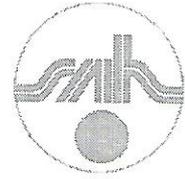


Ontogenia del sistema inmune

Graciela Lucero

Oncolab

Correspondencia:
graciela.lucero@fibertel.com.ar



HEMATOLOGIA, Vol. 10 N° 2: 45-53
Mayo-Agosto, 2006

El sistema inmune funcional consiste en tres poblaciones linfocitarias principales, las células B, T y NK. Las tres poblaciones median funciones efectoras inmunes complejas diferentes. Estas diferentes funciones son la consecuencia de las diferencias en el patrón de expresión génica en las células T, B y NK. Los receptores usados en el reconocimiento antigénico específico (la inmunoglobulina de superficie en las células B y el receptor de célula T en las células T), así también como la gran cantidad de moléculas de superficie y citoplasmáticas que median las funciones efectoras del sistema inmune, constituyen el fenotipo que distingue a las tres poblaciones.

ONTOGENIA B

Las células linfoides se diferencian a partir de células multipotentes o stem cells que dan origen a su vez a una célula comprometida en la diferenciación linfoide llamada stem cell linfoide. Estas células siguiendo una secuencia de eventos programados genéticamente, van a diferenciarse en los distintos tipos de linfocitos. Se originarían a partir de la stem cell linfoide células progenitoras de línea T, B y NK (Fig. 1).

Los datos sugieren que estas células derivan de un progenitor común.

La respuesta inmune humoral al estímulo antigénico es iniciada por las células B que poseen inmunoglobulina de superficie (IgS), las cuales reciben un complejo número de señales accesorias de las células T, macrófagos y células dendríticas. Las células B responden a estas señales colectivas y sobrellevan una expansión y maduración a células plasmáticas las cuales segregan grandes cantidades de Ig.

Previo a esta función crítica de defensa, las células B sobrellevan una fase de desarrollo independiente de antígeno en la médula ósea o en el tejido fetal.

La médula ósea es el órgano primario de desarrollo de las células B.

El primer evento que ocurre en la diferenciación B es la recombinación somática de los segmentos variables y constantes de los genes de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas son codificadas por una familia de genes que codifican para las regiones variable (V), constante (C), de unión (J) y de diversidad (D) que se hallan separados y discontinuos en distintos cromosomas específicos. Estos segmentos se llaman exones y se hallan separados por segmentos no codificantes o intrones (Fig. 2). Los genes para la cadena Kappa se hallan en el cromosoma 2, los de la cadena lambda en el cromosoma 22 y los de la cadena pesada en el cromosoma 14.

El locus de la cadena pesada que es el que se rearregla primero, tiene 51 segmentos VH funcionales, 6 segmentos J y 27 segmentos D entre los segmentos V y J.

Los genes para las cadenas livianas no contienen segmentos D.

Cuando se rearregla la cadena pesada uno de los 27 segmentos D se yuxtapone con uno de los 6 segmentos J posibles para lo cual debe ser eliminado el ADN que los separa (unión DJ). Esto se realiza por delección enzimática por endonucleasas y posterior recombinación (Fig. 3).

Para tener un gen activo es necesario un rearreglo VDJ para lo cual uno de los 51 segmentos V posibles se debe unir al segmento DJ previamente formado con eliminación del ADN intermedio (Fig. 4).

Luego el ADN que contiene el gen funcional transcribe un ARN mensajero que es inmaduro, el cual progresa a un ARN definitivo o maduro por eliminación enzimática y recombinación ("splicing" de ARN) de uno de los varios genes C posibles con el segmento VDJ ya formado. Cuando un gen funcio-

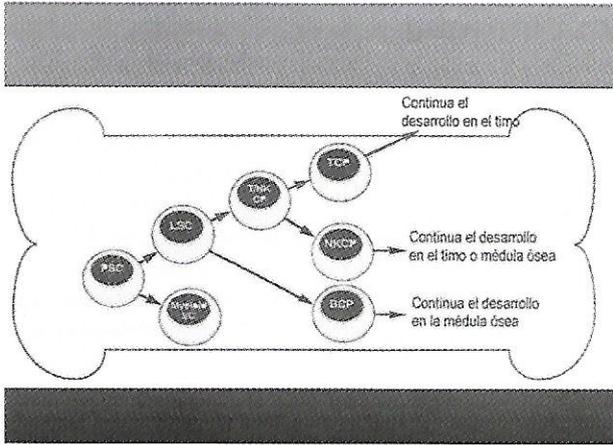


Fig. 1

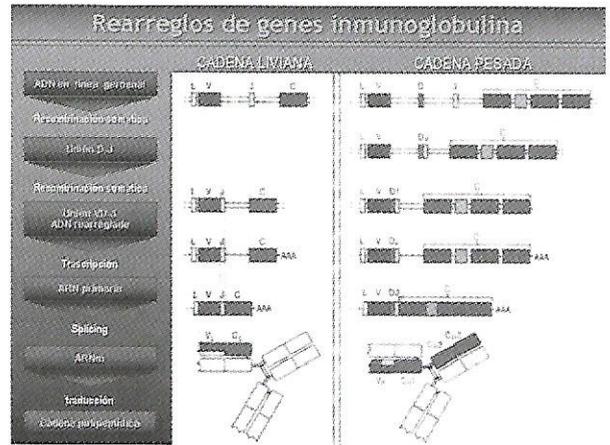


Fig. 3

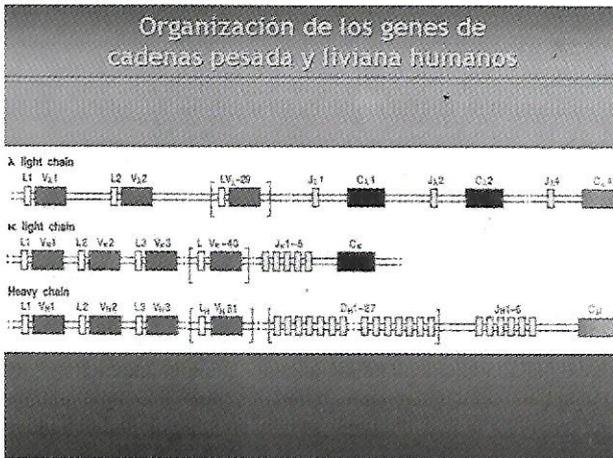


Fig. 2

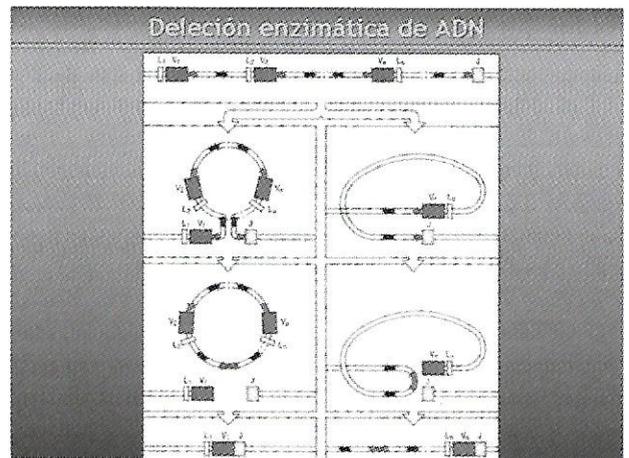


Fig. 4

nante VDJ se yuxtapone a un fragmento constante Cm puede producir una cadena pesada m citoplasmática.

El rearreglo de la cadena liviana ocurre de manera similar al de la cadena pesada pero como no contiene segmentos D, primero se realiza una unión VJ.

Para la cadena Kappa uno de los 40 genes funcionales Vk se yuxtapone con uno de los 5 segmentos Jk, y para la cadena liviana lambda uno de los 29 segmentos Vl se une a uno de los 4 pares de segmentos Jλ.

Cada célula B sobrevive un rearreglo génico que es único y por ello es un marcador específico de esa célula y para cualquier clon que surja de ella. Las células B normales muestran diferentes rearreglos. A esta diversidad se denomina policlonalidad. Las células de los linfomas muestran todas idénticos rearreglos génicos, indicando que todas han surgido de la misma célula transformada. A esto se denomina monoclonalidad.

Estos rearreglos ocurren de manera ordenada y jerárquica. Primero ocurre el rearreglo de cadena pesada m, luego el de la cadena liviana Kappa y finalmente el de la cadena liviana lambda (Fig. 5).

Nunca ocurren rearreglos simultáneos de ambos genes de cadenas livianas. Si no ocurren rearreglos productivos o funcionales, la célula va a la apoptosis. La supervivencia depende de si el rearreglo es productivo. Es interesante el hecho de que si el primer intento de rearreglo no es funcional, existe la posibilidad de intentar nuevos rearreglos. Estos intentos repetidos son más numerosos en el caso de los genes de cadena liviana, por lo cual pocas células no son rescatadas de la apoptosis entre los estadios de célula pre-B y de célula B inmadura.

Hay una serie de proteínas que contribuyen a los rearreglos. Los rearreglos dependen de la expresión de los genes de activación de la recombinación RAG-1- y RAG-2. Existe un complejo de diversas enzimas (complejo recombinasa) que actúan para la

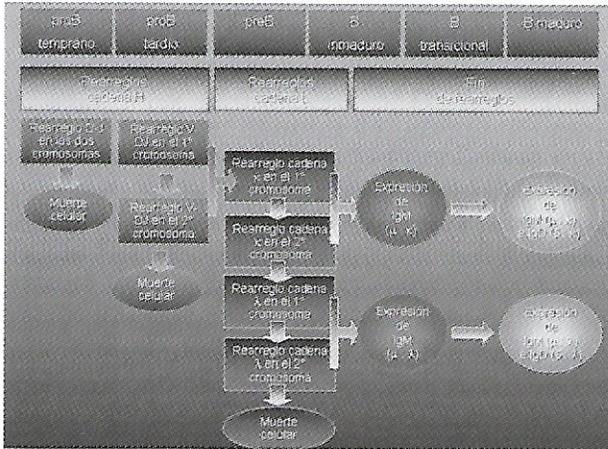


Fig. 5

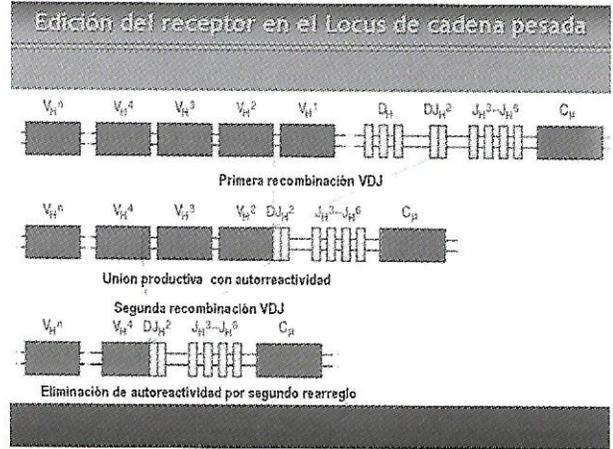


Fig. 7

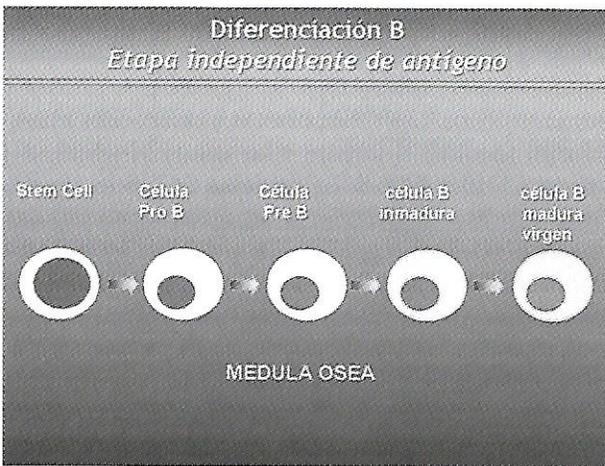


Fig. 6

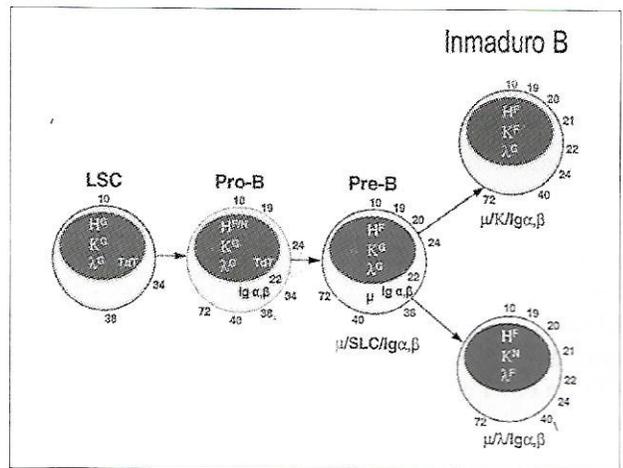


Fig. 8

recombinación somática. Son enzimas en su mayoría de clivaje y reparación del ADN.

Otro componente especializado del complejo recombinasa es la TDT o deoxinucleotidil transferasa terminal, la cual contribuye a la diversidad incorporando N-nucleótidos entre las regiones V, D y J en las uniones durante la recombinación. Se expresa en los progenitores tempranos y cesa su expresión en el estadio de célula pre-B cuando se completó el rearrreglo de la cadena pesada y ya ha comenzado el rearrreglo de cadena liviana.

Las recombinasas reguladas por los genes RAG-1 y RAG-2 también regulan los rearrreglos del receptor de célula T.

Del rearrreglo funcional de la cadena liviana resulta la aparición de una IgS completa la cual sirve como receptor del antígeno lo cual marca el estadio madurativo de célula B inmadura. La Fig. 6 muestra

los diferentes estadios de la diferenciación B de la etapa independiente de antígeno. La célula B inmadura puede ser eliminada por contacto con autoantígenos. Estas células autoreactivas pueden ser rescatadas por un fenómeno llamado "edición del receptor" en el cual la célula reemplaza el segmento génico V de la recombinación autoreactiva por un nuevo segmento V (Fig. 7). Esto ocurre sólo en células inmaduras y en la médula ósea.

Las células inmaduras dan lugar a su vez a las células B maduras vírgenes ("naive") como resultado de un splicing alternativo del ARN de la cadena pesada que produce un transcrito primario largo que contiene ambos exones (μ y δ) y puede expresar también de esa manera, la cadena pesada δ (IgM+IgD). Estas células pueden ahora responder a un antígeno diferenciándose a célula plasmática y a célula con memoria.

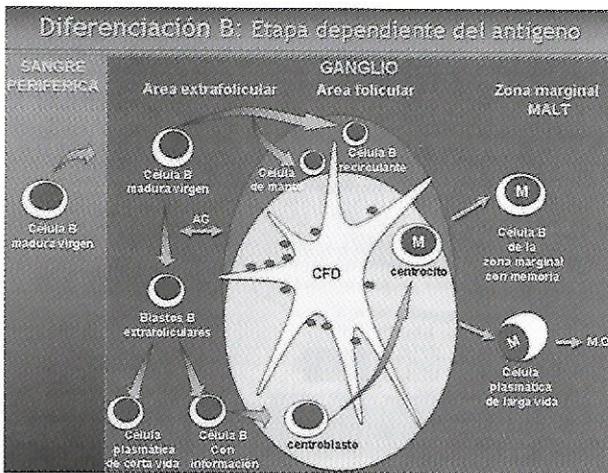


Fig. 9

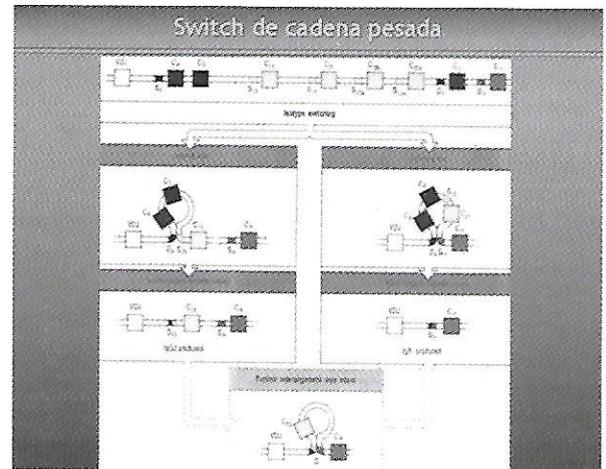


Fig. 10

Expresión antigénica en la maduración B

Cada uno de los estadios diferenciativos se caracteriza por una expresión de antígenos de membrana y citoplasmáticos (Fig. 8). La célula stem linfocítica se halla en muy bajo porcentaje (1%) y tiene un fenotipo inmunológico HLA-DR+, TdT+, CD34+, CD38+. En el estadio de célula pro-B aparece el antígeno CD19 en superficie y los antígenos CD22 y CD79a en el citoplasma. Con posterioridad se expresa el antígeno CD10. En el estadio de célula pre-B propiamente dicho aparece la cadena m citoplasmática, se expresa el antígeno CD20 y desaparecen el CD34 y la TdT.

En el estadio de célula B inmadura aparecen la IgM, y las moléculas CD21 y CD22 de superficie.

La Reacción Centro germinal

La célula B vírgen adquiere la capacidad de responder al antígeno dejando la médula ósea, pasando a la sangre periférica y entrando en el tejido linfocítico periférico (Fig. 9).

Aquí las células maduras vírgenes forman los folículos primarios junto con células dendríticas foliculares. En contacto con el antígeno las células vírgenes migran a la región externa del ganglio a las áreas T donde se transforman en blastos grandes y proliferan. Las células hijas o bien se diferencian en células plasmáticas de corta vida o en células que adquieren la capacidad de iniciar la reacción centro germinal. Estas células inducidas por el antígeno inician y mantienen la reacción centrogerminal, proliferan y se diferencian en centroblastos para formar un centro germinal. Se producen dos zonas en el centro germinal, una zona oscura compuesta por centroblastos y una zona clara compuesta principalmente

por centrocitos. Los centroblastos y centrocitos muestran un fenotipo diferente a las células vírgenes, expresan CD10 y BCL-6. La proteína BCL-6 es un potente represor transcripcional ausente en células pregerminales y progenies diferenciadas. Modula las respuestas de célula B en los centros germinales. Es necesaria para la reacción centrogerminal (hipermutación somática y switch de clase) pero su expresión es subsecuentemente disminuida para permitir a la célula B salir de los centros foliculares y para la diferenciación terminal. La expresión permanente de BCL-6 provocada por traslocaciones cromosómicas produce represión de genes involucrados en la activación y diferenciación, arresto del ciclo celular y apoptosis contribuyendo al desarrollo de los linfomas. Las células B centrogerminales también tienen la capacidad de disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2.

Durante la proliferación y diferenciación de los centroblastos a centrocitos ocurren las mutaciones somáticas al azar de las regiones variables de los genes de Ig. Estas mutaciones se insertan en la región que codifica para el sitio de unión con el antígeno.

Las células vírgenes no impulsadas por el antígeno forman el manto folicular o zona del manto. Esto constituye un folículo secundario. El objetivo de estas mutaciones es incrementar la afinidad del receptor por el antígeno. Las mutaciones pueden ser desfavorables no sólo no incrementando la afinidad sino también impidiendo la expresión de la Ig. Estos centrocitos no se unen con alta afinidad a las células foliculares dendríticas (CFD) que tienen atrapado al antígeno y no reciben de ellas señales de supervivencia. Más del 90% de los centrocitos van a la apoptosis y son fagocitados por los macrófagos. Los centrocitos con mutaciones favorables que resultaron en recepto-

TABLA 1

Desarrollo de células B				
Independiente de Ag. (Méd. ósea)	Células B	Genes de Ig	Mutaciones somáticas	Ig proteína
Depend. de Ag. (T. linfoide perif.)	Stem Cell	Línea germinal	Ninguna	Ninguna
	Pro B	Línea germinal	Ninguna	Ninguna
	Pre B	Rearreglo IgH	Ninguna	μ citopl.
	B inmadura	Rearreglo IgH/IgL	Ninguna	IgS (IgM)
	B madura virgen	Rearreglo IgH/IgL	Ninguna	IgS(IgM/IgD)
	Centro germinal (CB/CC)	Rearreglo IgH/L Switch de clase	Introduc. de mutaciones	IgM (mínima o ausente)
	Células B con memoria	Rearreglo IgH/L	Mutaciones somáticas	IgM
	Célula plasmática	Rearreglo IgH/L	Mutaciones somáticas	IgG>IgA>IgD

TABLA 2

Relación de las neoplasias B con las subpoblaciones B y los estadios madurativos		
Célula B	Marcadores	Neoplasia
Stem Cell	CD34	
Pro B	CD19, CD22c, CD79a, CD10, TdT, CD34	LLA-B/LLB
Pre B	CD19, CD79a, CD22c, CD10-/+ , CD34-/+ , TdT, μcitop.	
Célula B inmadura	CD19, CD20, CD79a, IgS	
Célula B madura virgen	CD19, CD20, CD79a, CD5, IgS	LLC-B/LM
Centro germinal (CB y CC)	CD19, CD20, CD22, CD79a, CD10, BCL 6	LF, LB, LDCG, LHPL, LHC,
Células con memoria	CD19, CD20, CD22, CD79a	LZM, LLC-B
Célula plasmática	CD38, CD138, IgS-, IgC+	MM/Plasmocitoma

res con alta afinidad se unen al antígeno atrapado por la CFD y reciben una señal de supervivencia (selección positiva). La presencia de mutaciones de la región V de la Ig es un marcador para la célula que indica que

ha sido expuesta al centro germinal, ya sea en estadio germinal o postgerminal. El switch de clase del isotipo de cadena pesada (cambio de IgM a IgG o IgA o IgE) permite una mayor eficiencia de defensa de la Ig

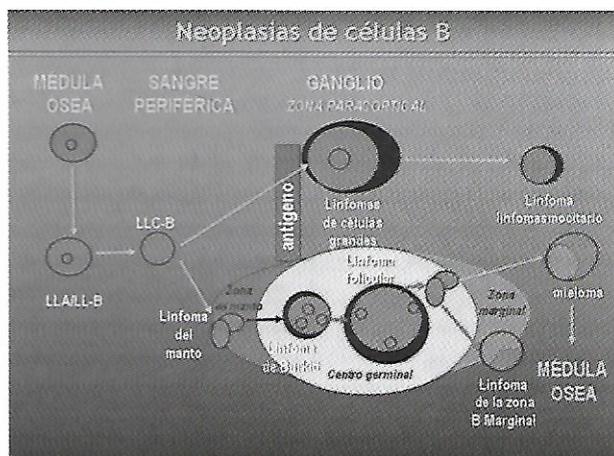


Fig. 11

secretada y ocurre preferentemente en células que maduran a células plasmáticas. El switch de clase requiere de la delección de los segmentos de ADN que separan al segmento VDJ ya formado del gen de la nueva región constante (Cg, Ca, o Ce) (Fig. 10). Involucra la recombinación entre las llamadas regiones de switch que se hallan próximas a las regiones constantes son secuencias repetitivas que guían el cambio de isotipo o switch.

En resumen la reacción centrogerminal tiene como función generar células con memoria, madurar la afinidad de los receptores de Ig (hipermutación somática) y aumentar la eficiencia de la Ig secretada (switch de clase).

Los centrocitos que sobreviven en el centro germinal maduran a células plasmáticas de larga vida o a células con memoria.

La maduración se completa por emigración de las células del centro germinal. Las células plasmáticas van preferentemente a la médula ósea y a los órganos expuestos a los antígenos extraños como el tracto gastrointestinal y el pulmón. El estadio de diferenciación terminal involucra cambios en la expresión de antígenos, como ser la pérdida de los antígenos de célula B (CD20, CD22 y de la IgS), la fuerte expresión de CD38 y CD138 y la producción de Ig secretoria que se acumula en el citoplasma (IgC).

Las células B con memoria se localizan preferentemente en la zona marginal por lo que reciben el nombre de células B de la zona marginal, la cual es bien reconocible en el bazo, en ganglios linfáticos mesentéricos y en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT).

Como resultado de las distintas fases de diferenciación de células B y de los procesos de mutación somática, se identifican células B inmaduras y maduras con diferencias en el status mutacional y expresión

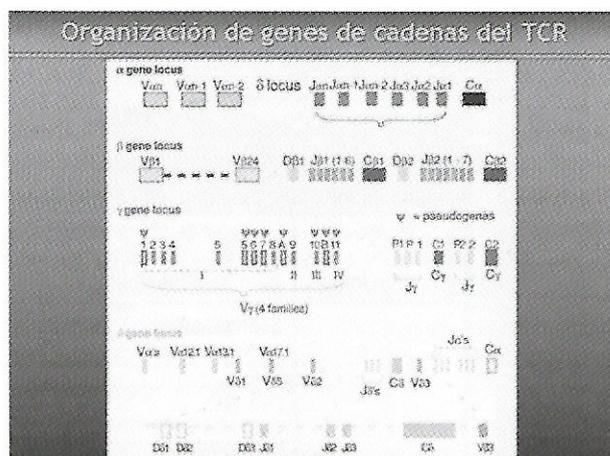


Fig. 12

de proteína. Dentro de las células B maduras se pueden identificar 3 diferentes tipos: 1) células B maduras vírgenes, 2) células B centrogerminales (centroblastos y centrocitos) y 3) células postgerminales (B con memoria y células plasmáticas de larga vida) (Tabla 1).

Relación de las neoplasias de célula B con las subpoblaciones B y estadios de diferenciación

Las neoplasias de célula B son proliferaciones clonales en diversos estadios de diferenciación que en muchos aspectos parecen recapitular los estadios de la diferenciación B normal (Fig. 11).

Sin embargo algunas neoplasias no corresponden claramente a un estadio de la diferenciación normal como es el caso de la tricoleucemia, mientras que otras como la LLC parecen ser de origen heterogéneo. Por lo tanto la clasificación de las neoplasias no puede hacerse sólo sobre la base de la contraparte normal. Las Leucemias/Linfomas linfoblásticos semejan en morfología y fenotipo a las células precursoras normales (Tabla 2). Se considera que dos neoplasias corresponden a células B vírgenes CD5+: la LLC (50% de los casos) y el linfoma del manto con ausencia de genes V de Ig mutados. Las células de la LLC son semejantes a la subpoblación de células vírgenes circulantes llamada B1 que expresan también CD23 mientras que las células del linfoma del manto son semejantes a las células de los folículos primarios y en su gran mayoría no presentan genes mutados. La LLC con genes mutados podría correlacionarse con células con memoria.

La mayoría de los linfomas de célula B están compuestos por células que en parte se asemejan a centroblastos y centrocitos que han mutado la región V de la Ig y a menudo también los genes BCL-6 sien-

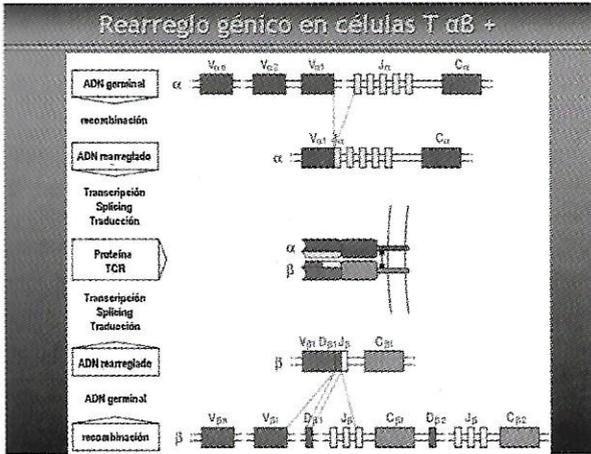


Fig. 13

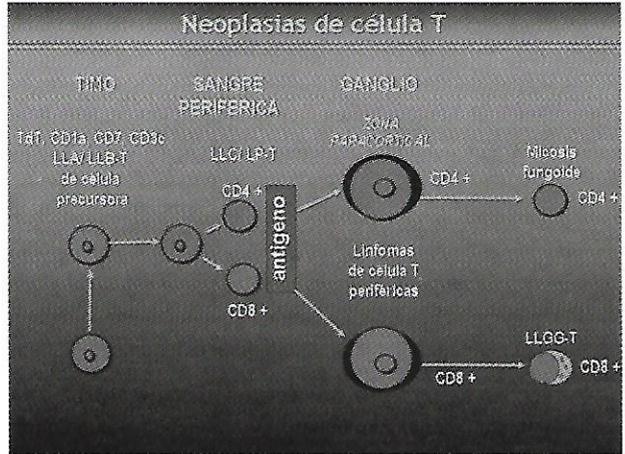


Fig. 15

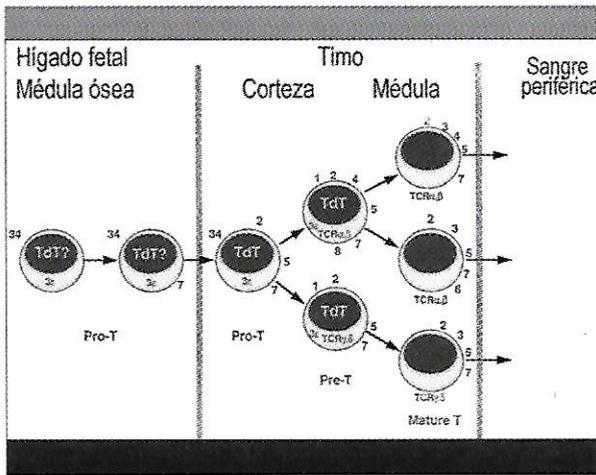


Fig. 14

do esto consistente con su derivación de células que han sido expuestas al centro germinal. Las células del linfoma de Burkitt son BCL-6+ y tienen genes mutados y se piensa que corresponden a blastos centrogerminales.

Los estudios recientes de micromatrices de cADN que permiten conocer el perfil de expresión génica de un tumor, han demostrado que los linfomas difusos de células grandes muestran heterogeneidad molecular. Algunos muestran una expresión génica semejante a las células centrogerminales, mientras otros muestran una expresión de genes característica de células B activadas (immunoblastos).

Los linfomas foliculares son semejantes en su composición a los folículos secundarios (centroblastos y centrocitos), expresan CD10 y BCL-6 y llevan genes V de Ig mutados.

La célula neoplásica del linfoma de Hodgkin de predominio linfocitario es una célula B con mutacio-

nes somáticas características de células centrogerminales.

En el caso del Linfoma de Hodgkin clásico, si bien la célula es de origen B y presenta genes rearrregados y somáticamente mutados, no expresa antígenos de célula B, y su origen centrogerminal es sólo demostrado por estudios genéticos.

Los linfomas de la zona marginal son similares a las células de la zona marginal donde residen las células B con memoria. expresan IgM sin IgD y los antígenos de célula B, carecen de CD5, CD10 y CD23 y están típicamente mutados.

El mieloma/plasmocitoma presenta células semejantes en morfología y expresión de algunos antígenos como CD38 y CD138 a las células plasmáticas normales.

ONTOGENIA T

El desarrollo de las células T tiene mucho en común con el desarrollo B. Ambas derivan de stem cells de médula ósea, y sobrellevan rereglos génicos en un microambiente especializado. No se desarrollan en la médula ósea sino que migran en un estadio muy temprano al timo, órgano linfóide central que provee el microambiente donde ocurre la maduración T. Durante la maduración en el timo, las células son seleccionadas para que cumplan con dos condiciones: el reconocimiento de las moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), pero que no reconozcan a los antígenos propios. Ambos procesos conocidos como selección positiva en el primer caso y selección negativa en el segundo caso. En el timo las células maduran desde la corteza hacia la médula. La corteza contiene sólo timocitos inmaduros y macrófagos dispersos, y la médula timocitos más maduros junto con células dendríticas y la mayor

parte de los macrófagos. En la médula las células que maduran sobrellevan los procesos de selección durante el cual la mayoría, aproximadamente el 98% de ellas van a la apoptosis. El proceso de selección positiva se lleva a cabo fundamentalmente por las células dendríticas las cuales son muy numerosas en la unión córtico-medular y por los macrófagos.

Rearreglos del TCR

En los estadios tempranos de la maduración tímica los genes del receptor de célula T sobrellevan una serie de rearreglos programados para producir células T inmaduras. El proceso es semejante al de las células B pero difiere en que aquí se generan dos líneas T: una que expresa el receptor $\alpha\beta$ y otra el receptor $\gamma\delta$.

La organización de los genes de cadenas α y β del TCR se asemejan a los de inmunoglobulina con segmentos separados para los dominios variables (V), de unión (J), y constante (C). La cadena alfa contiene 70-80 segmentos V, 60 segmentos J y un solo gen para el dominio constante. El gen de la cadena beta tiene una organización diferente. Contiene alrededor de 50 genes V funcionales localizados a distancia de dos clusters separados que contienen un segmento D y 5 o 6 segmentos J, y un solo segmento C. (Fig. 12). La recombinación somática de los genes α y β de igual manera que en los genes de inmunoglobulina, lleva a la expresión del receptor $\alpha\beta$ el cual se asocia con el complejo CD3.

La organización de los genes γ y δ son semejantes a los genes α y β (Fig. 13).

El gen que codifica para la cadena δ se halla enteramente dentro del gen α . Por eso los rearreglos en la cadena α involucran la inactivación de los genes de la cadena δ .

Al igual de lo que ocurre con las células B, cada célula T sobrelleva un rearreglo génico que es único y característico de esa célula.

Expresión antigénica en la diferenciación T.

En el timo las células T inmaduras o timocitos proliferan y se diferencian pasando a través de distintos estadios madurativos identificados por patrones diferentes de expresión de diversas proteínas de superficie y citoplasmáticas (Fig. 14).

Las células precursoras expresan CD34, TdT, HLA-DR y CD3 en el citoplasma. Luego adquieren el antígeno CD7 en el estadio pro-T.

Las células de la zona cortical adquieren los antígenos CD1a, CD2, CD5 y coexpresan CD4 y CD8. Luego en el estadio de timocito medular se produce la segregación de las tres subpoblaciones: las células helper-inductoras (CD4+CD8-), las células cito-

tóxico-supresoras (CD4-CD8+) y la población T $\gamma\delta$ que es CD3+ y doble negativa para CD4 y CD8.

En estos estadios el antígeno CD3 se expresa con intensidad en la superficie.

Las subpoblaciones maduras pasan a la sangre periférica y luego a la zona paracortical de los ganglios periféricos donde se encuentran células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos principalmente). Si encuentran un antígeno específico proliferan y se diferencian. Si no encuentran un antígeno dejan el ganglio a través de los vasos linfáticos.

Relación de las neoplasias de célula T con las subpoblaciones y estadios de diferenciación

Algunas de las neoplasias T también pueden ser asociadas a diferentes estadios de la diferenciación T normal (Fig. 15).

La LLA/LL-T es una expansión clonal de células precursoras T que muestran un fenotipo comparable al de los timocitos. Son TdT+, CD3c+ y muestran una expresión variable de CD1a, CD2, CD3s, CD4, CD5, CD7 y CD8.

El fenotipo de la leucemia prolinfocítica T sugiere que su origen podría corresponder al de una célula T de maduración intermedia entre los timocitos y los linfocitos maduros de la sangre periférica (célula T virgen).

Los linfomas de célula T periférica son expansiones clonales de células T maduras de la zona paracortical del ganglio de fenotipo helper-inductor o citotóxico supresor.

La leucemia de linfocitos grandes granulares de fenotipo T se correlacionaría con una subpoblación T citotóxica-supresora CD8+ y la Micosis Fungoides y el Síndrome de Sezary con una subpoblación T CD4+.

Los análisis de expresión génica actualmente en curso darán probablemente información útil que permita definir subcategorías sobre esta base.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casali, P and Silberstein, L.E.S eds. Immunoglobulin gene expression in development and disease. *Ann N Acad Sci* 1995, 764.
2. Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Schissel, M.S. V(D)J recombination molecular biology and regulation. *Ann Rev Immunol* 1992, 10: 359-383.
3. Wagner, S.D. and Neuberger, M.S. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Ann Rev Immunol* 1996, 14: 441-457
4. Hardy, R.R. and Hayakawa, K. B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 764: 19-24.
5. Ehrlich, A. and Kuppers, R. Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. *Curr Opin Immunol* 1995, 7: 281-284.
6. Berek, C, Berger, A, Apel, M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991; 67: 1121-29.
7. Weill, J.C. and Reynaud, C.A. Rearrangement/hypermutation/

- gene conversion-when, where, and why. **Immunol Today** 1996, 17: 92-97.
8. Cleary, M.L., Meeker T.C., Levy S., et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. **Cell** 1986; 44: 97-106.
 9. Klein U, Goossens T, Fischer M et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. **Immunol Rev** 1998; 162: 261-80.
 10. Kuppers, R., Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. **N Engl J Med** 1999, 341: 1520-9.
 11. Naylor M, Capra D. Mutational status of Ig VH gene provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, vol 94, N° 6 (september 15) 1999 pp 1837-39.
 12. Alizadeh, AA, Elsen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**. 2000; 403: 503-11.
 13. Schwering I, Brauninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood**, 15 february 2002. vol 101 N° 4 1505-12.
 14. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84: 1361-92.
 15. Anderson, G, Moore, NC, Owen, JJT, Jenkinson, E.J. Cellular interactions in thymocyte development. **Ann Rev Immunol** 1996, 14: 73-99.
 16. Shortman, K, Egerton, M, Spangrude, G.J., and Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. **Semin Immunol** 1997; 2: 3-12.