de diferenciación de células B. El tamaño de las poblaciones en esta representación no corresponde a la realidad.

### **IX.3. EFECTO DE LA INFECCION VIRAL EN LA BIOLOGIA DE LOS PROGENITORES LINFOIDES.**

**VIII.3.1. Los progenitores linfoides expresan TLR9 y su potencial de diferenciación es alterado por la exposición a CpG.** Las células del sistema inmune innato son importantes durante la fase temprana de una infección, cuando ellas utilizan receptores especializados tipo Toll (TLR) para el reconocimiento de productos virales y bacterianos, cuya señalización dirige la producción de citocinas pro-inflamatorias que alteran la expresión de moléculas de adhesión y reclutan células a los tejidos para dar inicio a la respuesta inmune adaptativa. Entre los ligandos de TLR se encuentran los ácidos nucleicos, que exhiben una fuerte actividad inmuno-estimuladora dependiente de motivos CpG no metilados reconocidos por TLR9. El momento ontogénico en que dichos receptores comienzan a ser funcionalmente expresados y su efecto sobre los eventos tempranos de la linfo-hematopoyesis constituyeron el enfoque de la segunda parte de este estudio. El análisis inicial por RT-PCR exploró la distribución de TLR9 en poblaciones purificadas de células troncales y progenitores hematopoyéticos de ratones knock-in RAG1/GFP (Figura 16A). Como previamente determinado para TLR2 y TLR4 (88), la expresión estuvo casi ausente en progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP). Sin embargo, los transcritos fueron detectables en células troncales, y peculiarmente altos en los progenitores dedicados a la linfopoyesis, incluyendo ELP y CLP. De entre ellos, los CLP exhiben más compromiso de linaje y actividad residual, por lo que fueron elegidos para subsecuentes experimentos. Al ser purificados y expuestos durante 2 horas al ligando de TLR9 CpG previo al cultivo linfoide, los CLP dieron lugar solo a linfocitos B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, con la misma eficiencia que los CLP control no estimulados (Figura 16B). En contraste, la linfopoyesis de B fue suprimida y poblaciones definidas de células CD19<sup>-</sup> emergieron después de la exposición por 48 horas. El análisis de las poblaciones no-B reveló que ellas incluían pDC y/o IKDC B220<sup>+</sup>CD11c<sup>lo</sup>CD11b<sup>-</sup>, así como DC convencionales B220<sup>-</sup>CD11c<sup>lo</sup>CD11b<sup>+</sup> (Figura 16B, panel derecho).

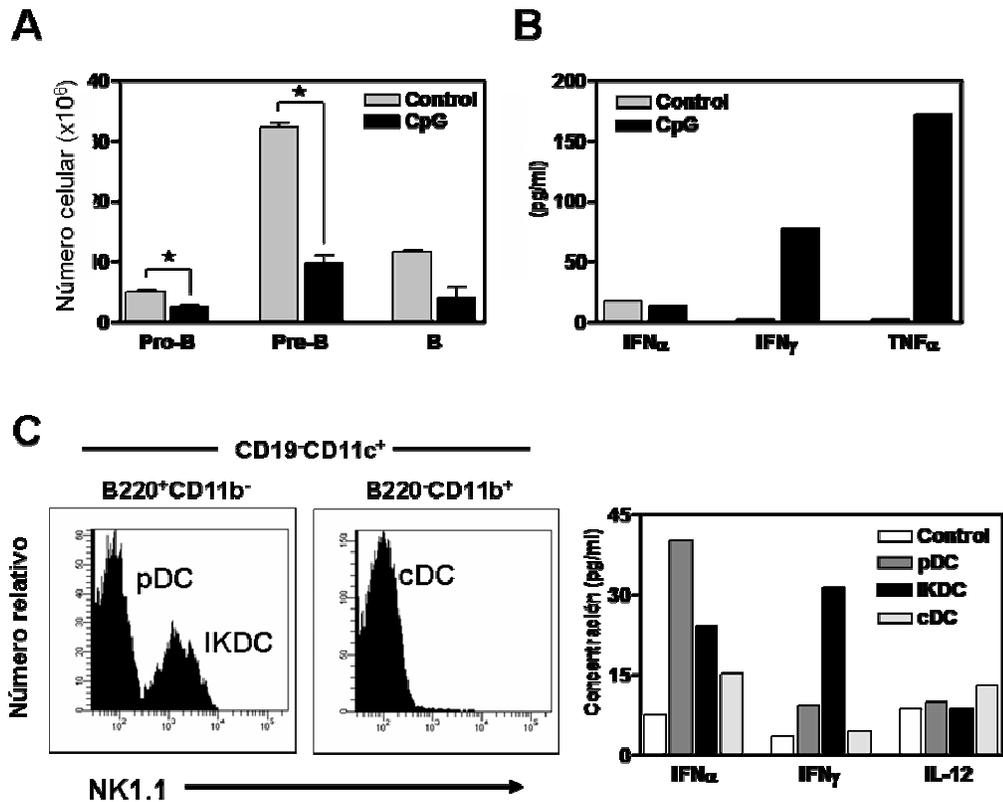


**Figura 16. Los progenitores linfoides expresan altos niveles de TLR9 y responden a CpG en cultivo.** Se analizó la expresión de transcritos de TLR9 por RT-PCR en diversas fracciones hematopoyéticas de médula ósea. Los resultados fueron normalizados al valor en pDC, que es la población celular de mayor expresión de TLR9 (A). Se purificaron CLP de ratones normales y se trataron con el ligando de TLR9 CpG, en cultivos libres de suero y estroma. Después de 2 o 48 horas, las células fueron lavadas e incubadas por 8 días adicionales en cultivos linfoides y analizadas por citometría de flujo (B). La expresión de marcadores de células dendríticas fue evaluada en las células de fenotipo B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> y B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> que emergieron en los cultivos de progenitores expuestos por 48 h a CpG, identificándose pDC y/o IKDC B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> y cDC B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (panel derecho). Se muestra un experimento representativo de tres.

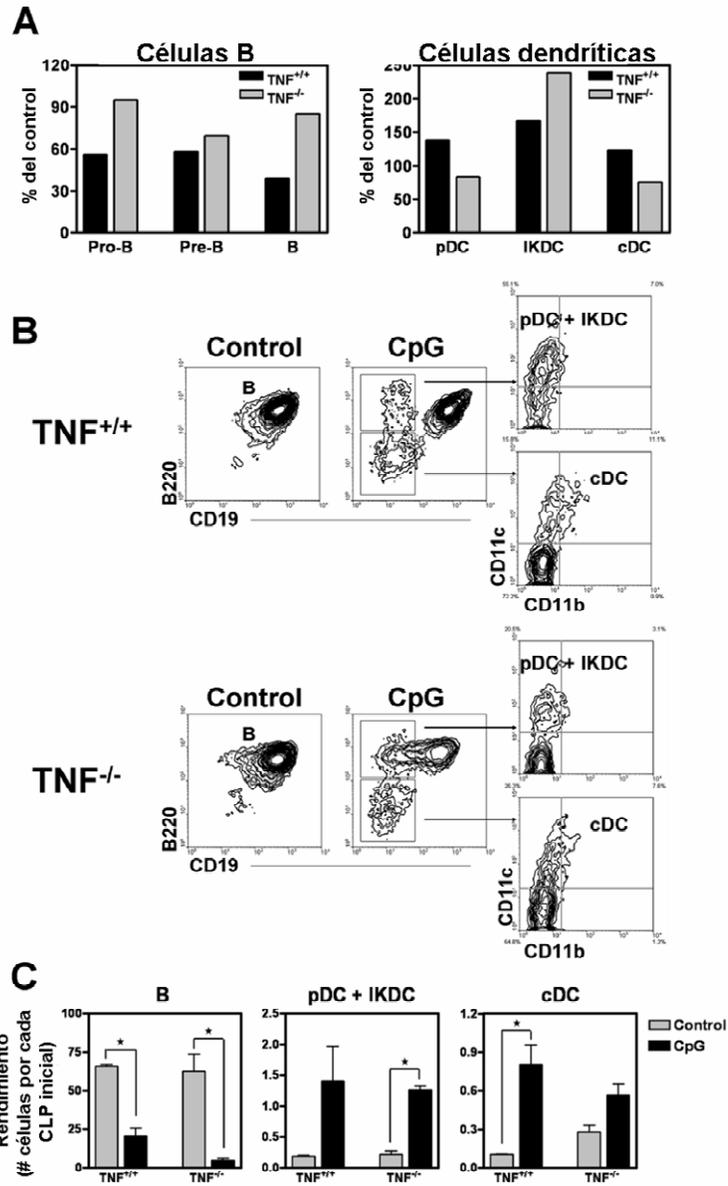
**IX.3.2. La exposición de los progenitores linfoides a CpG en médula ósea lesiona la linfopoyesis temprana de células B y promueve la producción de células dendríticas.** Con el fin de conocer si un ligando de TLR9 puede influenciar los eventos de linfopoyesis en animales intactos, se evaluaron las poblaciones precursoras de B en médula ósea 48 horas después de la inyección intraperitoneal de 100  $\mu$ g de CpG. Este tratamiento *in vivo* redujo sustancialmente la producción de células pro-B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>, pre-B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> y B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> (Figura 17A). Estudios previos han mostrado alteraciones similares en las poblaciones de la médula ósea por inyección de LPS, adyuvantes, malaria o virus de influenza (85,86,106), y el TNF $\alpha$  ha sido implicado en algunos de esos cambios. Nuestra observación fue que los niveles de esta citocina en suero 48 h después de la administración de CpG están elevados, aún más que los de IFN $\gamma$ , y que no es detectable un aumento en el IFN $\alpha$  (Figura 17B). Como siguiente paso se recuperaron los CLP de los ratones tratados con CpG y fueron puestos en cultivos libres de suero y estroma. Similar a la estimulación *in vitro*, se originaron otras poblaciones no correspondientes a células B. La categoría B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> contenía pDC NK1.1<sup>-</sup> e IKDC NK1.1<sup>+</sup>, mientras que la categoría B220<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> incluía una población principal de células dendríticas de fenotipo convencional (cDC) (Figura 17C). Dado que en condiciones normales los progenitores de pDC e IKDC son ELP y LSP, y los CLP no contribuyen importantemente en su producción (Figura 4) (23), fue preciso identificar la naturaleza funcional de las nuevas poblaciones y descartar la posibilidad de cambios fenotípicos transitorios. Consistente con las propiedades reportadas para estas poblaciones (4,23,46) las pDC fueron los principales productores de IFN $\alpha$  en respuesta a la estimulación con CpG, mientras que las IKDC secretaron la mayor cantidad de IFN $\gamma$ , y las cDC respondieron con una modesta producción de IL-12 e IFN $\alpha$  (Figura 17C). Cuando experimentos similares fueron conducidos con ratones deficientes de TNF $\alpha$ , los números de linfocitos B en su médula ósea fueron solo parcialmente disminuidos por el tratamiento con CpG y las pDC/cDC no fueron

significativamente alteradas (Figura 18A), aunque la población de IKDC se mostró incrementada. Los cultivos de las CLP después de su exposición in vivo a CpG indicaron que la generación de células CD19 fue reducida, independientemente de si los progenitores provenían de ratones normales o TNF<sup>-/-</sup> (Figura 18B). Además, la producción de pDC/IKDC y cDC fue dramáticamente estimulada, como puede apreciarse en las tabulaciones de rendimiento celular por progenitor inicial. Estos resultados son consistentes con un efecto directo del ligando CpG sobre las células linfopoyéticas, posiblemente independiente de TNF.

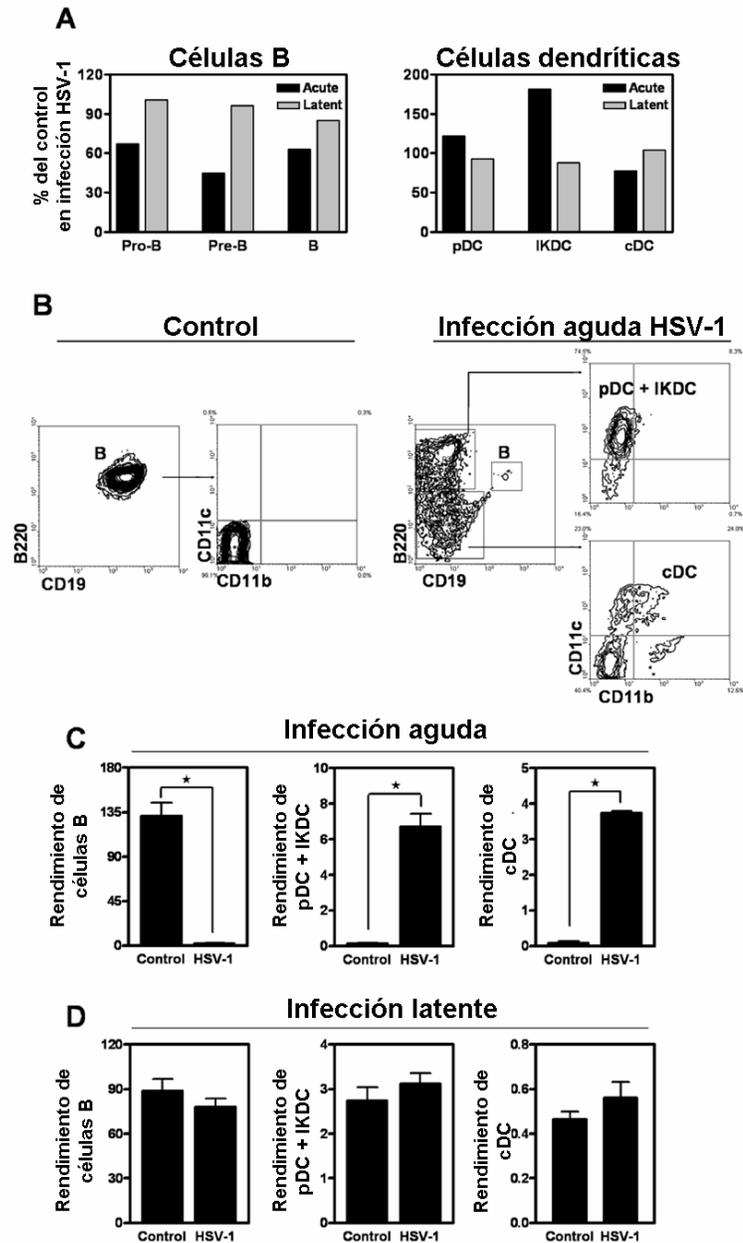
**IX.3.3. La infección aguda de ratones con el virus de herpes simple 1 (HSV-1) induce a los progenitores del linaje B a producir células dendríticas.** Para conocer si las alteraciones inducidas experimentalmente en la producción linfoide pueden ser observadas durante una infección viral, utilizamos un modelo de infección por HSV-1. Una sola dosis viral de 1000 pfu liberada por escarificación de la córnea causó una infección aguda durante la primera semana, mientras que una dosis de 350 pfu y 30 días sin inflamación aparente fueron considerados rasgos de infección subclínica o latente. Las células pro-B, pre-B y B estuvieron reducidas en la médula de los ratones con infección aguda, mientras que las poblaciones de pDC e IKDC incrementadas (Figura 19A). No se observaron alteraciones poblacionales notables en los ratones con infección latente. Los cultivos linfoides revelaron que el potencial de B se redujo más del 95%, y la formación de células dendríticas se vió fuertemente favorecida en la infección aguda (Figura 19B). Esto fue también evidente en términos de rendimiento (Figura 19C), y ninguna anomalía se registró en CLP purificados de animales con infección latente (Figura 19D). El mismo modelo de infección fue usado con ratones deficientes en TLR9. En ellos, las células linfoides y dendríticas fueron refractarias al efecto de la infección aguda; más aún, la re-dirección de los progenitores linfoides hacia el linaje dendrítico fue mínima cuando el receptor TLR9 estuvo ausente (datos no mostrados), indicando que el daño a la linfopoyesis de B y la polarización hacia destinos dendríticos durante la infección viral aguda son mediados por TLR9.



**Figura 17. La exposición a CpG depleta preferencialmente precursores de células B en médula ósea y promueve la producción de células dendríticas a partir de CLP.** Ratones sanos fueron inyectados con CpG y 48 h después se examinaron por citometría de flujo las frecuencias de células precursoras pro-B y pre-B, así como de linfocitos B inmaduros en la médula ósea;  $p < 0.05$  (A). Los niveles de citocinas proinflamatorias en el suero de ratones tratados con CpG se determinaron por ELISA, y se muestra un experimento representativo (B). 48 horas después del tratamiento con CpG, los CLP de los animales tratados se purificaron y cultivaron 8 días en condiciones diseñadas para promover la linfopoyesis de células B. Las células  $B220^+CD19^+CD11c^+CD11b^-$  fueron fraccionadas en pDC e IKDC por el marcador NK1.1, en tanto que las cDC fueron NK1.1<sup>-</sup>. Las tres categorías celulares se purificaron del cultivo por citometría y se probó su competencia para responder a 18 horas de estimulación con CpG, a través de la producción de citocinas (C). Se muestra un experimento representativo.



**Figura 18.** La reducción de las células de linaje B en médula ósea después de la exposición *in vivo* a CpG es parcialmente mediada por TNF $\alpha$ , pero la polarización de los progenitores linfoides hacia el linaje dendrítico no requiere esta citocina. Grupos de 5 ratones TNF $\alpha$ <sup>+/+</sup> y TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> se inyectaron con CpG y las células de linaje B y dendríticas fueron cuantificadas 48 h después. Los valores de porcentaje del control representan la celularidad de la población en médula ósea después del tratamiento con CpG relativa a la celularidad en los controles (control = 100%). Se muestra un experimento representativo de tres (A). Los CLP se purificaron y cultivaron en condiciones óptimas para el desarrollo de células B. A su término, la producción de B, pDC/IKDC y DC fue evaluada por citometría (B) y el rendimiento (número de células generadas por cada progenitor) fue calculado y se muestra en el panel (C). \* p < 0.05.



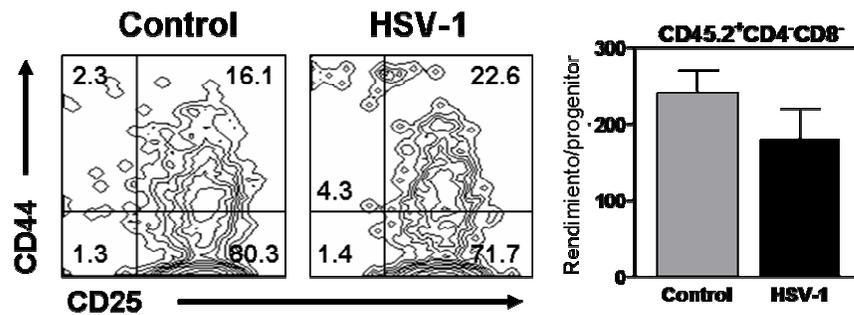
**Figura 19. Producción de células dendríticas por progenitores linfoides en la infección por HSV-1.** Las células de linaje B y dendríticas se cuantificaron a los 7 días de infección aguda o a los 30 días de infección latente por HSV-1. Los valores de porcentaje del control representan la celularidad de la población en médula ósea en cada condición, relativa a la celularidad en controles no infectados (control = 100%). La figura muestra un experimento representativo de cinco (A). Los CLP se purificaron y cultivaron en condiciones óptimas para el desarrollo de células B, y la producción de B, pDC/IKDC y DC fue evaluada por citometría (B). Los valores de rendimiento (número de células generadas por cada progenitor) después de la infección aguda y latente fueron calculados y se muestran en (C) y (D). \*  $p < 0.05$ .

La respuesta de células T es esencial durante las infecciones virales. Para conocer si su diferenciación es abatida en dicha condición, los timocitos aislados por disgregación tímica de los animales infectados, fueron cuantificados por citometría de flujo, observándose una pérdida sustancial tanto de células DN, como DP y unipositivas CD4/CD8 (Figura 20A). Sin embargo, la fracción de médula ósea que alberga los progenitores linfoides encargados presumiblemente de la colonización tímica y el inicio de la timopoyesis, mostraron en cultivo un potencial normal de diferenciación temprana hacia células DN (Figura 20B), sugiriendo que la diferenciación y función de los progenitores de T en médula ósea no son dañados directamente por los componentes virales, y que probablemente es el daño tisular mediado por factores inflamatorios el que detiene el desarrollo y la reconstitución de células T durante la infección.

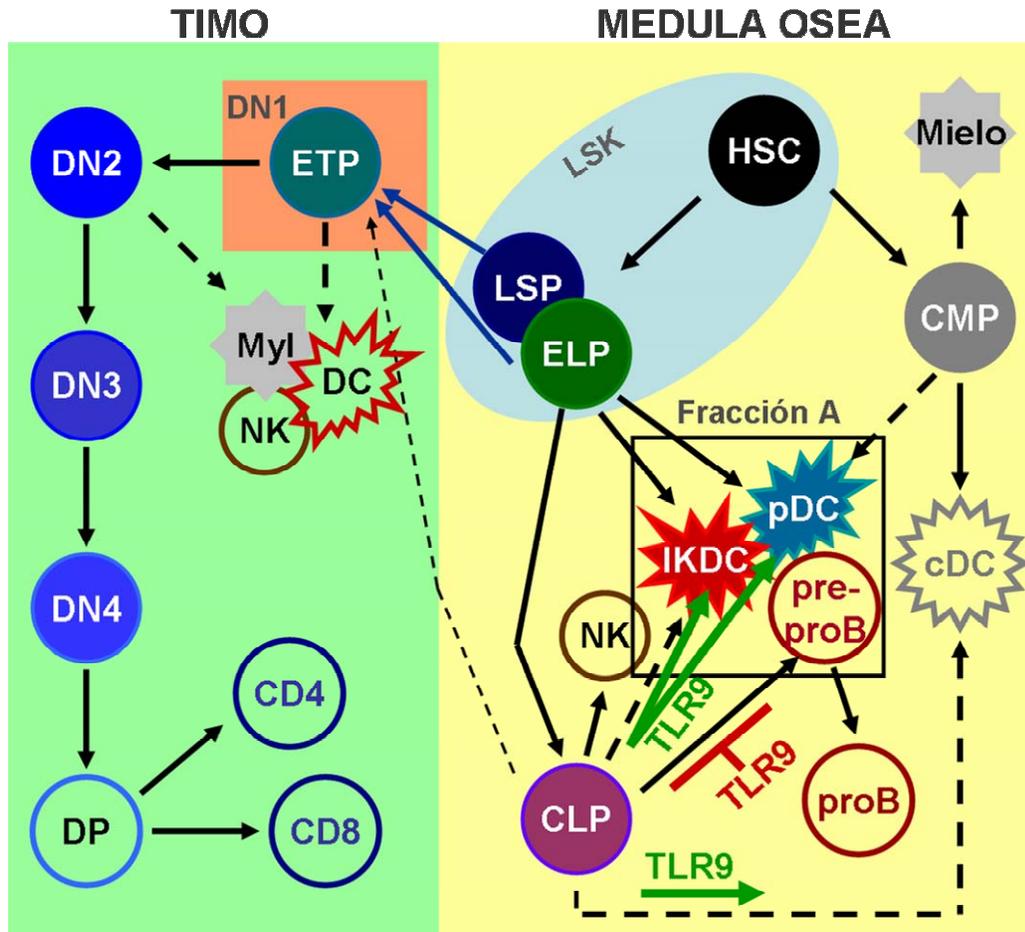
En conjunto, la información generada de las observaciones en el sistema de estimulación agonista de TLR9 con CpG y de infección aguda por HSV-1 permiten proponer que en el escenario de la linfopoyesis temprana en médula ósea, las decisiones de linaje pueden ser directamente influenciadas por productos de patógenos virales o bacterianos (Figura 21).

**A**

(x10 <sup>8</sup> )	Sin infección	HSV-1	% disminución
Total	132 ± 13.9	3.9 ± 2.9	97 %
DN	3.5 ± 0.43	0.15 ± 0.1	95 %
DP	115 ± 13.7	3.4 ± 2.5	97 %
CD4	8.8 ± 0.98	0.26 ± 0.15	97 %
CD8	4.2 ± 0.19	0.16 ± 0.08	96 %

**B**

**Figura 20.** La infección por HSV-1 lesiona la timopoyesis, pero el potencial de diferenciación de los progenitores de células T en médula ósea permanece indemne. Las diversas poblaciones de timocitos que participan en la vía de diferenciación de T se cuantificaron 7 días después de la infección aguda por HSV-1. Se muestran los números celulares absolutos y el promedio del % de reducción (A). La fracción de médula ósea que contiene los progenitores de T LSP y ELP se purificó y cultivó en condiciones óptimas para producción de células T, y la producción de células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) fue evaluada por citometría (B). En el panel derecho se muestran los números de células DN generadas por cada progenitor inicial (rendimiento/progenitor) después de la infección aguda.



**Figura 21. La unión de TLR9 sobre los progenitores comunes linfoides promueve la producción de células dendríticas a expensas de la linfopoyesis.** El modelo muestra las principales rutas de diferenciación linfocítica y los procesos que presumiblemente son bloqueados o promovidos por la unión de TLR9. Las flechas en verde indican estimulación por agonistas de TLR9, mientras que las líneas en rojo indican bloqueo. Las líneas punteadas en negro indican bajo potencial de diferenciación. HSC, célula troncal hematopoyética; LSP, progenitor L-selectina<sup>+</sup>; ELP, progenitor linfocítico temprano; CLP, progenitor común linfocítico; CMP, progenitor común mieloide; ETP, progenitor tímico temprano.

#### **IX.4. RECONSTITUCION DE CELULAS DE LINAJE LINFOIDE EN PACIENTES RECEPTORES DE TRANSPLANTE HEMATOPOYETICO DESPUES DE UN REGIMEN DE QUIMIOTERAPIA MIELOABLATIVA.**

La reconstitución del sistema inmune es el componente esencial de un trasplante exitoso en pacientes con malignidades hematológicas. Las primeras células en reconstituirse son aquellas de la respuesta inmune innata, mientras que la restauración de linfocitos B y T ocurre gradualmente (107,108), y es críticamente dependiente de la apropiada proliferación y potencial de diferenciación de sus progenitores y de la integridad de los tejidos en donde se desarrollen. Dado que nuestros hallazgos en el modelo murino de linfopoyesis indican que el microambiente ejerce una influencia decisiva en la diferenciación temprana en la médula ósea y este hecho posiblemente se refleje en los valores y funciones de las células diferenciadas, quisimos extrapolar el estudio al humano y conocer inicialmente si al igual que en ratón, la linfopoyesis de células B se ve favorecida por la quimioterapia mieloablativa. 43 pacientes que recibieron trasplante de células troncales/progenitores hematopoyéticos tras quimioterapia mieloablativa (ver Tabla 2) fueron sometidos a una evaluación de la frecuencia de las poblaciones linfoides en circulación a diferentes tiempos post-trasplante. El 75% del total de los pacientes mostraron reconstitución temprana y completa de células B (Figura 22), con una notable tendencia a la sobreproducción. Nuestros pacientes se dividieron en 3 grupos: los de trasplante autólogo, los de trasplante alogénico, y los de trasplante alogénico que adicionalmente desarrollaron una infección por citomegalovirus (en todos los casos dentro de los primeros 5 meses post-trasplante). Los tres grupos fueron sometidos a quimioterapia previa al trasplante, y los de trasplante alogénico además recibieron tratamiento inmunosupresor con ciclosporina y metotrexate (Tabla 2). El 89.4% de los autólogos reconstituyeron el compartimiento de células B, de los cuales 68% mostraron valores que exceden la normalidad (Figura 22), sugiriendo un proceso similar al observado en el 'rebote' de progenitores tempranos de B en ratón (Figuras 14 y 22). El 21.4% de los pacientes caen en el rango normal de frecuencia de células B, y sólo 3 de 28 individuos se encuentran por debajo de los niveles normales. En

contraste, el 53% de los alogénicos no logró recuperar la población de linfocitos B, y de ellos el 37.5% mostró evidencias de infección aguda por citomegalovirus. La reconstitución de linfocitos T se observó severamente dañada: sólo el 4.6% de los pacientes alcanzó números normales de células T CD4<sup>+</sup> aún a los 64 meses post-transplante e independientemente del tipo de transplante, mientras que el 41.8% de ellos reconstituyó células T CD8<sup>+</sup> y su reconstitución correlacionó con el tiempo y la densidad de moléculas clase I de histocompatibilidad (datos no mostrados). Para comparación, la frecuencia de las células mieloides CD14<sup>+</sup> (monocitos) fueron evaluadas simultáneamente. En el 78.6% de los pacientes con transplante autólogo se reconstituyó la población de monocitos dentro de los valores normales. Dentro del resto de los individuos, el 10.7% presentaron valores inferiores a la normalidad, y el otro 10.7% valores superiores, indicativo de una reconstitución equilibrada sin sobreproducción celular. Además, el 70% de los individuos alogénicos y el 80% de los alogénicos e infectados con HCMV reconstituyeron el compartimiento (Figura 22). En resumen, la reconstitución de las células linfoides después de retos microambientales como quimioterapia y/o infección se comportó acorde a los fenómenos descritos en los modelos animales de linfopoyesis. Serán decisivos estudios adicionales que revelen el potencial de los progenitores linfoides bajo esas condiciones.

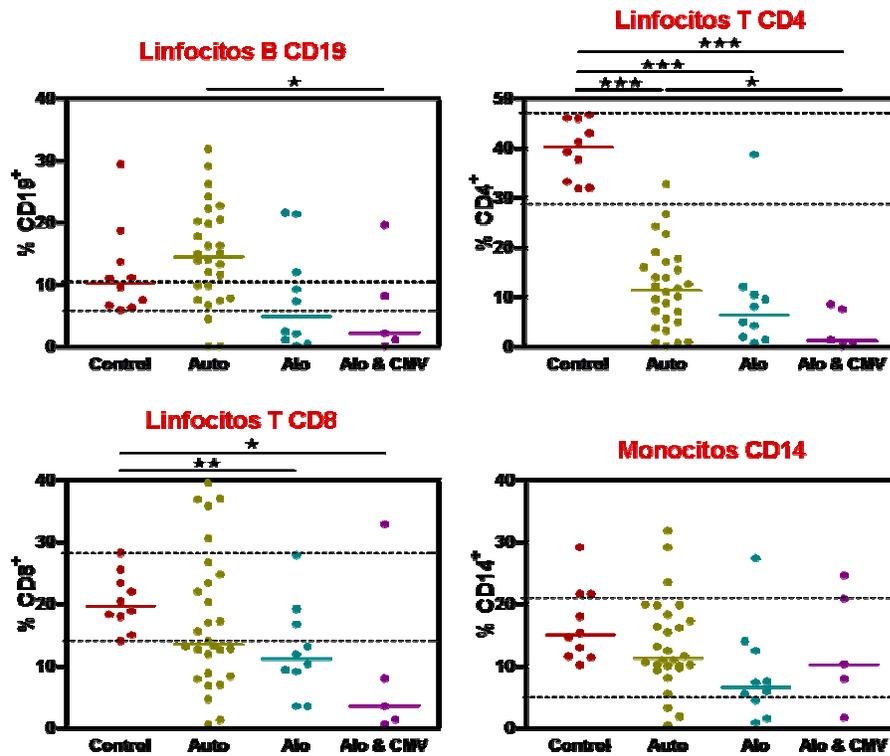


Figura 22. La reconstitución de células B después del trasplante hematopoyético es dañada por condiciones de inflamación e infección, pero no por quimioterapia mieloablativa. La frecuencia de linfocitos B, monocitos y células T en circulación fueron determinadas por citometría de flujo en pacientes transplantados con células troncales y progenitores hematopoyéticos después de quimioterapia mieloablativa condicionante. El área entre líneas punteadas representa los valores normales para cada población celular. Control, individuos sanos; Auto, pacientes receptores de trasplantes autólogos; Alo, pacientes receptores de trasplantes alogénicos; Alo & CMV, pacientes receptores de trasplantes alogénicos con infección aguda por citomegalovirus humano. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.002$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ .

## X. DISCUSION

Los factores ambientales en un nicho especializado de la médula ósea pudieran ser determinantes para el reabastecimiento del sistema inmune a lo largo de la vida, participando tanto en la regulación de la capacidad proliferativa y de sobrevivencia, como en el potencial de diferenciación y decisiones tempranas de linaje de las células troncales y progenitores linfo-hematopoyéticos.

En la primera parte de este trabajo, se han utilizado los ratones knock-in RAG1/GFP y la incorporación de BrdU por células en síntesis de DNA, para explorar la posibilidad de que existan diferencias entre los progenitores linfoides a diferentes edades del desarrollo, y de que sus propiedades biológicas sean sensibles al efecto del estrés hematopoyético que causa un régimen de quimioterapia mieloablativa. Los cambios que ocurren en las células más primitivas de la estirpe linfoide durante la recuperación del tratamiento por 5-FU en el modelo experimental pudieran reflejar parte de los procesos de reconstitución tras un trasplante de células hematopoyéticas en humanos. Nuestros estudios indican que los progenitores linfoides tempranos se dividen solo una vez cada 12 días; y aunque son mitóticamente más activos que las células troncales, la mayoría de ellos pasan también un tiempo considerable en  $G_0$  (109,110). Los componentes del nicho que sostiene a las células progenitoras linfoides no se conocen con precisión (111), pero se especula que su condición quiescente sea importante en el control del tamaño de la población y la integridad celular. Ninguna de las dos poblaciones de progenitores linfoides –ELP y CLP- resultó homogénea y en todo momento existieron en dos estados cinéticos. Adicionalmente, ambas mostraron un rango en los niveles de GFP, y esto correlacionó con los grados de incorporación de BrdU, haciendo tentadora la propuesta de una relación inversa entre la activación del locus RAG1 y la proliferación. Al respecto, reportes previos definen una coordinación de la proteína RAG2 con el ciclo celular, en paralelo con fluctuaciones en la actividad de ciclina A/Cdk2 (112,113). RAG2 preferencialmente se acumula en  $G_0/G_1$ , declina antes de que las células entren a la fase S, y permanece bajo a través de las fases

S, G<sub>2</sub> y M. Aunque los niveles de RAG1 muestran menor fluctuación, se ha sugerido que su actividad de ligasa pudiera operar en proteínas reguladoras del ciclo celular (114). Nuestra experiencia con el ratón reportero RAG1/GFP indica que la RAG1 endógena es inicialmente expresada en estricta concordancia con los niveles de GFP, pero la descomposición de la proteína GFP puede ser más lenta que la de RAG1. Esta posibilidad, y el hecho de que el progreso de las células progenitoras a través de los estadios tempranos de la linfopoyesis no es sincrónico, deben ser tomados en consideración para subsecuentes evaluaciones de la contribución de las células en ciclo/quiescencia a la linfopoyesis en condiciones normales y en enfermedad.

A raíz del descubrimiento de la utilidad de las células troncales y los progenitores hematopoyéticos en el restablecimiento del sistema inmune en diversas condiciones patológicas, se han suscitado preguntas importantes acerca de sus propiedades a diferentes etapas del desarrollo. Los datos aquí mostrados indican que los progenitores linfoides fetales se dividen considerablemente más rápido que sus contrapartes adultos y que esta característica declina gradualmente con la edad gestacional. Estas poblaciones definidas tienen baja incidencia en el adulto y sus números permanecen constantes en ausencia de disturbios significativos. En el feto, los números de progenitores linfoides tampoco incrementan en paralelo al tamaño del embrión, pero sus descendientes próximos más maduros expanden abruptamente a partir del día 15 de gestación (115), sugiriendo que en el feto el balance en la producción de los progenitores debe ser resultado de su rápida diferenciación, muerte celular y/o exportación a otros tejidos. Aún no ha sido explorado si esto sucede en el adulto cuando el ciclo celular de los progenitores es reactivado después de un proceso de quimioterapia. Los patrones de expresión diferencial de algunos de los genes implicados en la regulación del ciclo celular y el mantenimiento de la integridad de los cromosomas, pudieran representar una explicación de las disparidades fetal/adulto observadas. Estas diferencias disminuyen cuando a organismos adultos se les administra 5-FU.

Algunos componentes del sistema inmune, especialmente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son lentos en su recuperación después de tratamientos mieloablativos (116,117). Sin embargo, en nuestro modelo experimental el potencial de diferenciación de los progenitores linfoides no sufrió alteración tras el tratamiento con 5-FU. Una posibilidad es que la migración periférica y/o la colonización tímica de los progenitores de células T sean dañados por el tratamiento, y el sistema de cocultivo con células estromales empleado no refleje con precisión esta capacidad de los progenitores. La elaboración de quimeras in vivo con trasplantes de progenitores provenientes de ratones tratados con 5-FU será útil en el estudio de este fenómeno. Otros cultivos evaluados para la producción de pDC y células NK tampoco revelaron una influencia obvia de la quimioterapia sobre el potencial de diferenciación de sus precursores (datos no mostrados). En sorprendente contraste, la formación de linfocitos de linaje B proveniente de progenitores en 'rebote' fue considerablemente mayor que la proveniente de médula ósea adulta normal, y equivalente a la observada con células fetales, prediciendo heterogeneidad en la sensibilidad a las señales microambientales por parte de los progenitores que dan origen a los distintos linajes linfoides. Datos similares de incremento en la población de linfocitos B se observaron en los pacientes con tratamiento quimioablativo y trasplante de células hematopoyéticas.

Las dosis, combinaciones y competencias cruzadas entre factores de transcripción y microambientales determinan el compromiso firme de los progenitores a un linaje particular; sin embargo, este proceso gradual es permisivo de cierto margen de plasticidad. Dado que el microambiente hematopoyético puede eventualmente no solo estar constituido de moléculas y células endógenas, nos preguntamos si en exposición a factores exógenos como son los componentes microbianos y las citocinas pro-inflamatorias que generalmente acompañan una infección, la biología de los progenitores linfoides era afectada. Un hallazgo en este estudio es que los progenitores linfoides en médula ósea son sustancialmente influenciados por ligandos de TLR9. Las células respondieron a CpG bajo condiciones definidas de cultivo y su potencial de diferenciación fue dramáticamente

cambiado. Al respecto, una serie de experimentos paralelos no detallados en este documento sugieren que mientras la competencia para la formación de las diversas poblaciones de células dendríticas aumenta en los CLP expuestos a CpG, la respuesta a IL-7 a través de la fosforilación de STAT5 disminuye. Ya que el desarrollo de células B es críticamente dependiente de IL-7, la anergia a la señal de dicha citosina pudiera determinar el bloqueo de ese linaje, y abrir la posibilidad del desarrollo de linajes alternos. Además, la preparación de sistemas quiméricos *in vitro* para dilucidar si el fenómeno de polarización corresponde a una señal directa a través de TLR apuntó que los progenitores respondedores al agonista de TLR no influyen el destino de progenitores deficientes en TLR9. El estudio entonces progresó a tratamientos *in vivo*, donde fue importante distinguir nuevamente efectos indirectos mediados por citocinas de aquéllos que involucraban la ligación directa del TLR9 en los progenitores. Las células hematopoyéticas son movilizadas al exterior de la médula ósea en animales que cursan por respuestas proinflamatorias, y estas respuestas implican reducción de quimiocinas y la liberación de células primitivas del nicho (85-87). Asimismo, los precursores de linfocitos B son suprimidos en la médula de ratones infectados con virus de influenza y la respuesta es abrogada en ausencia de receptores de TNF (106). En nuestro sistema, la eliminación del linaje B fue disminuida en los ratones TNF<sup>-/-</sup> relativo a la observada en ratones normales TNF<sup>+/+</sup>; sin embargo, sus progenitores fueron re-dirigidos al linaje dendrítico, probando que el TNF no es responsable de su polarización hacia DC. Así, los resultados basados en el modelo de CpG son compatibles con un fenómeno de re-dirección o polarización hacia destinos dendríticos, pero es también posible que los progenitores purificados sean poblaciones heterogéneas, tal que las células con algún potencial dendrítico sean seleccionadas positivamente y aquéllas restringidas irreversiblemente al linaje B se vean suprimidas ante la exposición al ligando CpG. Ensayos de clonación o dilución limitante ayudarían en la definición del fenómeno reprogramación vs selección. Ha habido algunos ejemplos en los cuales progenitores linfoides experimentalmente manipulados se convierten en células mieloides (118,119), pero se desconoce si esta posibilidad existiría como un

mecanismo normal de adaptación a los estímulos y demandas hematopoyéticas o si dicha respuesta sería transitoria. Recientemente se ha reportado que los motivos CpG pueden causar la destrucción de folículos linfoides (120), o proveer protección efectiva contra retos letales con una amplia variedad de patógenos, y han sido propuestos como agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas y cáncer (121), por lo que el estudio de la re-dirección de linaje en semejantes circunstancias puede tener a largo plazo beneficios aplicativos.

El DNA del virus de herpes simple es un ligando natural de TLR9, y la observación de re-dirección de los progenitores linfoides en la médula ósea de animales que cursan una infección viral activa por virus de herpes simple fue muy interesante. De las citocinas que han sido reportadas como contribuyentes a la regulación de células linfoides durante las etapas tempranas de una infección viral están los interferones (122). Los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  estuvieron elevados en nuestro sistema de infección aguda por HSV-1, pero algunos experimentos conducidos con ratones deficientes en interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) y en el receptor para los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\text{IFN}\alpha/\beta\text{R}^{-/-}$ ) sugieren que los interferones no son requeridos para la re-dirección durante la infección (no mostrado). Además, los progenitores linfoides deficientes en TLR9 no fueron inducidos a la producción de células dendríticas, lo que sugiere una vez más que las citocinas y quimiocinas causan la movilización de las células, mientras que los ligandos de TLR influyen a los progenitores a la producción de otras categorías celulares. Como previamente sugerido, las células troncales y progenitores localizados en tejidos periféricos pudieran montar una respuesta local hacia productos de patógenos (88). Los estudios que utilizan ratones deficientes en TLR9 indican que esta molécula y las moléculas de señalización asociadas no son esenciales para resolver las infecciones por HSV-1 (123,124); sin embargo las infecciones crónicas pudieran requerir el reemplazo de células dendríticas y aunque ellas son de larga vida relativamente, es posible que su incremento refuerce la inmunidad. Por otro lado, dada la persistencia de los linfocitos B y el potencial proliferativo de las células de memoria, el cese solo temporal de la producción de células B probablemente no comprometa la defensa inmune (125). Entonces es

probable que un cambio rápido en la producción de un tipo celular a otro tenga valor en el inicio de una respuesta innata. Es notable que hoy en día se siguen descubriendo nuevas categorías celulares que juegan papeles especiales en el sistema inmune (23,44,45), y quedan por definir los elementos y rutas de su formación. Los hallazgos descritos aquí sugieren que los productos de patógenos microbianos también representan factores de diferenciación importantes para células dendríticas funcionales que mantienen la habilidad de responder a la activación de TLR.

Es también posible imaginar que este fenómeno llevara a la enfermedad. Por ejemplo, las pDC son mediadores principales de autoinmunidad y las infecciones crónicas a menudo causan excesiva producción de dendríticas, así que en ese escenario debe existir un proceso de control retroalimentador que restaure frecuentemente el balance.

Finalmente, será importante determinar si la linfopoyesis es alterada en la médula ósea de humanos como un resultado de cambios generados en el microambiente por quimioterapia, terapia con CpG o infección viral. Aunque nuestro análisis inicial de la reconstitución de las células linfoides en individuos transplantados después de condiciones de quimioterapia mieloablativa no se enfocó a estudiar células troncales y/o progenitores de médula ósea, parece consistente con lo observado en ratón; es decir, la linfopoyesis de B se ve incrementada durante y después del rebote de quimioterapia, mientras las células T no son reestablecidas aún a largo plazo. Sin embargo, en presencia de infección viral hubo un decremento en el número de individuos que restablecen la linfopoyesis de B. Las infecciones por herpesvirus, incluyendo citomegalovirus, constituyen un reto para la supervivencia del hospedero inmunosuprimido, en el cual los eventos más tempranos de la respuesta inmune son decisivos para contrarrestar la diseminación viral. Un reporte reciente en modelo de ratón, en el cual se ha generado una mutación en el gen *tlr9* que abole la respuesta a CpG, indica que TLR9 juega un papel crítico en el reconocimiento de citomegalovirus y el inicio de una rápida respuesta antiviral (126). Por otro lado, nuestras observaciones preliminares señalan que los progenitores

linfoides purificados de médula ósea de humanos adultos expresan TLR9, lo que abre la posibilidad de que durante la infección por citomegalovirus exista una interacción entre dicho receptor y componentes de DNA viral que influyeran en la diferenciación linfo-hematopoyética temprana.

Es bien conocido que el proceso de reconstitución del sistema inmune es multifactorial, especialmente en los sujetos que exhiben una enfermedad maligna de base, que se han sometido a terapia química condicionante y a menudo cursan con infección. La continuación de estas investigaciones contemplando progenitores linfoides purificados provenientes de médula ósea humana permitirá responder una serie de preguntas básicas alrededor de la influencia de los cambios en el microambiente hematopoyético en los eventos tempranos de diferenciación en la normalidad y durante una enfermedad.

## **XI. CONCLUSIONES**

1. La producción de linfocitos es sostenida durante la vida adulta por progenitores primitivos que se dividen intermitentemente, y readquieren algunos aspectos del programa de diferenciación fetal después de quimioterapia.
2. La influencia que ejerce el microambiente sobre la linfopoyesis en la homeostasis y durante estrés hematopoyético puede ser cuali y cuantitativamente diferente.
3. Los progenitores linfoides tempranos de médula ósea pueden asumir destinos alternos en respuesta a factores extrínsecos como los componentes microbianos: la inestabilidad de linaje es un atributo normal de las células linfopoyéticas tempranas y sufre ajustes durante una infección.
4. Los progenitores tempranos de células B y de células T son distintos con respecto a la capacidad de responder a estímulos microambientales exógenos generados durante la quimioterapia y la infección.
5. La reconstitución de las células B en pacientes con trasplante hematopoyético después de quimioterapia condicionante es superior a los valores normales y posiblemente refleja el efecto de la quimioterapia sobre los progenitores linfoides de médula ósea.

## **XII. PERSPECTIVAS**

El presente análisis provee información importante acerca de los eventos más tempranos de la linfopoyesis, y genera un número de preguntas cuyo abordaje pudiera sostener las bases para el desarrollo de medios para proteger y sostener el sistema inmune durante quimioterapia, inflamación o infecciones, y después del trasplante hematopoyético. Por ejemplo: ¿Comparten los progenitores linfoides y las células troncales un nicho común en la médula ósea cuyo mantenimiento depende de las mismas señales? ¿La entrada y salida de la quiescencia celular en progenitores y células troncales es influenciada de manera similar por estímulos microambientales nocivos? ¿Está la actividad mitótica de los progenitores linfoides relacionada a su capacidad de diferenciación y restauración del sistema inmune? ¿Cuál es la contribución de los componentes bacterianos y otros factores exógenos en la generación diaria de poblaciones del sistema inmune innato en humanos?

### **XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

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+CD117+CD19+/- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2019-2030.
28. Rumfelt 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. Allman D, Li J, Hardy RR. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* 1999; 189: 735-740.
34. 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.
35. Yoshida T, Ng SY, Zuñiga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 2006; 7: 382-391.
36. 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.
37. Sun XH. Multitasking of helix-loop-helix proteins in lymphopoiesis. *Adv Immunol* 2004; 84: 43-77.
38. 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.
39. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 55-79.
40. Ye M, Graf T. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 123-128.

41. 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.
42. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* 2001; 2: 83-88.
43. Montecino-Rodríguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 2006; 7: 293-301.
44. 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 adaptative immunity. *Nat Med* 2006; 12: 207-213.
45. 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.
46. Spits H, Lanier LL. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* 2007; 26: 11-16.
47. 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.
48. 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.
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, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zuñiga-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. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald R, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999; 10:547-558.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005; 106: 1232-1239.
65. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988.
66. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, et al. Osteoblasts support B lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 2007; 109: 3706-3712.
67. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista Investigación Clínica* 2006; 58: 498-511.

68. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leukemia Res* 2005; 29:515-524.
69. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-1885.
70. Li L, Xie T. STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605-631.
71. 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.
72. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21<sup>cip1/waf1</sup>. *Science* 2000; 287: 1804-1808.
73. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005; 26: 426-433.
74. 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.
75. Ezoë S, Matsumura I, Satoh Y et al. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 2004; 3: 314-318.
76. Bradford GB, Williams B, Rossi R et al. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 1997; 25: 445-453.
77. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X et al. *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3120-3125.
78. Cheng T. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7256-7266.
79. Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden D. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27 (kip1). *Nat Med* 2000; 6: 1235-1240.
80. Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N et al. Expression of p21<sup>Cip1/Waf1/Sdi1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999; 93: 4167-4178.
81. Nakano T. Hematopoietic stem cells: Generation and manipulation. *Trends Immunol* 2003; 24: 589-594.
82. Randall TD, Weissman IL. Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 1997; 89: 3596-3606.
83. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002; 21: 3295-3313.

84. Kincade PW, Medina K, Smithson G, Zheng Z, et al. 1998. Life/death decisions in B lymphocyte precursors. A role for cytokines, cell interaction molecules, and hormones. In: Monroe JG, Rothenberg EV, editors. Molecular biology of B and T cell development. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; p. 177-196.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 287-320.
90. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-473.
91. Haddad R, Guardiola P, Izac P, Thibault C, Radich J et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104: 3918-3926
92. Di Santo JP, Vosshenrich CA. Bone marrow versus thymic pathways of NK cell development. *Immunol Rev* 2006; 214: 35-46
93. Dontje W, Schotte R, Cupedo T, Nagasawa M, Scheeren F, Gimeno R, Spits H, Blom B. Delta-like 1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cells versus T-cell lineage decisions through control of GATA3 and Spi-B. *Blood* 2006; 107: 2446-2452
94. International Bone Marrow Transplant Registry: report on state of the art in blood and marrow transplantation. 2003. [http://www.ibmtr.org/infoserv/info\\_sums.html](http://www.ibmtr.org/infoserv/info_sums.html)
95. Centers for disease control and prevention: guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. 2005. <http://www.cdc.gov/>
96. Kuwata N, Igarashi H, Ohmura T et al. Cutting edge: Absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J Immunol* 1999; 163: 6355-6359.

97. Igarashi H, Kuwata N, Kiyota K et al. Localization of recombination activating gene 1/green fluorescent protein (RAG1/GFP) expression in secondary lymphoid organs after immunization with T-dependent antigens in *rag1/gfp* knock-in mice. *Blood* 2001; 97: 2680-2687.
98. Darzynkiewica Z, Juan G, Srour EF. Differential Staining of DNA and RNA. *Current Protocols in Cytometry.*: John Wiley & Sons, Inc.; 2005:7.3.1-7.3.16.
99. Blasco MA. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 627-633.
100. Huang J, Garrett KP, Pelayo R et al. Propensity of adult lymphoid progenitors to progress to DN2/3 stage thymocytes with Notch receptor ligation. *J Immunol* 2005; 175: 4858-4865.
101. Brytting M, Sundqvist V, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Meth* 1991; 32: 127-138.
102. van der Bij W, Torensma R, van Son WJ, Anema J, Schirm J, Tegzess AM et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody taining of blood leucocytes. *J Med Virol* 1988; 25: 179-188.
103. Osmond DG, Hales P. Methodology of Lymphocyte Kinetics. In: Herzenberg LA, ed. *The Integrated Immune System. Weir's Handbook of Experimental Immunology. Vol IV.* Cambridge: Blackwell Science, Inc.; 1996:209.1-209.22.
104. Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 3-6.
105. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94: 2548-2554.
106. Sedger LM, Hou S, Osvath SR, Glaccum MB, Peschon JJ, Van RN, Hyland L. Bone marrow B cell apoptosis during in vivo influenza virus infection requires TNF-alpha and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* 2002; 169: 6193-6201.
107. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987; 69: 369-380.
108. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998; 95: 1471-1490.
109. 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.
110. 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.

111. Hirose J, Kouro T, Igarashi H et al. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev* 2002; 189: 28-40.
112. Lin WC, Desiderio S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2733-2737.
113. Jiang H, Chang FC, Ross AE et al. Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF liNK destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle. *Mol Cell* 2005; 18: 699-709.
114. Sadofsky MJ. Recombination-activating gene proteins: more regulation, please. *Immunol Rev* 2004; 200: 83-89.
115. Yokota T, Huang J, Tavian M, Nagai Y, Hirose J, Zuñiga-Pfucker JC, Peault B, Kincade PW. Tracing the first wave of lymphopoiesis in mice. *Development* 2006; 133: 2041-2051.
116. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 Suppl 1:S53-S57.
117. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005; 115: 930-939.
118. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117: 663-676.
119. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 705-738.
120. Heikenwalder m, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R, Aguzzi A. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 2004; 10: 187-192.
121. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-484.
122. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006; 108: 3253-3261.
123. Wuest T, Austin BA, Uematsu S, Thapa M, Akira S, Carr DJ. Intact TLR9 and type I interferon signaling pathways are required to augment HSV-1 induced corneal CXCL9 and CXCL10. *J Neuroimmunol* 2006; 179: 46-52.
124. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004; 103: 1433-1437.

125. Hao Z, Rajewsky K. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J Exp Med* 2001; 194: 1151-1163.
126. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Nat Acad Sci* 2004; 101: 3516-3521.

## Cell Cycle Quiescence of Early Lymphoid Progenitors in Adult Bone Marrow

ROSANA PELAYO,<sup>a</sup> KOZO MIYAZAKI,<sup>a</sup> JIAXUE HUANG,<sup>a</sup> KARLA P. GARRETT,<sup>a</sup> DENNIS G. OSMOND,<sup>b</sup> PAUL W. KINCADE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Immunobiology and Cancer Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, USA;

<sup>b</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

**Key Words.** Adult stem cells • B lymphopoiesis • Fetal stem cells • G<sub>0</sub> • Hematopoiesis • Hematopoietic cell transplantation  
Hematopoietic progenitor cells • Hematopoietic stem cell

### ABSTRACT

Lymphocyte production in bone marrow (BM) requires substantial cell division, but the relationship between largely quiescent stem cells and dividing lymphoid progenitors is poorly understood. Therefore, the proliferation and cell cycle status of murine hematopoietic progenitors that have just initiated the lymphoid differentiation program represented the focus of this study. Continuous bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation and DNA/RNA analysis by flow cytometry revealed that a surprisingly large fraction of RAG-1<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup> early lymphoid progenitors (ELPs) and RAG-1<sup>+</sup>c-kit<sup>lo</sup> pro-lymphocytes (Pro-Ls) in adult BM were in cell cycle quiescence. In contrast, their counterparts in 14-day fetal liver actively proliferated. Indeed, the growth fraction (cells in G<sub>1</sub>-S-

G<sub>2</sub>-M phases) of fetal ELPs was on average 80% versus only 30% for adult ELPs. After 5-fluorouracil treatment, as many as 60% of the adult ELP-enriched population was in G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M and 34% incorporated BrdU in 6 hours. Transcripts for Bcl-2, p21Cip1/Waf1, and p27 Kip1 cell cycle regulatory genes correlated inversely well with proliferative activity. Interestingly, adult lymphoid progenitors in rebound had the high potential for B lymphopoiesis in culture typical of their fetal counterparts. Thus, lymphocyte production is sustained during adult life by quiescent primitive progenitors that divide intermittently. Some, but not all, aspects of the fetal differentiation program are reacquired after chemotherapy. STEM CELLS 2006;24:2703–2713

### INTRODUCTION

Development and replenishment of the immune system require differentiation from rare hematopoietic stem cells (HSCs). This dynamic process can be viewed as a gradual progression from very primitive hematopoietic progenitors with multiple lineage potentials through more restricted progenitors [1], and it is tightly linked to proliferation. There has been substantial progress in understanding how pre-B cells progressively expand, complete immunoglobulin (Ig) gene rearrangement, and give rise to functional B cells [2]. In contrast, methods have only recently been developed to study cells that have just initiated the lymphoid differentiation program [3], and little information is available about their proliferation.

A strain of heterozygous RAG-1/green fluorescent protein (GFP) knockin mice are used to isolate the earliest known lymphoid progenitors from adult bone marrow (BM) and fetal liver [4, 5]. This is possible because GFP fluorescence corresponds to the presence of RAG-1 transcripts in cells that are

primitive in terms of transcription factors, surface markers, and time required to differentiate into lymphoid cells. These Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup>RAG-1<sup>+</sup> early lymphoid progenitors (ELPs) in adult BM have tremendous potential for generating all lymphoid cell lineages and likely give rise to Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>Sca-1<sup>±</sup>CD27<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup>RAG-1<sup>+</sup> pro-lymphocytes (Pro-Ls). Similarly, the RAG-1-expressing cells in embryos can be resolved into a series of differentiation stages beginning with c-Kit<sup>hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>GFP<sup>lo</sup> and culminating in c-Kit<sup>lo/-</sup>GFP<sup>hi</sup> subsets [5]. The cell cycle status of primitive lymphoid progenitors represented the main focus of this study.

HSCs in a state of prolonged cell cycle quiescence have been proposed to support hematopoiesis through clonal succession. That is, one or a small number of HSC clones give rise to mature blood cells as needed, and the remaining HSCs are inactive and do not contribute to hematopoiesis until the proliferative capacity of the cycling HSC clone is exhausted [6–8]. To address this issue, the proliferation of HSCs in adult mice

Correspondence: Paul W. Kincade, Ph.D., 825 NE 13th Street, Oklahoma City, Oklahoma 73104, USA. Telephone: 405-271-7905; Fax: 405-271-8568; e-mail: kincade@omrf.ouhsc.edu Received April 12, 2006; accepted for publication August 15, 2006; first published online in STEM CELLS EXPRESS August 24, 2006. ©AlphaMed Press 1066-5099/2006/\$20.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2006-0217

was analyzed *in vivo* by means of bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation kinetics [9, 10]. By the end of 6 months of continuous BrdU administration, 99% of HSCs had incorporated BrdU during DNA synthesis and, although 75% of HSCs are quiescent in phase  $G_0$  at any one time, all HSCs are recruited intermittently into the cell cycle so that 99% of them divide on average every 57 days. Whether cycling HSCs contribute directly to cells entering the lymphopoietic program has not been directly addressed.

The growth, differentiation, and survival of HSCs are regulated by a number of cytokines and chemokines and by the relative basal expression level of cyclins, cyclin-dependent kinases (cdks), and cdk-inhibitors (cdkis) [8]. Whereas stem cell factor (SCF), Flt3-ligand, thrombopoietin, interleukin (IL)-3, and IL-6 promote the growth of human HSCs *in vitro* [11], transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) induce cell cycle arrest of HSCs [12] and primitive hematopoietic progenitor-enriched fractions [13, 14], respectively. Similar information is emerging about extracellular cues that regulate the earliest stages of lymphopoiesis [15].

HSC cyclins are negatively regulated by cdkis [10]. Among the cdkis, p21 is highly expressed in the quiescent HSC-like fraction of BM cells. Moreover, HSCs in the  $G_0$  phase are reduced and the total number of HSCs increased in p21<sup>-/-</sup> mice [16], and survival in p21<sup>-/-</sup> mice treated with the myelotoxic agent 5-fluorouracil (5-FU) is much lower than in littermate controls. These results indicate that p21 is a key molecule that restricts HSC entry into cell cycle, thereby imposing limits on their pool size and preventing their exhaustion. On the other hand, cdkp27 seems to govern the expansion of progenitor cell populations [17–19].

Many transcription factors such as c-Myb, GATA-2, Gfi-1, Bmi-1, and those of the homeobox (Hox) family have been shown to be additional key players in the proliferation and differentiation of early BM progenitor cells. A recent study using *Hoxb4*-deficient mice demonstrated reduced proliferative capacity of BM and fetal liver HSCs without affecting differentiation or lineage choice [20]. HOXB4, like Notch, has been reported to induce or enhance the expression of *c-myc*, cyclin D2, cyclin D3, cyclin E, and E2F1 in murine HSCs [21], and modulation of their signaling in hematopoietic precursors could represent an interesting approach to improve cell-based therapy [22]. Key to the long-term success of these strategies will be a molecular understanding of the population dynamics *in vivo* of HSCs and their more-committed downstream progenitors [23].

B lymphopoiesis has been depicted as a unidirectional process in which developing cells transit through successive differentiation stages in an irreversible, synchronous manner. Recently, some studies have examined this view by quantification of specific BM precursor B-cell populations [24] or by combining kinetic analysis of developing B-cell subsets in the BM with mathematical modeling [2, 25]. Asynchronous differentiation models explain BM-labeling kinetics and predict reflux between the pre- and immature B-cell pools. Additionally, studies in normal, gene-deleted, transgenic, and mutant mice have shown that the apoptotic index and apoptotic rate are maximal during the pro-/pre-B-cell transition and among immature B lymphocytes in BM [26].

We have now studied the proliferation status of mouse lymphoid progenitors that are recently derived from HSCs. The results indicate that ELPs in fetal liver proliferate much faster than their counterparts in adult BM. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of key cell cycle mediators identified several that could account for the fetal/adult disparity. A BrdU-labeling pattern for ELPs and Pro-Ls in adult BM suggests that cells in both compartments are cycling asynchronously and intermittently. Furthermore, adult progenitors acquire some, but not all, characteristics of fetal cells during rebound from chemotherapy. Although primitive lymphoid progenitors sustain replenishment of the immune system throughout adult life, they exist in two kinetic states and only a minority is in cell cycle at any one time.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice and Cell Suspensions

RAG-1/GFP knockin mice have been described [4, 27] Wild-type (WT) C57BL/6 strain mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, <http://www.jax.org>). Heterozygous F<sub>1</sub> RAG-1/GFP mice were generated at the OMRF (Oklahoma Medical Research Foundation) Laboratory Animal Research Facility (Oklahoma City, OK) by mating homozygous male RAG-1/GFP knockin mice with WT female mice. Fetal liver cells were obtained at embryonic days 13–16 (E13–E16). Adult BM cells were purified from 3- to 5-month-old heterozygous RAG-1/GFP knockin mice.

### BrdU Treatment of Mice and Cell Cycle Analyses

Groups of 35–55 mice for adult BM studies were given an initial intraperitoneal injection of BrdU (100  $\mu$ g/100  $\mu$ l of phosphate-buffered saline [PBS]), while groups of three pregnant mice for fetal studies were given BrdU intravenously at zero time. This was to establish a satisfactory concentration of label and a valid starting time. In each case, BrdU was then administered continuously in drinking water (0.8 mg/ml) for the duration of the experiment. At defined time points, adult or fetal lymphoid progenitors were purified from treated mice by sorting pooled BM or fetal liver samples, respectively, followed by intracellular staining with monoclonal antibody (mAb) to BrdU (BrdU flow kit; BD Biosciences, San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com>). Phycoerythrin (PE)-labeled, rather than fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled, anti-BrdU mAb was used to visualize BrdU in RAG-1/GFP<sup>+</sup> progenitors. The cells were analyzed on a FACScan (BD Biosciences), using Cell Quest and WinMDI 2.8 software programs. Representative analyses are shown in supplemental Figure 1.

### Flow Cytometry and Cell Sorting

Adult BM was flushed from femurs, tibias, and humeri with 3% fetal calf serum (FCS) PBS. Cells were enriched by incubation with antibodies to lineage markers Gr1 and CD11b/Mac1 for myeloid cells, CD19 and CD45R/B220 for B-lineage cells, and TER-119 for erythroid cells, followed by negative selection using the Bio-Mag cell separation system (Qiagen Inc., Valencia, CA, <http://www1.qiagen.com>). These partially lineage-depleted cells were further blocked with anti-FcR and stained with allophycocyanin-anti-c-kit antibody and with biotin-anti-lineage markers (Gr-1, Mac-1, CD3, CD8a, CD19, CD45R, DX-5, and

TER-119) combined with streptavidin (Sav)-R613. CD11b/Mac1 was not included in the lineage-depletion protocol after 5-FU treatment. Sorting on MoFlo (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, <http://www.dakocytomation.com>) was performed on the basis of Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>c-kit<sup>hi</sup> (ELP) and Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>c-kit<sup>lo</sup> (Pro-L). Sca-1 was used as an additional gating parameter for lymphoid progenitors in our previous studies but is expressed at artificially high levels on cells in rebound BM. Fetal livers (E13–E16) were minced, and the suspensions were subjected to depletion of TER-119<sup>+</sup> cells prior to two-steps cell sorting. In the first step, cells were sorted into GFP<sup>-</sup>, GFP<sup>lo</sup>, and GFP<sup>hi</sup>. Background autofluorescence was discriminated from authentic GFP by collecting data in two fluorescence channels without compensation [5]. An illustration of this method is provided as supplemental online Figure 2. Sorted cells were incubated with anti-FcR before staining with APC-anti-c-kit and bio-Sav-R613-anti-Sca-1 or PE-anti-Sca-1 antibodies and subjected to a second round of sorting. Hematopoietic progenitors were fractionated according to Sca-1 and c-kit expression, as previously described [5].

#### Treatment with 5-FU

Adult mice were given a single intraperitoneal injection with 5-FU (150 mg/kg of body weight) in PBS. BM was recovered at the times indicated.

#### Cell Cycle Fractionation with Hoechst and Pylonin Y

A combination of Hoechst 33342 (Hst) and pylonin Y (PY) was used for the differential staining of cellular RNA and DNA, as described elsewhere [28]. Briefly, lymphoid progenitors were fixed in 70% ethanol overnight, resuspended in a solution of 2  $\mu$ g/ml Hst (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) and 4  $\mu$ g/ml PY (Polysciences, Inc., Warrington, PA, <http://www.polysciences.com>), and measured by flow cytometry on a MoFlo equipped with UV laser (DakoCytomation). Because RNA staining with PY yields a continuous histogram without demarcation between positive and negative cells [29], an arbitrary analysis window comprising approximately 15% of fetal liver cells displaying minimal PY staining was used to designate G<sub>0</sub> fraction in all experiments.

#### Real-Time PCR Analysis of Cell Cycle Gene Expression

Lymphoid progenitors were sorted at high purity. Sequences of cell cycle candidate genes were obtained from the UCSC (University of California at Santa Cruz) genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), and specific forward and reverse oligonucleotide primers were designed using Primer 3 program ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (supplemental online Table 1). The real-time PCR amplification mixture contained template cDNA, 2 $\times$  SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>) and 2  $\mu$ M each primer mix. Reactions were 10 minutes at 95°C followed of 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60 seconds at 60°C in an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative gene expression was calculated using  $\beta$ -actin cDNA as an endogenous control [relative gene expression =  $2^{(Ct_{ctrl} - Ct_{gene})} \times 10^3$ ].

#### Telomerase Activity Detection

Telomerase activity was measured quantitatively in  $1 \times 10^3$  lymphoid progenitors by one-step real-time reaction (Express Biotech International, Frederick, MD, <http://www.expressbiotech.com>). Briefly, the active telomerase from lysed cells added a varied number of telomeric repeats onto the 3'-end of a substrate oligonucleotide. The extension products were amplified by PCR and then detected by measuring the increase in fluorescence by binding of SYBR green to double-stranded DNA. A standard curve was performed to calculate activity using an oligonucleotide with a sequence identical to telomere primers.

#### Stromal Cell Cocultures

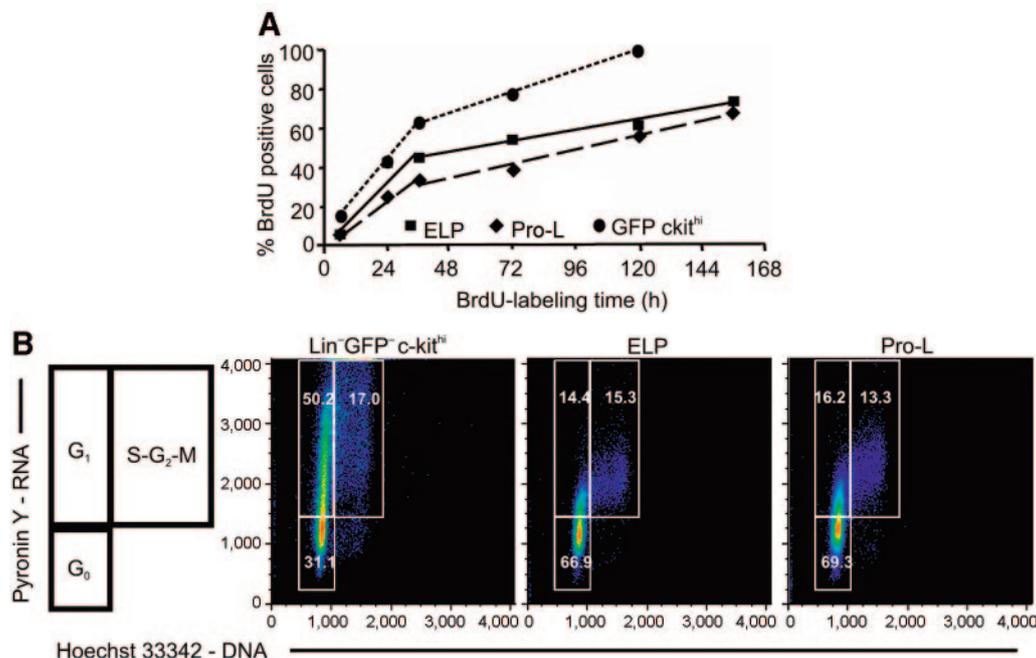
Sorted lymphoid progenitors were cocultured for up to 3 weeks with delta-like-1 and GFP retrovirally transduced OP9 stromal cells (OP9-DL1 and OP9-GFP, kindly provided by Dr. J.C. Zúñiga-Pflücker, University of Toronto, Ontario, Canada), as previously described [30] with modifications. During the first week, the  $\alpha$ -minimal essential medium 10% FCS contained  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin, plus 2 ng/ml SCF, 5 ng/ml Flt3-L, and 2 ng/ml IL-7. During the second and third weeks of coculture, the IL-7 concentration was increased to 5 ng/ml.

#### RESULTS

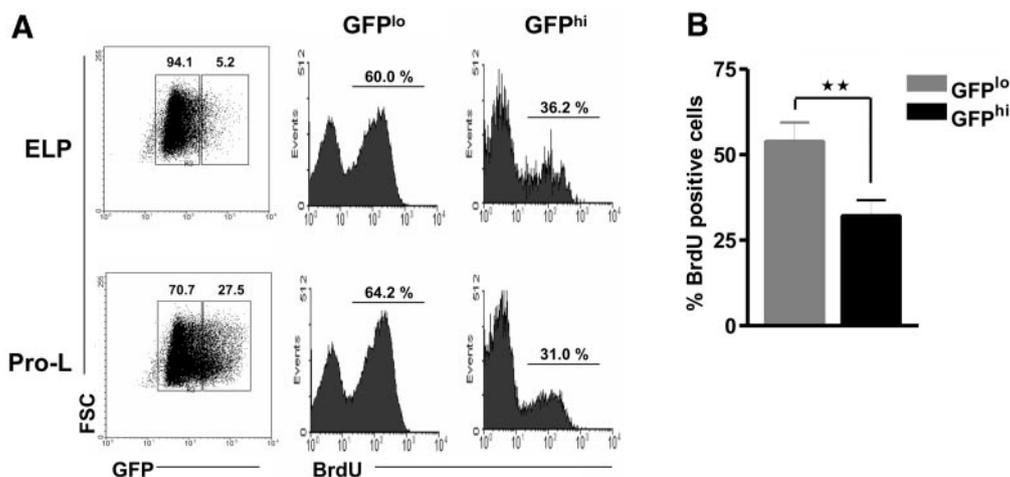
##### ELPs and Pro-Ls in Adult BM Are Each Heterogeneous with Respect to Cell Cycle Kinetics, and a Significant Fraction Are Quiescent

BM cells that lack all markers of differentiated blood cells were resolved into primitive and more mature progenitors according to levels of c-kit and RAG-1 in RAG-1/GFP knockin mice. Stem cells, multipotent progenitors, and ELPs are in the c-kit<sup>hi</sup> fraction of lineage-marker negative (Lin<sup>-</sup>) BM, with one of the distinguishing characteristics of ELPs being activation of the RAG-1 locus [3, 4]. The c-kit<sup>lo</sup> fraction of Pro-L (including common lymphoid progenitor [CLP]) generate B- and natural killer (NK)-lineage cells more quickly in short-term cultures [3, 4, 31, 32].

Continuous administration of BrdU yielded biphasic labeling curves for both ELP and Pro-L populations (Fig. 1A), which were simultaneously sorted for analyses (supplemental online Figs. 1 and 2). An initial steep rise in the labeling index, which represented the DNA labeling of a fraction of rapidly cycling cells, was soon followed by a second slower rise, indicating the gradual entry of labeled cells into a considerably larger cell fraction [33]. Extrapolating from the 36-hour interval to the time necessary to reach complete (100%) labeling yielded an apparent average cell cycle time of 11.9 days for the ELP population as a whole and 11.4 days for the Pro-L population, both cell cycle times long in comparison with that of the Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>hi</sup> GFP<sup>-</sup> fraction of BM (5 days). Consistent with these findings, an analysis of DNA/RNA cell content revealed that a majority of ELPs and Pro-Ls are in a G<sub>0</sub> state at any given time (Fig. 1B). Taken together, these results indicate that ELPs and Pro-Ls in adult BM consist of a mixture of cells representing two kinetic states, a minor set of cycling cells and a major set of quiescent cells which represented approximately two thirds of the total populations of ELPs and Pro-Ls. The slow linear BrdU labeling



**Figure 1.** Most lymphoid progenitors in adult bone marrow are in a state of cell cycle quiescence. **(A):** Adult bone marrow ELP, Pro-L, and a cohort Lin<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>c-kit<sup>hi</sup> population were purified from bone marrow pooled from at least 35 BrdU-treated mice, followed by intracellular staining for BrdU. Each point on the curves represents a single measurement for one pool. The numbers of mice used per time point were 35 for 6 hours, 55 for 24 hours, 52 for 36 hours, 55 for 72 hours, 50 for 120 hours, and 50 for 156 hours. Linear regression by least squares analysis was used to fit two sets of lines for each cell type. **(B):** ELP, Pro-L, and Lin<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>c-kit<sup>hi</sup> cells were stained for Hoechst 33342 and Pyronin Y. The diagram at the side illustrates how actively dividing cells can be resolved on the basis of RNA/DNA staining into G<sub>1</sub> or S+G<sub>2</sub>+M fractions. Cell frequencies in G<sub>0</sub> or each cell cycle phase are shown. The data are derived from and representative of two different experiments that were conducted independently from that shown in **(A)**. Abbreviations: BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; ELP, early lymphoid progenitor; GFP, green fluorescent protein; Pro-L, pro-lymphocyte.

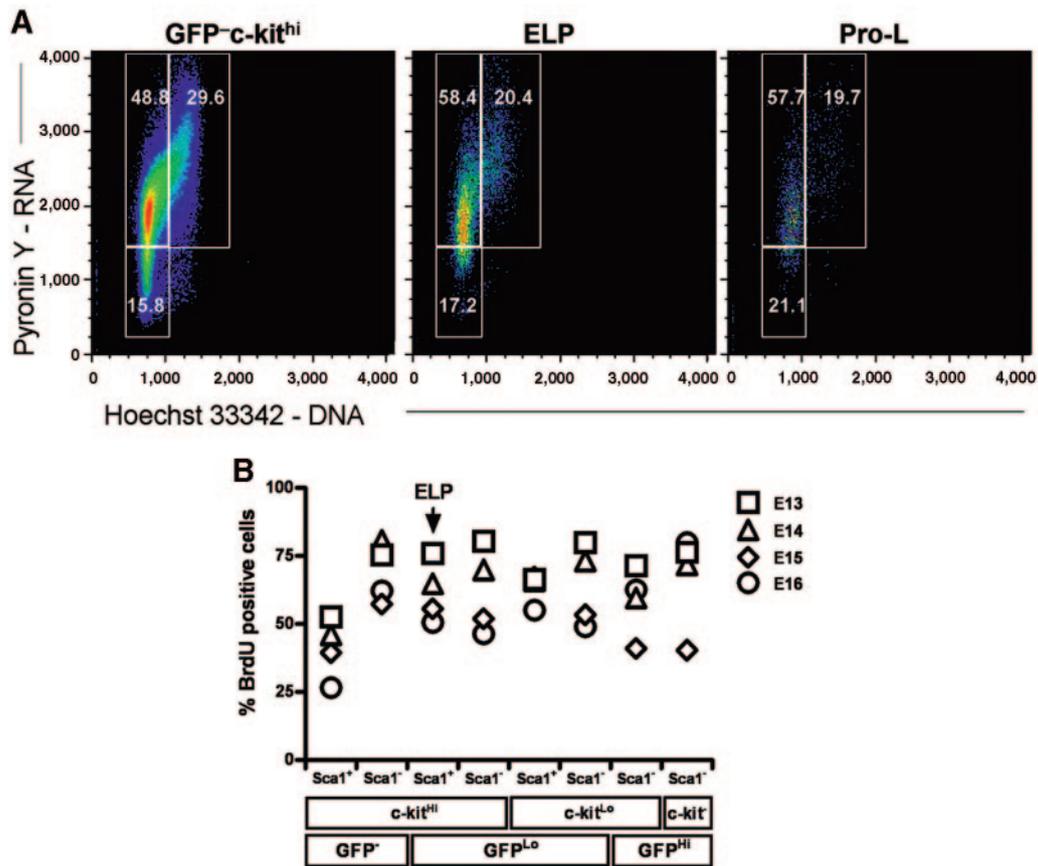


**Figure 2.** RAG-1<sup>lo</sup> and RAG-1<sup>hi</sup> subsets of lymphoid progenitors are not homogeneous with respect to proliferative activity. **(A):** GFP<sup>+</sup> ELPs and GFP<sup>+</sup> Pro-Ls were sorted from adult bone marrow of mice after 5 days of BrdU treatment. The two subsets were then resolved according to GFP density (left panels), and the incorporation of BrdU was analyzed for each population by means of intracellular staining (right panels). **(B):** Average percentages for BrdU labeling of RAG-1/GFP<sup>lo</sup> and RAG-1/GFP<sup>hi</sup> cells across all intervals are shown. **\*\****p* = .0076. Abbreviations: BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; ELP, early lymphoid progenitor; GFP, green fluorescent protein; Pro-L, pro-lymphocyte.

of the second subset of cells indicates that these ELPs and Pro-Ls do not remain permanently in a dormant G<sub>0</sub> state but are slowly turning over. Periodically, G<sub>0</sub> cells are triggered to enter cell cycle, after which some or all of their labeled progeny may revert to the G<sub>0</sub> state.

The designation ELP does not imply homogeneity [1, 3, 4, 34]. Rather, the most primitive lymphoid cells express

TdT, RAG-1, a human  $\mu$  transgene (in transgenic mice), or some combination of these characteristics. Also, levels of GFP vary among cells from RAG-1/GFP mice gated for any given set of cell surface markers. We now report that ELPs with the highest levels of RAG-1 incorporate BrdU at a substantially lower rate than ELPs with less RAG-1. This analysis was performed after 24, 36, 120, and 156 hours of



**Figure 3.** The entire lymphopoietic series in fetal liver is rapidly dividing. **(A):** Cell cycle status was determined by flow cytometry of Hoechst 33342- and Pyronin Y-stained ELP GFP<sup>lo</sup>c-kit<sup>hi</sup>, Pro-L GFP<sup>lo</sup>c-kit<sup>lo</sup>, and GFP<sup>-</sup>c-kit<sup>hi</sup> cells sorted from E14 fetal liver. **(B):** Pregnant mice (E13–E16) were given BrdU intravenously, and in drinking water for 6 hours. The lympho-hematopoietic progenitors were sorted and stained with monoclonal antibody to BrdU. The subsets are arranged according to probable degree of maturity, beginning with the stem cell-rich fraction on the left and CD19<sup>+</sup>-expressing cells at the far right. Results are representative of two independent experiments. Abbreviations: BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; E, embryonic day; ELP, early lymphoid progenitor; GFP, green fluorescent protein; Pro-L, pro-lymphocyte.

continual treatment with BrdU (Fig. 2 and data not shown). The same parameter revealed similar heterogeneity among Pro-Ls, the cells showing the highest rate of BrdU uptake having relatively lower levels of RAG-1. Therefore, the kinetic data shown in Figure 1 represent average values for cell subsets that are not homogenous with respect to mitotic and RAG-1 gene activity. Variations in RAG-1 gene transcriptional activity could be inversely linked to proliferation such that Ig gene recombination can safely occur.

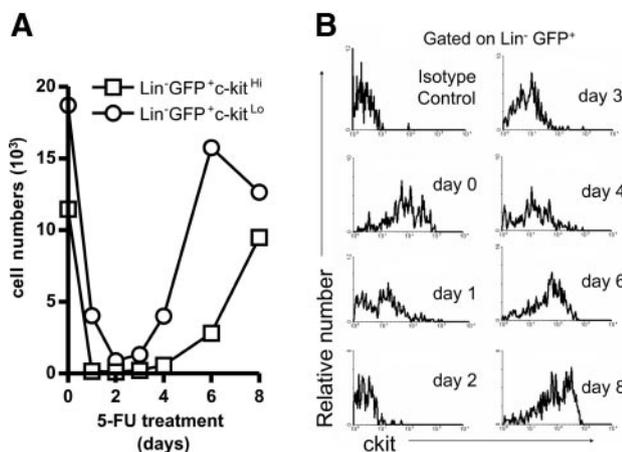
### The Lymphopoietic Series in Fetal Liver Is Rapidly Dividing

Many studies have revealed fetal/adult differences in lymphopoiesis, raising important questions about the properties of stem cells present at different developmental ages [35]. An analysis of cell cycle status indicated that approximately 20% of E14 fetal liver c-kit<sup>hi</sup> Sca-1<sup>+</sup> RAG-1/GFP<sup>lo</sup> ELPs were in the S+G<sub>2</sub>+M phases of the cell cycle and an additional 58% were in G<sub>1</sub> (Fig. 3A). Similarly, high values for the proportion of cycling cells were observed with all other lymphoid populations in the E14 fetal liver, including cells in the c-Kit<sup>lo</sup> Sca-1<sup>-</sup> RAG-1/GFP<sup>hi</sup> category, which are largely CD19<sup>+</sup>. These observations, consistent with relatively short cell cycle times,

demonstrate a high growth fraction of proliferating early lymphoid cells in the fetal liver.

We then injected pregnant mice with BrdU and performed an incorporation analysis of fetal liver subsets 6 hours later (Fig. 3B). Unlike the case with adult animals, very high labeling indices could be observed during this short interval. Indeed, at 13 days of gestation, more than 70% of all lymphoid cells incorporated BrdU in 6 hours. Thereafter, BrdU labeling indices for most subsets tended to decline with gestational age but were extremely high at all time points relative to adult BM progenitors. In fact, BrdU incorporation rates for adult ELPs were less than fetal ELPs even after 6 days of BrdU injection.

These data suggest that apparent proliferation rates of fetal lymphoid progenitors are substantially higher than those of adult progenitors. Indeed, a 30-fold longer interval was needed to achieve the equivalent degree of labeling with adult cells. Furthermore, two-parameter flow cytometry revealed that the growth fraction of fetal progenitors is correspondingly high with an average of only 20% in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle at any one time (Fig. 3A). We conclude that few of these cells are in a state of cell cycle quiescence prior to birth.

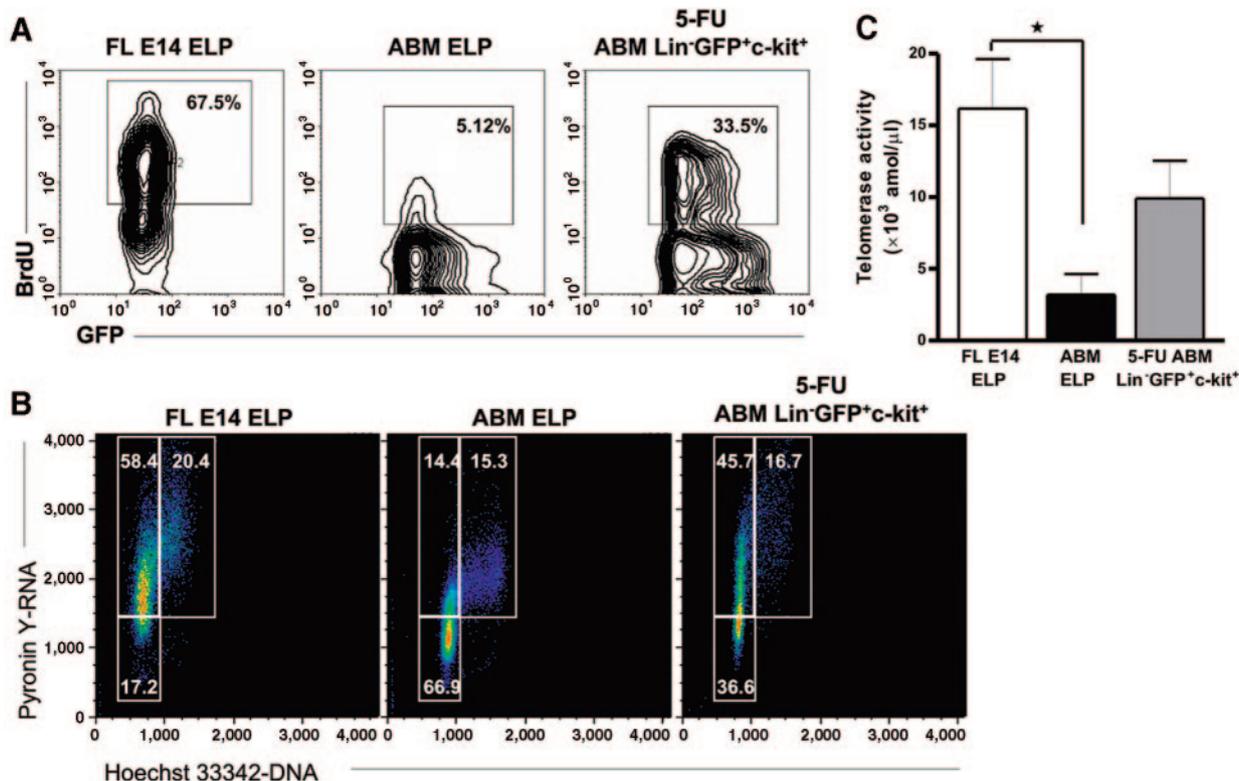


**Figure 4.** Transient depletion of lymphoid progenitors along with loss of c-kit expression after 5-FU chemotherapy. Mice were treated with a single dose of 5-FU, and early lymphoid progenitors and pro-lymphocytes were sorted after the indicated intervals. (A): Absolute numbers of each cell type recovered from four bones are given. (B): Temporal changes in the expression of c-kit on  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+$  cells after treatment is shown. The top left panel shows the results of staining with an isotype control antibody. Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; GFP, green fluorescent protein.

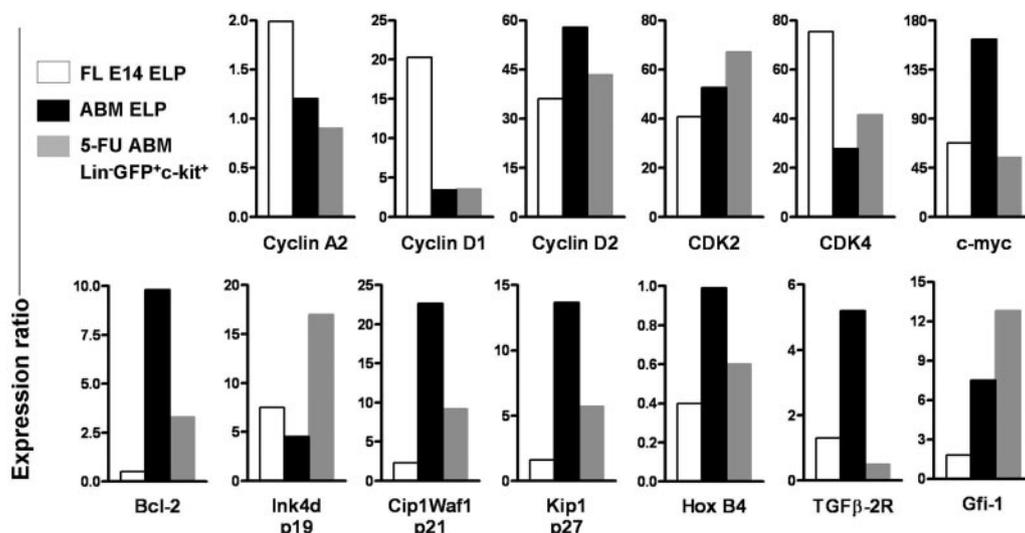
### Adult Lymphoid Progenitors Enter Rapid Cycle During Rebound from 5-FU Treatment

Fetal, but not adult, stem cells express Flk-2, Mac-1, and CD34 [5, 36, 37]. It is interesting that stem cells regenerating in the BM of adult mice after chemotherapy are  $\text{CD11b/Mac-1}^+$  and  $\text{CD34}^+$  [38, 39]. There are also fetal/adult differences with respect to the markers displayed on lymphoid progenitors, and we wondered whether proliferative characteristics of fetal cells could be also induced on those within BM. RAG-1/GFP mice were treated with a single injection of 5-FU and then examined for up to 8 days, resulting in a transient depletion in lymphoid progenitors. RAG-1/GFP $^+$  cells could be identified among the  $\text{Lin}^-$  fraction of 5-FU-treated BM, and numbers of these cells recovered dramatically from day 4 after 5-FU treatment, when rebound from chemotherapy is said to begin (Fig. 4A) [38].

As previously reported, BM hematopoietic cells at early times post 5-FU treatment expressed only low levels of the c-kit receptor for SCF (Fig. 4B) [38]. Therefore, in subsequent experiments conducted at 4 days after treatment, we did not use c-kit density to discriminate ELPs from Pro-Ls. A minority expressed detectable amounts of IL-7R $\alpha$  (data not shown), and we assume that most progenitors at that time would be recently generated and thus equivalent to ELPs. Very small numbers of  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+ \text{c-kit}^+$  cells displayed low levels of the CD11b myeloid marker after 5-FU treatment,



**Figure 5.** Lymphoid progenitors rebounding from chemotherapy are, like fetal progenitors, in active cell cycle. After 90 hours of 5-FU treatment, mice were given BrdU intraperitoneally, and in drinking water for 6 hours. ABM was recovered at 96 hours, and the purified 5-FU  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+ \text{c-kit}^+$  lymphoid progenitors and control ELPs were stained with anti-BrdU to examine proliferation rates (A) or were stained for Hoechst 33342 and Pyronin Y (B). In parallel, BrdU was given to pregnant mice for 6 hours and FL E14 ELPs were analyzed. Telomerase activity was measured quantitatively in FL E14 ELP, ABM ELP, and ABM 5-FU  $\text{Lin}^- \text{GFP}^+ \text{c-kit}^+$  cells by real-time PCR (C). The graph shows median values ( $\text{amol}/\mu\text{l}$ ) with bars representing standard errors.  $*p = .025$ . Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; ABM, adult bone marrow; BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; E, embryonic day; ELP, early lymphoid progenitor; FL, fetal liver; GFP, green fluorescent protein.



**Figure 6.** Changes in cell cycle-regulated gene expression during rebound from chemotherapy correspond to the fetal pattern in early lymphoid progenitors. Lymphoid progenitors from FL E14, ABM, and 5-FU-treated ABM were sorted, and transcripts for cell cycle regulators were detected by cDNA-based real-time amplification. The data are expressed relative to levels of  $\beta$ -actin cDNA. Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; ABM, adult bone marrow; BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; E, embryonic day; ELP, early lymphoid progenitor; FL, fetal liver; GFP, green fluorescent protein.

but this was not comparable with ELPs or Pro-Ls present in fetal liver (supplemental online Fig. 3). Furthermore, the CD34 marker characteristic of fetal stem/progenitor cells was not re-expressed on adult lymphoid progenitors in rebound (supplemental online Fig. 3).

To assess proliferation, the animals were injected with and then fed BrdU for 6 hours before analysis. Approximately one-third of recovering adult progenitors incorporated the label (Fig. 5A), and the percentage of progenitors in the inactive  $G_0$  fraction was also greatly reduced (Fig. 5B). It is noteworthy that BrdU incorporation indices were lower than the cell cycle activity determined by Pyronin Y/Hoechst staining. The latter method may be more sensitive, especially when only 6 hours are allowed for tissue equilibration and uptake of BrdU. Telomerase is important for maintaining stem cell chromosome integrity, and we evaluated this enzyme in ELPs. Telomerase activity in fetal cells was fourfold higher than in adult cells and markedly upregulated in progenitors recovered during marrow rebound (Fig. 5C).

Mitotic activity was also assessed by measuring transcripts for key cell cycle mediators (Fig. 6). Transcripts for cyclin A2, cyclin D1, and CDK4 were much lower in adult than fetal progenitors, and the pattern was not reversed after chemotherapy. CDK2 and Gfi-1 were low in fetal cells and again unchanged by 5-FU treatment. In contrast, levels of cyclin D2, c-myc, Bcl-2, Ink4d/p19, Cip1Waf1/p21, Kip1/p27, HoxB4, and TGF- $\beta$ 2R levels in lymphoid progenitors from rebound adult BM closely resembled those from fetal liver.

Thus, some, but not all, aspects of the fetal differentiation program could be reacquired by adult lymphoid progenitors during rebound from chemotherapy. Levels of 8 of 13 cell cycle regulators paralleled re-entry into rapid division, but there was no corresponding re-expression of the fetal cell surface markers CD11b and CD34.

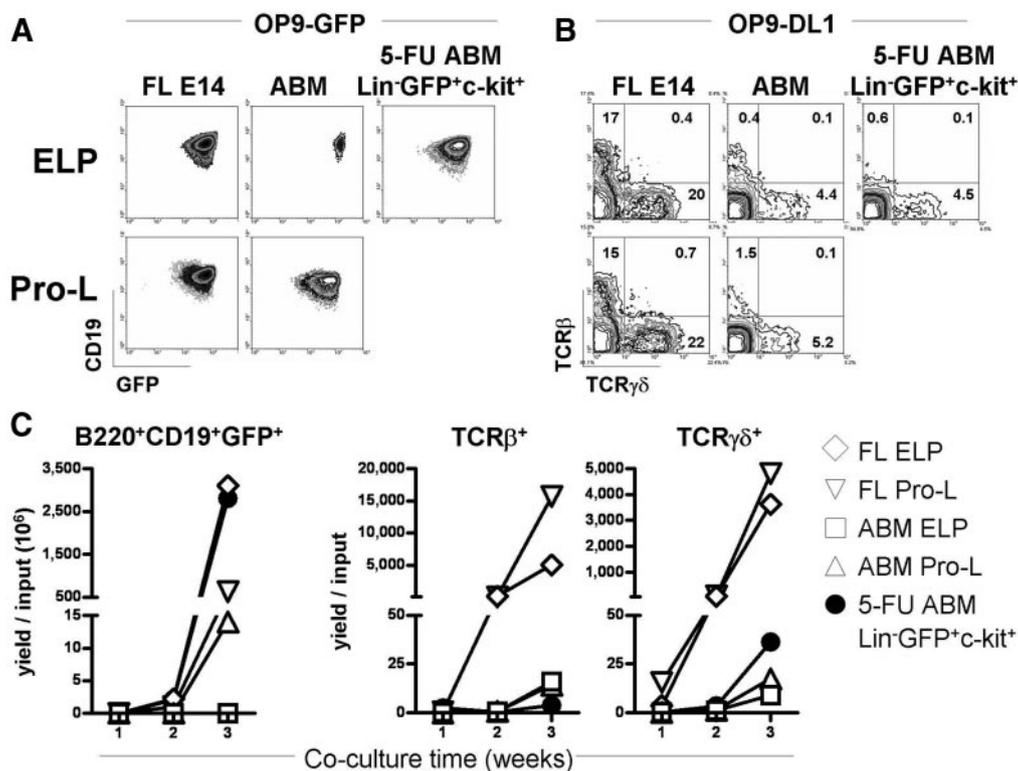
### Rebounding Adult Lymphoid Progenitors Are Not Harmed by Chemotherapy and Have Some Functional Properties Typical of Their Fetal Counterparts

Stromal cell cocultures were used to compare the differentiation potential of fetal, adult, and rebound lymphoid progenitors (Fig. 7). All three populations produced B220/CD45R<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> B-lineage lymphocytes in 3-week cultures on OP-9 stromal cells (Fig. 7A), whereas T-lineage cells were made when the same cells received a Notch signal by culture on OP9-DL1 stromal cells (Fig. 7B). In the latter circumstance, recovering lymphoid progenitors had a tendency to make T-cell receptor (TCR)- $\gamma/\delta^+$  rather than TCR- $\beta^+$  cells. Yields of lymphocytes were extremely dependent on the source of the progenitors (Fig. 7C). Approximately 2 logs more B-lineage cells were produced from fetal or rebound progenitors on OP-9 as compared with those freshly isolated from normal adult marrow. The situation was quite different with respect to T-lineage cell differentiation, in which only fetal progenitors yielded high numbers of T cells within 3 weeks of culture on OP9-DL1.

Thus, chemotherapy by 5-FU did not alter the ability of adult lymphoid progenitors in rebound to generate T-lineage cells. Remarkably, B lymphopoiesis from rebound adult BM progenitors was as robust as that typical of fetal cells.

### DISCUSSION

Environmental cues in a specialized BM niche may determine what fraction of stem cells gives rise to proliferating lymphoid progenitors, and a subset of those replenishes the immune system. The population dynamics of T lymphocyte-lineage cells in the thymus have been extensively studied, and many aspects of B-lymphocyte formation have been similarly investigated [2, 40–44]. However, no comparable information was available about the most primitive lymphoid progenitors, and our understanding of fetal/adult differences in lymphopoiesis was incomplete. Here, we have exploited Rag-1/GFP knockin mice [4] and



**Figure 7.** Lymphoid progenitors in rebound from chemotherapy resemble their fetal counterparts with respect to B-, but not T-, differentiation potential. Lymphoid progenitors from FL E14 mice, nontreated adult mice, or 4-day 5-FU-treated mice were cultured for 3 weeks on OP9-GFP or OP9-DL1 stromal cells. (A): B-lineage GFP<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells were stained after harvesting from OP9-GFP cocultures. Plots show the populations gated on CD45R/B220. (B): T-lineage TCR-β<sup>+</sup> and TCR-γδ<sup>+</sup> cells were assessed in OP9-DL1 cocultures. (C): The yields per input progenitor for each lineage are depicted in the time-course graphs. Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; ABM, adult bone marrow; E, embryonic day; ELP, early lymphoid progenitor; FL, fetal liver; GFP, green fluorescent protein; Pro-L, pro-lymphocyte; TCR, T-cell receptor.

BrdU incorporation by DNA-synthesizing cells to explore those important issues. Although more mitotically active than stem cells, the most primitive cells in the lymphoid series divide only once every 12 days. Changes that occur in ELPs during recovery from 5-FU treatment may reflect processes that are important during transplantation and chemotherapy.

ELPs begin the lymphoid differentiation program and express several lymphocyte-related genes at low levels but have greatly reduced myeloid potential relative to stem cells. They are part of the Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> Flk-2<sup>+</sup> fraction of BM that has been variously referred to as multipotent progenitors (MPPs) or lymphocyte-primed MPPs [15, 37]. Although the RAG-1/GFP knockin model used here allows isolation of viable, functional ELPs, cells prepared this way may be very closely related to GFP<sup>-</sup> ones expressing other lymphoid genes such as *TdT* [4, 45]. In any case, ELPs are potent progenitors for T-, B-, NK-, and plasmacytoid dendritic cell (pDC) lineages [4, 32, 46]. They likely give rise to Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>lo</sup> Pro-Ls that include most cells designated CLPs on the basis of IL-7Rα expression [31].

Neither of these two lymphocyte progenitor populations is homogeneous, and at any given time, they existed in two kinetic states. Additionally, both ELPs and Pro-Ls had a range of GFP levels, and this inversely corresponded to degrees of BrdU incorporation. That is, the GFP brightest progenitors labeled more slowly than the dim ones, making it tempting to propose

an inverse relationship between activation of the RAG-1 locus and proliferation. There is a coordination of RAG-2 protein with the cell cycle, in parallel with fluctuations in the activity of cyclinA/CDK2 [47, 48]. RAG-2 preferentially accumulates in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, declines before cells enter S-phase, and remains low throughout the S-, G<sub>2</sub>-, and M-phases. Although levels of RAG-1 show less fluctuation, it has been suggested that its E3 ligase activity may target cell cycle regulatory proteins [49]. Our experience with the RAG-1/GFP knockin mice indicates that endogenous RAG-1 is initially expressed in strict concordance with GFP levels [5], but decay of the GFP protein is thought to be slower than the RAG-1 protein [4, 50]. Regardless, initiation and progression of progenitor cells through the earliest stages of lymphopoiesis are unlikely to be synchronous.

Cells with low RNA content maintain a state of dormancy in G<sub>0</sub>. As the cells enter G<sub>1</sub>, they accumulate RNA mainly in the form of ribosomal RNA until reaching S-phase [28, 29]. Many long-term hematopoietic cell-initiating cultures in humans and stem cells in mice are present in the G<sub>0</sub> fraction of adult BM [16, 29, 39]. Cycling and other HSC behavior is thought to be regulated by coordination of environmental signals and intrinsic programs. The environmental cues may be provided by a niche composed of specialized cell populations located in unique sites. Arai and colleagues recently demonstrated that Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>hi</sup> Tie-2<sup>+</sup> BM in G<sub>0</sub> efflux dye and adhere to osteoblasts at the subendosteal bone surface. This and other recent studies are

beginning to reveal signaling pathways, cytokines, and adhesion molecules that may regulate cell quiescence in the postulated stem cell niche [51–53].

Surprisingly, a substantial majority of primitive lymphoid progenitors were in  $G_0$  and additional ones were in early  $G_1$  (Fig. 1B). Although some of these cells are in proximity to the endosteal surface of the bone [54], that is not the case for a majority of the population and signals for quiescence might be delivered in other sites. That possibility accords with a recent report that quiescent HSCs can be found in tissues outside BM [55]. In any case, the slow population turnover for ELPs and Pro-Ls contrasts with the rapid proliferation of the large pro-B and pre-B cells that derive from them [2, 43, 44].

It is not known whether fetal lymphocyte progenitors are intrinsically different from those that arise as the hematopoietic system is replenished during adult life [1, 5]. BrdU labeling now shows that fetal lymphocyte progenitors divide considerably more rapidly than their adult counterparts, the rate of BrdU labeling gradually declining with gestational age (Fig. 3A). ELP and Pro-L populations in adult BM have low incidences, and their numbers remain constant without gross disturbance of the steady state. The primitive  $GFP^{lo}c-kit^{hi}Sca-1^+$  subset of fetal progenitors does not numerically increase in parallel with embryo size, whereas the more mature  $GFP^{hi}c-kit^{lo}Sca-1^-$  fraction expands explosively from E15 [56]. Therefore, rapid differentiation, cell death, and/or export to other tissues must balance production of the earliest lymphopoietic cells.

Many previous studies have used 5-FU treatment to deplete actively proliferating marrow cells after which several characteristics of fetal stem cells are reactivated. Our analysis centered on day 4 after treatment because that is when  $c-kit^+ RAG-1^+$  lymphoid progenitors began to emerge. This is consistent with previous descriptions of the recovery of HSCs [38, 57]. CD11b/Mac-1 and CD34 are present on fetal and rebound HSCs, but not those in BM of normal mature animals [36, 38]. Changes in marker expression might reflect either the recent regeneration of lympho-hematopoietic cells after chemotherapy or abnormalities in the marrow microenvironment. Although lymphoid progenitors did not appear to reacquire these two fetal markers during rebound, they were in active cell cycle and had at least one function characteristic of fetal cells.

Substantial information is available about proteins that govern progression through the cell cycle, and we sought explanations for fetal/adult/rebound disparities by extensive real-time RT-PCR analyses. Of particular interest were mediators that were dramatically elevated or depressed in fetal ELPs and rebound lymphoid progenitors as compared with those taken from adult marrow. These include cyclin D2, *c-myc*, *Bcl-2*, *Ink4d/p19*, *Cip1/Waf1/p21*, *Kip1/p27*, *HoxB4*, and *TGF- $\beta$ 2R*. Of that group, *Bcl-2*, *Cip1/Waf1/p21*, and *Kip1/p27* have been described as inhibitors of cell cycle progression [8, 16, 58] and thus match the pattern of quiescence we observed for adult ELPs. The last two of these have been implicated in cell cycle regulation in HSCs and multipotent progenitors, respectively [8]. Therefore, further investigation of these molecules

might provide a mechanistic explanation for fetal/adult differences in proliferative activity.

Although ELPs are not stem cells, they can sustain lymphocyte production in the thymus for at least 6 weeks [4]. Furthermore, memory lymphocytes can expand and survive for long periods after participation in immune responses [59]. Telomerase is thought to be important for maintaining chromosome integrity in cells with such replicative potential, and its activity is known to be higher in fetal than adult life [60, 61]. Our results with ELPs correspond to that pattern, and it is interesting that telomerase activity increased during rebound from chemotherapy.

Some components of the immune system, especially  $CD4^+$  T lymphocytes, are slow to recover after the marrow ablation treatment used for chemotherapy and transplantation [62, 63]. However, we found no alteration in the T-lineage differentiation potential for post-5-FU treatment lymphoid progenitors. It could be that performance in the stromal cell coculture system we employed does not accurately reflect the ability to migrate to and colonize the thymus [30]. However, other culture assays for progenitors of NK and pDC also did not reveal an obvious influence of chemotherapy on differentiation potential (not shown). In striking contrast, formation of B-lineage lymphocytes from rebound progenitors was considerably greater than that from normal adult BM and equivalent to that observed with fetal cells.

As this manuscript was being completed, mitotic properties were described for hematopoietic cells defined with different criteria [64]. Some 50% of MPPs, a category that includes ELPs, were found to be in  $G_0$ . The MPP fraction also includes  $Lin^-c-Kit^{hi}RAG-1^-$  cells that we found to be 30% quiescent. Thus,  $RAG-1^+$  ELPs (67% in  $G_0$ ) are less mitotically active than otherwise-similar cells. CLPs comprise most of the Pro-L fraction, and Passegue et al. reported that 74% were in  $G_0+G_1$  [64], which is in general agreement with our finding of 85% for Pro-Ls.

Overall, this analysis provides important information about the earliest events in lymphopoiesis and raises a number of interesting questions. For example, do ELPs and stem cells share a common niche in BM and depend on the same signals to maintain quiescence? We also need to learn whether and how mitotic activity of lymphoid progenitors relates to their ability to differentiate and rapidly restore the immune system.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Michael Cancro and Linda Thompson for critical reading of this manuscript and suggestions. We also thank Robert Welner for valuable discussion, Jacob Bass and Diana Hamilton for expert sorting, Tara Khamphanthala for technical assistance, and Shelli Wasson for professional editorial assistance. This work was supported by Grants AI 20069 and AI 58162 from the National Institutes of Health. P.W.K. holds the William H. and Rita Bell Endowed Chair in Biomedical Research. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D.Sc. for R.P. at Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

#### DISCLOSURES

The authors indicate no potential conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol* 2004;25:645–649.
- Mehr R, Shahaf G, Sah A et al. Asynchronous differentiation models explain bone marrow labeling kinetics and predict reflux between the pre- and immature B cell pools. *Int Immunol* 2003;15:301–312.

- 3 Pelayo R, Welner RS, Nagai Y et al. 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.
- 4 Igarashi H, Gregory SC, Yokota T et al. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 2002;17:117–130.
- 5 Yokota T, Kouro T, Hirose J et al. Unique properties of fetal lymphoid progenitors identified according to RAG1 gene expression. *Immunity* 2003;19:365–375.
- 6 Snodgrass R, Keller G. Clonal fluctuation within the haematopoietic system of mice reconstituted with retrovirus-infected stem cells. *EMBO J* 1987;6:3955–3960.
- 7 Capel B, Hawley R, Covarrubias L et al. Clonal contributions of small numbers of retrovirally marked hematopoietic stem cells engrafted in unirradiated neonatal *W/W<sup>c</sup>* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4564–4568.
- 8 Ezoe S, Matsumura I, Satoh Y et al. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 2004;3:314–318.
- 9 Bradford GB, Williams B, Rossi R et al. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 1997;25:445–453.
- 10 Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X et al. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3120–3125.
- 11 Nakauchi H, Sudo K, Ema H. Quantitative assessment of the stem cell self-renewal capacity. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:18–24.
- 12 Fan X, Valdimarsdottir G, Larsson J et al. Transient disruption of autocrine TGF- $\beta$  signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 2002;168:755–762.
- 13 Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH et al. MCP-1, not MIP-1 $\alpha$ , is the endogenous chemokine that cooperates with TGF- $\beta$  to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood* 1998;92:2338–2344.
- 14 Cashman JD, Clark-Lewis I, Eaves AC et al. Differentiation stage-specific regulation of primitive human hematopoietic progenitor cycling by exogenous and endogenous inhibitors in an in vivo model. *Blood* 1999;94:3722–3729.
- 15 Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N 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.
- 16 Cheng T, Rodrigues N, Shen H et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21<sup>Cip1/Waf1</sup>. *Science* 2000;287:1804–1808.
- 17 Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N et al. Expression of p21<sup>Cip1/Waf1/Sdi1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999;93:4167–4178.
- 18 Steinman R, Yaroslavskiy B, Goff JP et al. Cdk-inhibitors and exit from quiescence in primitive haematopoietic cell subsets. *Br J Haematol* 2004;124:358–365.
- 19 Yaroslavskiy B, Watkins S, Donnenberg AD et al. Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 1999;93:2907–2917.
- 20 Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M et al. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 2004;103:4126–4133.
- 21 Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H et al. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 2004;279:24986–24993.
- 22 Nakano T. Hematopoietic stem cells: Generation and manipulation. *Trends Immunol* 2003;24:589–594.
- 23 Bruno L, Rocha B, Rolink A et al. Intra- and extra-thymic expression of the pre-T cell receptor alpha gene. *Eur J Immunol* 1995;25:1877–1882.
- 24 Lu L, Smithson G, Kincade P et al. Two models of murine B lymphopoiesis: A correlation. *Eur J Immunol* 1998;28:1755–1761.
- 25 Asquith B, Debaq C, Macallan DC et al. Lymphocyte kinetics: The interpretation of labelling data. *Trends Immunol* 2002;23:596–601.
- 26 Lu L, Osmond DG. Apoptosis and its modulation during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol Rev* 2000;175:158–174.
- 27 Kuwata N, Igarashi H, Ohmura T et al. Cutting edge: Absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J Immunol* 1999;163:6355–6359.
- 28 Darzynkiewicza Z, Juan G, Srouf EF. Differential staining of DNA and RNA. In: *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2005;7:3.1–7.3.16.
- 29 Gothot A, Pyatt R, McMahon J et al. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0/G1 phase of the cell cycle. *Blood* 1997;90:4384–4393.
- 30 Huang J, Garrett KP, Pelayo R et al. Propensity of adult lymphoid progenitors to progress to DN2/3 stage thymocytes with Notch receptor ligation. *J Immunol* 2005;175:4858–4865.
- 31 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661–672.
- 32 Kouro T, Kumar V, Kincade PW. Relationships between early B- and NK-lineage lymphocyte precursors in bone marrow. *Blood* 2002;100:3672–3680.
- 33 Osmond DG, Hales P. Methodology of lymphocyte kinetics. In: Herzberg LA, ed. *The Integrated Immune System*. Weir's Handbook of Experimental Immunology. Vol IV. Cambridge: Blackwell Science, Inc., 1996:209.1–209.22.
- 34 Pelayo R, Welner R, Perry SS et al. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2005;17:100–107.
- 35 Kincade PW, Owen JJT, Igarashi H et al. Nature or Nurture? Steady state lymphocyte formation in adults does not recapitulate ontogeny. *Immunol Rev* 2002;187:116–125.
- 36 Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2002;30:3–6.
- 37 Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14541–14546.
- 38 Randall TD, Weissman IL. Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 1997;89:3596–3606.
- 39 Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548–2554.
- 40 Porritt HE, Rumpf LL, Tabrizifard S et al. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 2004;20:735–745.
- 41 Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:888–897.
- 42 Laurent J, Bosco N, Marche PN et al. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *Int Immunol* 2004;16:1069–1080.
- 43 Rolink A, Karasuyama H, Haasner D et al. Two pathways of B-lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. *Immunol Rev* 1994;137:185–201.
- 44 Lu L, Osmond DG. Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Immunol* 1997;158:5136–5145.
- 45 Medina KL, Garrett KP, Thompson LF et al. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nature Immunol* 2001;2:718–724.
- 46 Pelayo R, Hirose J, Huang J et al. Derivation of two categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 2005;105:4407–4415.
- 47 Lin WC, Desiderio S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2733–2737.

- 48 Jiang H, Chang FC, Ross AE et al. Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle. *Mol Cell* 2005;18:699–709.
- 49 Sadofsky MJ. Recombination-activating gene proteins: More regulation, please. *Immunol Rev* 2004;200:83–89.
- 50 Igarashi H, Kuwata N, Kiyota K et al. Localization of recombination activating gene 1/green fluorescent protein (RAG1/GFP) expression in secondary lymphoid organs after immunization with T-dependent antigens in *rag1/gfp* knockin mice. *Blood* 2001;97:2680–2687.
- 51 Arai F, Hirao A, Ohmura M et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149–161.
- 52 Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005;26:426–433.
- 53 Li L, Xie T. Stem cell niche: Structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605–631.
- 54 Hirose J, Kouro T, Igarashi H et al. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev* 2002;189:28–40.
- 55 Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005;121:1109–1121.
- 56 Yokota T, Tavian M, Hirose J et al. Tracing the first wave of lymphopoiesis in mice. *Development* 2006;133:2041–2051.
- 57 Nishio N, Hisha H, Ogata H et al. Changes in markers, receptors and adhesion molecules expressed on murine hemopoietic stem cells after a single injection of 5-fluorouracil. *STEM CELLS* 1996;14:584–591.
- 58 O'Reilly LA, Harris AW, Tarlinton DM et al. Expression of a *bcl-2* transgene reduces proliferation and slows turnover of developing B lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1997;159:2301–2311.
- 59 Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2002;2:982–987.
- 60 Blasco MA, Funk W, Villeponteau B et al. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 1995; 269:1267–1270.
- 61 Blasco MA. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 627–633.
- 62 Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: Challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 2005;35 Suppl 1:S53–S57.
- 63 Hakim FT, Memon SA, Cepeda R et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005;115:930–939.
- 64 Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S et al. 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.



See [www.StemCells.com](http://www.StemCells.com) for supplemental material available online.

**Cell Cycle Quiescence of Early Lymphoid Progenitors in Adult Bone Marrow**  
Rosana Pelayo, Kozo Miyazaki, Jiaxue Huang, Karla P. Garrett, Dennis G. Osmond  
and Paul W. Kincade

*Stem Cells* 2006;24:2703-2713; originally published online Aug 24, 2006;  
DOI: 10.1634/stemcells.2006-0217

**This information is current as of May 26, 2008**

**Updated Information  
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:  
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/24/12/2703>

**Supplementary Material**

Supplementary material can be found at:  
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/2006-0217/DC1>